

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

TESIS

Presentada para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS

por

Héctor Omar Toriz Hernández.

Ingeniero Biotecnólogo

BIODEGRADACIÓN ANAEROBIA DE ÁCIDO TEREFTÁLICO.

Dirigida por

Dra. Claudia Guerrero Barajas.

Dr. Claudio Garibay Orijel.

México, D.F. 30 de Agosto de 2011



SIP-14

INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
SECRETARIA DE INVESTIGACION Y POSGRADO

ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de México, D.F siendo las 10:00 horas del día 23 del mes de agosto del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de UPIBI-IPN para examinar la tesis de grado titulada:

"BIODEGRADACION ANAEROBIA DE ÁCIDO TEREFTÁLICO"

Presentada por el alumno:

TORIZ

Apellido paterno

HERNÁNDEZ

materno

HÉCTOR OMAR

nombre(s)

Con registro:

B	0	9	1	5	4	9
---	---	---	---	---	---	---

aspirante al grado de: Maestro en Ciencias en Bioprocesos

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

Directora de Tesis

DRA. CLAUDIA GUERRERO BARAJAS

Director de Tesis

DR. CLAUDIO GARIBAY ORIJEL

DR. EDGAR SALGADO MANJARREZ

DR. JUAN SILVESTRE ARANDA BARRADAS

DR. ALBERTO ORDAZ CORTES



EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD PROFESIONAL
INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

DRA. GUADALUPE RAMÍREZ
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACION

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, Distrito Federal siendo el día 2 de Septiembre del año 2011, el que suscribe HÉCTOR OMAR TORIZ HERNÁNDEZ, alumno del Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS con número de boleta B091549, adscrita a la UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la DRA. CLAUDIA GUERRERO BARAJAS y del DR. CLAUDIO GARIBAY ORIJEL y el permiso para utilizarlo como tema de tesis de maestría del Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICYT, D.F. PICS08-56 y PICS08-79), cede los derechos del trabajo titulado “BIODEGRADACIÓN ANAEROBIA DE ÁCIDO TEREFTÁLICO” al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o directores del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo al: Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICYT, D.F) y a las siguientes direcciones de correo electrónico: cguerrerob@ipn.mx, agaribayo@ipn.mx ó nacht_nonplusultra@hotmail.com. Si el permiso es otorgado, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



Héctor Omar Toriz Hernández

Declaración de originalidad

"Yo declaro que esta tesis, así como los resultados en ella reportados, son producto de mi trabajo y que hasta donde yo sé, no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona, ni tampoco contiene material que haya sido utilizado para obtener algún grado o diploma en alguna otra institución educativa excepto donde se reconoce como tal. Declaro igualmente que hago justo reconocimiento en la tesis a las personas que contribuyeron con su trabajo y, finalmente, declaro que esta tesis es producto de mi propio trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación o a la expresión escrita."



Héctor Omar Toriz Hernández.



Vo. Bo. del director o directores de tesis.

Resumen

El ácido tereftálico es un compuesto monoaromático utilizado ampliamente como plastificador, su uso va desde juguetes de plástico, industria textil, aditamentos médicos y principalmente para botellas de plástico usadas para agua carbonatada y embotellada, la producción de una tonelada de ácido tereftálico genera entre 3 y 10 metros cúbicos de aguas residuales, las cuales contienen como principal contaminante el mismo ácido tereftálico, entre trazas de otros químicos monoaromáticos y compuestos más sencillos. En general estas aguas tienen una elevada toxicidad, por lo que el desarrollo de sistemas de tratamiento adecuados es importante para la protección de los seres vivos y el medio ambiente, el tratamiento anaerobio es una opción interesante que ofrece entre otras ventajas la pobre producción de lodos para disposición y la producción de energía en forma de metano.

En la presente investigación fue posible adaptar un cultivo originario de una planta de tratamiento de aguas residuales (Iztapalapa, México, D.F) a dos condiciones anaerobias diferentes (desnitrificantes y metanogénicas) y degradar ácido tereftálico. Los cultivos en microcosmos bajo las condiciones mencionadas degradaron 500 mg/l de ácido tereftálico en 4 días bajo condiciones de desnitrificación y tomaron 6 días para degradarlo en condiciones de metanogénesis, con una velocidad de degradación de 12.13 mg AT /L h y de 9.25 mg AT/L h respectivamente.

Un reactor tipo UASB inoculado con los microorganismos adaptados en los microcosmos se operó en forma semi-continua para biodegradar el AT a dos tiempos de retención hidráulica (7 y 13 min). Los mejores resultados se obtuvieron a un TRH de 13 min para el cual 2 g/L de AT fueron degradados a razón de 187.6 mg AT/L d mientras que una concentración de AT de 3 g/L a este mismo TRH fueron degradados a razón de 115.52 mg AT/L d. El principal intermediario identificado durante la biodegradación del AT fue el acetato.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que es posible biodegradar el AT con el inóculo pre-adaptado (de origen aerobio) a velocidades razonables comparadas con las obtenidas de sistemas de reactores inoculados con lodos granulares metanogénicos. Estos resultados sirven como base para la biodegradación del AT en un régimen continuo dentro del mismo reactor bajo las condiciones de operación sugeridas.

Abstract

Terephthalic acid (TA) is a monoaromatic compound widely used as plasticizer in several types of industries, varying from production of plastic toys, textiles, medical devices to the manufacturing of bottles used for drinking water and several other beverages. For each ton of terephthalic acid production, 3 to 10 m³ of wastewater are generated containing as the main pollutant TA itself in a mixture involving other monoaromatics and organic compounds with a simpler chemical structure. In general, these waters are highly toxic, therefore, is necessary to include an adequate treatment process for these water streams in order to avoid damage to the environment. Anaerobic processes are an option that may offer certain advantages over aerobic processes such as low generation of sludge and the potential to generate energy through the production of methane.

In the present work it was possible to adapt a microbial culture taken from a wastewater treatment plant (Iztapalapa, Mexico City) to a two different anaerobic conditions (denitrification and methanogenesis) in order to biodegrade TA. The cultures were incubated in microcosms under the mentioned conditions and were able to degrade 500 mg/L of TA in 4 days under denitrifying conditions, whereas they took 6 days to biodegrade the same TA concentration under methanogenic conditions. The rates of TA biodegradation were: 12.13 mg TA/L h and 9.25 mg TA/L h for denitrifying and methanogenic conditions respectively.

A UASB reactor was inoculated with the adapted cultures used in the microcosms and it was operated under semi continuous regime for TA biodegradation. Two HRT were used (7 and 13 min). The best results were obtained at a HRT of 13 min at which 2 g/L of AT were biodegraded at a rate of 187 mg TA/L d, whereas at the same HRT, 3 g/L of AT were biodegraded at a rate of 115.52 mg TA/L d. The main intermediate product detected in the process was acetate.

The results obtained in this work demonstrate that is possible to biodegrade TA with the pre-adapted inoculum (initially aerobic) at reasonable rates compared to the obtained in systems of bioreactors inoculated with methanogenic granular sludge. These results can be used as a reference for future work on TA biodegradation in continuous regime under methanogenic conditions at the suggested operation conditions.

Agradecimientos

A mis padres, hermana y mi familia, por todo su apoyo y paciencia sin la cual me hubiera quedado solo hace algún tiempo. Sin ustedes no sería quien soy.

A Karina por ser la persona que me ha acompañado los últimos años de mi vida, por estar a mi lado en los momentos difíciles y en los sencillos, crecer juntos y compartir eternidades conmigo.

A mis compañeros de clase y de laboratorio, quienes más que compañeros son amigos, que enriquecieron mi aprendizaje aportándome ideas y nuevos puntos de vista no sólo de la experimentación en esta investigación si no de la vida misma, la amistad y el trabajo en equipo.

Al sistema de Aguas de la ciudad de México, por otorgarme el permiso para recolectar el inóculo usado durante esta investigación.

A mis asesores por la paciencia y el tiempo que invirtieron en mi formación.

La presente investigación se realizó con la beca 59979 de Maestría otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Para realizar la presente investigación se contó con el apoyo del proyecto “Aprovechamiento de residuos sólidos y plásticos para la generación de bioenergía (PICS08-056)” y “Remoción de compuestos recalcitrantes de aguas municipales utilizando reactores de ambiente combinado (PICS08-079)” financiado por el Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal

También quiero agradecer de forma especial a la Doctora Yolanda Gómez y Gómez (del departamento de Farmacología de UPIBI) por su tiempo, paciencia y apoyo con las metodologías y el equipo de electroforesis capilar. De igual manera quiero agradecer al Doctor Luis Raúl Tovar (Jefe del laboratorio de del CIEMAD) por su apoyo y las facilidades para usar el equipo de cromatografía de gases.

Tabla de contenido

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL.....	i
Declaración de originalidad.....	¡Error! Marcador no definido.
Resumen.....	5
Abstract	6
Acta de revisión.....	¡Error! Marcador no definido.
1. INTRODUCCIÓN.	13
1.1 Aguas industriales en México y su tratamiento.	13
1.2 El ácido tereftálico.....	13
1.3 Impacto del ácido tereftálico en el medio ambiente y los seres humanos.	15
1.4.1 Tratamientos fisicoquímicos para tratamiento de aguas residuales de la producción de ácido tereftálico.	16
1.4.2 Tratamientos biológicos de las aguas residuales de la producción de ácido tereftálico.	16
1.4.3 Sistemas biológicos que pueden usarse en el tratamiento de aguas residuales.	18
1.5 Biodegradación de compuestos aromáticos.....	19
1.5.1 Factores que afectan los procesos de biodegradación de compuestos xenobióticos en condiciones anaerobias.....	19
1.5.2 Biodegradación de compuestos monoaromáticos en anaerobiosis.	20
1.6 Biodegradación de ácido tereftálico en condiciones de desnitrificación y metanogénesis	22
2. Justificación.	24
3. Objetivos.	24
4. Metodología.	25
4.2 Químicos.....	25
4.3 Aclimatación a condiciones anaerobias.	25
4.4 Experimentos de microcosmos.	26
4.5 Reactores para pre-inoculación del reactor.....	26
4.6 Montaje y experimentos en el reactor.....	27
4.7 Métodos analíticos.	29
4.7.1 Cuantificación de nitrato.....	29
4.7.2 Cuantificación de ácido tereftálico.....	29
4.7.3 Cuantificación de acetato y otros ácidos orgánicos.....	30

4.7.4	Determinación de la demanda química de oxígeno (DQO).	30
4.7.5	Determinación de la actividad metanogénica acetoclástica.....	30
4.7.6	Análisis de la composición de la fase gaseosa y del biogás producido.	30
5.	Resultados y Discusión.	31
5.1	Características del inóculo y su preparación para incubarse en condiciones anaerobias. ...	31
5.2	Balances estequiométricos de la biodegradación de ácido tereftálico en desnitrificación y metanogénesis	33
5.3	Comprobación de la biodegradabilidad del ácido tereftálico en anaerobiosis	34
5.4	Comportamiento de los microcosmos de adaptación del sistema desnitrificante.....	36
5.5	Comportamiento de los microcosmos bajo condiciones de metanogénesis.....	42
5.6	Reactores de pre-inoculación para el reactor UASB.	50
5.7	Desempeño del reactor UASB metanogénico.....	52
6.	Perspectivas.	58
7.	Conclusiones.	60
	Bibliografía.	66

Índice de Figuras.

Figura 1. Isómeros de ácidos ftálicos. De izquierda a derecha ácido tereftálico, ácido ftálico y ácido isoftálico.	14
Figura 2. Biodegradación de ácido tereftálico en condiciones desnitrificantes	21
Figura 3. Reactor metanogénico usado en la presente investigación.	27
Figura 4. Tinciones de Gram para los cultivos desnitrificante y metanogénico.	33
Figura 5. Evidencia de la biodegradación del ácido tereftálico mediante la producción de biogás a lo largo del tiempo.	36
Figura 6. Consumo de 1.5mM de AT en sistema desnitrificante.	36
Figura 7. Determinación de la velocidad de consumo de AT en sistema desnitrificante y acumulación de acetato.	37
Figura 8. Crecimiento de la biomasa durante el consumo de 1.5mM de AT.	38
Figura 9. Consumo de nitrato con una alimentación de 3mM ión nitrato y la misma concentración de AT.	38
Figura 10. Comportamiento de la fase gaseosa durante la desnitrificación con 3 mM de AT y 3 mM de NO_3^-	40
Figura 11. Comportamiento de la biodegradación de AT en desnitrificación.	41
Figura 12. Evidencias de la biodegradación de AT en sistema metanogénico. Concentración inicial de AT 1.5mM.	43
Figura 13. Crecimiento de la biomasa en el sistema metanogénico, consumiendo 1.5mM de AT. .	44
Figura 14. Velocidad de biodegradación de AT en metanogénesis. Concentración inicial de 3 mM de AT.	44
Figura 15. Patrón de la producción de biogás usando acetato como fuente de carbono. Alimentación con 11.32 mg/l de acetato.	45
Figura 16. Actividad metanogénica acetoclástica del inóculo.	46
Figura 17. Patrón de la producción de biogás en presencia de AT como fuente de carbono. Alimentación con 138 mg/l de AT.	46
Figura 18. Actividad metanogénica usando al AT como fuente de carbono	47
Figura 19. Presencia de metano y dióxido de carbono en el microcosmos metanogénico con respecto al tiempo	48
Figura 20. Comportamiento del pre-inóculo desnitrificante durante 19 días.	50
Figura 21. Comportamiento de pre-inóculo metanogénico, durante 19 días.	51
Figura 22. Consumo de ácido tereftálico en el reactor con un flujo de 285 ml/min.	52
Figura 23 . Consumo de ácido tereftálico en el reactor con un flujo de 156 ml/min.	53
Figura 24. Consumo del ácido tereftálico en el reactor así como la acumulación de acetato.	55
Figura 25. Comportamiento de la fase gaseosa durante la operación del reactor metanogénico. .	56
Figura 26. Curva de calibración para AT.	63
Figura 27. Curvas de calibración para metano, dióxido de carbono y nitrógeno gaseoso.	64
Figura 28. Curva de calibración para el acetato.	65

Índice de tablas.

Tabla 1. Propiedades del ácido tereftálico.....	14
Tabla 2. Características de las aguas residuales generadas en la producción de PTA	15
Tabla 3. Cultivos capaces de degradar ácido tereftálico y compuestos relacionados en condiciones anaerobias.....	17
Tabla 4. Pares redox que pueden ser usados como aceptores de electrones.....	18
Tabla 5. Uso de reactores para el tratamiento de aguas residuales de la producción de ácido tereftálico.	23
Tabla 6. Químicos usados en las pruebas analíticas.	25
Tabla 7. Características del reactor metanogénico.....	28
Tabla 8. Tiempos de retención hidráulica usados en el reactor.	28
Tabla 9. Composición del medio basal.....	29
Tabla 10. Solución de Metales traza que se adiciona al medio basal.	29
Tabla 11. Composición del buffer para cuantificar ácido tereftálico por electroforesis capilar.....	30
Tabla 12. Posibles reacciones presentes en el sistema desnitrificante y sus rendimientos.	42
Tabla 13. Posibles reacciones en el sistema metanogénico y sus rendimientos.	49
Tabla 14. Velocidades de degradación determinadas en esta tesis.	57
Tabla 15. Curva de calibración para el AT.	62

Abreviaturas.

AT-	Ácido tereftálico.
DMP-	Dimetil tereftalato.
PET-	Polietilentereftalato.
PVC-	Policloruro de vinilo.
CNA-	Comisión Nacional del Agua.
DQO-	Demanda Química de Oxígeno.
DBO ₅ -	Demanda Bioquímica de Oxígeno en 5 días.
CoA-	Coenzima A.
ATP-	Adenosín Trifosfato.
DNRA-	Reducción del Nitrato a Amonio sin Asimilación.
SSV-	Sólidos suspendidos volátiles.
SACM-	Sistema de Aguas de la Ciudad de México.
FAS-	Sulfato ferroso amoniacal.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 Aguas industriales en México y su tratamiento.

En México la industria usa 3.3 mil millones de metros cúbicos de agua al año ($\text{Km}^3/\text{año}$), obteniendo la mitad de ella de acuíferos subterráneos y la otra mitad de cuerpos de agua superficiales. La contaminación de estos últimos es un problema oculto pero muy fuerte en el país, los cuerpos de agua superficial son explotados principalmente por las industrias tanto en la obtención de agua como en la descarga de aguas residuales a los ríos y lagos. La Comisión Nacional del Agua (CNA) reconoce al menos que el 31.6% de sus puntos de muestreo de agua superficial a nivel nacional tienen un DQO igual o superior a los 40 mg DQO/l y el 13.6% presentan un DBO_5 de 30 mg DBO_5/l o mayor, lo cual los coloca como puntos contaminados o altamente contaminados según la normatividad nacional (NOM-001-ECOL-1996; CNA, 2010). Anualmente las descargas de aguas residuales no municipales incluyendo a la industria genera $6.01 \text{ km}^3/\text{año}$ de aguas residuales de los cuales sólo se trata el 18% ($1.07 \text{ km}^3/\text{año}$), se generan 7 millones de toneladas de DBO de las cuales sólo se remueven 1.15 millones de toneladas en las plantas de tratamiento. En el país existen 2082 plantas de tratamiento de aguas industriales distribuidas principalmente en el Estado de México, Baja California, Veracruz, Distrito Federal, Tabasco, Querétaro y Tlaxcala. Desafortunadamente, la NOM-001-ECOL-1996 sólo regula parámetros convencionales de la calidad del agua y como consecuencia muchas de las descargas industriales que deberían de ser catalogadas como tóxicas son descargadas al ambiente sin ninguna sanción. Dentro de las principales actividades industriales en el país, destaca la producción de ácido tereftálico (AT), ésta genera grandes volúmenes de efluentes contaminados. Estos efluentes son tratados satisfactoriamente mediante lagunas anaerobias, sin embargo el proceso debe de ser optimizado en cuanto a tiempo de degradación y concentración de AT.

1.2 El ácido tereftálico.

Desde la introducción del petróleo a la vida humana, como una materia prima de gran impacto y utilidad, la tecnología para aprovecharlo se ha desarrollado de forma descomunal, no sólo por sus avances sino porque la industria petroquímica manufactura gran cantidad de productos intermediarios y finales para el uso humano. Sin embargo la industria petroquímica es una de las industrias más contaminantes que ha desarrollado el hombre. Entre los contaminantes que llegan a producirse en estos procesos encontramos a los ácidos ftálicos, como el ácido tereftálico (AT) y el ácido isoftálico (Figura 1) y algunos ésteres de estos como el dimetiltereftalato (DMP). El exceso en su uso y su entrada al ambiente los convierte en contaminantes importantes (Vamsee-Krishna and Phale 2008).

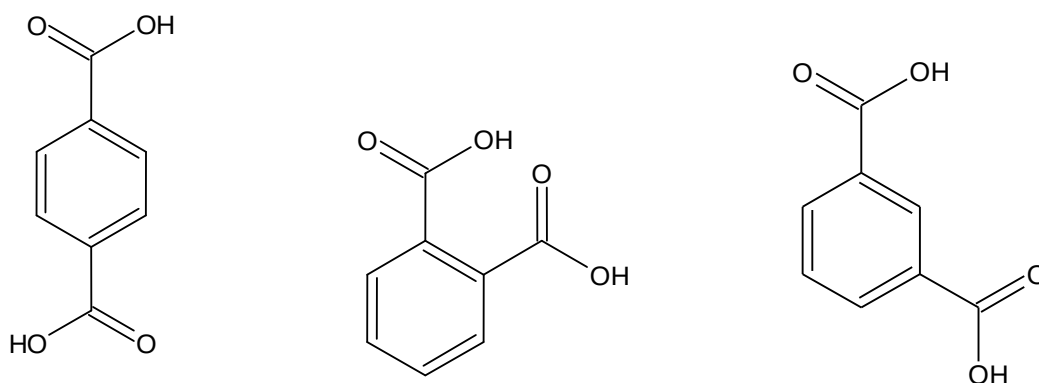


Figura 1. Isómeros de ácidos ftálicos. De izquierda a derecha ácido tereftálico, ácido ftálico y ácido isoftálico.

En general los ácidos ftálicos forman soluciones coloidales y son poco solubles en agua. Desde 1970 los ácidos ftálicos son usados como plastificadores, principalmente en la producción de polietilentereftalato (PET) y policloruro de vinilo (PVC) (Ferro 2008). Algunas propiedades del ácido tereftálico se muestran en la Tabla 1.

El ácido tereftálico se obtiene por un proceso de oxidación del p-xileno, disuelto en ácido acético, con un sistema catalítico formado por acetato de manganeso o acetato de cobalto. La mezcla resultante debe de ser “limpiada” de ácido acético, y posteriormente las impurezas restantes deben de ser hidrogenadas en presencia de un catalizador que contenga paladio a una temperatura aproximada de 232°C para obtener AT de alta pureza superior al 98% (Dylewsky 1981).

Tabla 1. Propiedades del ácido tereftálico (Kleerebezem et al. 1999a).

Nombre	Ácido tereftálico
Nombre IUPAC	Ácido benceno 1,4- benceno dicarboxílico
Solubilidad	15 mg/l en agua a 25°C alrededor de 40 mg/l en agua a 100°C La sal de sodio es soluble hasta los 14 g/l a 25°C En metanol se pueden disolver 100 mg/l a 25°C
Fórmula	$C_8H_6O_4$
Peso molecular	166.14 g/mol
Densidad	1.61 g/ml a 20°C

Durante la producción del AT se generan aguas residuales, las cuales son altamente tóxicas para los cuerpos de agua que las reciben, principalmente por la presencia del AT, aunque también contiene otros compuestos tóxicos. Por cada tonelada de AT que se produce se generan entre 3-10 m³ de aguas residuales. Algunas de las características que presentan estas aguas se presentan en la Tabla 2 (R.Kleerebezem and Lettinga 1999).

Tabla 2. Características de las aguas residuales generadas en la producción de PTA (Centroamérica-Europa 2007)

Parámetro	Valor
pH	3.5
Temperatura	40 – 50°C
DQO	5-20 kg O ₂ /m ³
Contaminantes presentes en las descargas de aguas residuales	PTA, ácido benzoico, p-tolueno, p-xileno, acetato y metil acetato

A nivel mundial la producción de ácido tereftálico alcanzó las 14.4 millones de toneladas en el año 2007 (Vamsee-Krishna and Phale 2008), esto puede dar una idea de cuantos metros cúbicos de agua residual se producen a nivel mundial relacionados con la producción de AT. La producción mundial de AT se distribuye en distintos usos industriales, entre los que destacan; fabricación de juguetes, aditamentos médicos, industrias químicas como las de pinturas y lubricantes, pero principalmente para la fabricación de botellas para bebidas carbonatadas y agua embotellada (Vamsee-Krishna and Phale 2008).

1.3 Impacto del ácido tereftálico en el medio ambiente y los seres humanos.

Diferentes estudios han analizado el impacto de estos compuestos en el ambiente y los seres humanos, encontrándose evidencia de que los ftalatos entran al ambiente de forma directa o indirecta. En la forma directa encontramos los derrames y las aguas residuales que descargan en los cuerpos de agua. De forma indirecta, los ftalatos pueden entrar al medio ambiente a través de los lixiviados en los tiraderos a cielo abierto y por los procesos de bioaumentación que inicia en organismos acuáticos que habitan los cuerpos de agua contaminados de forma directa (R.Kleerebezem and Lettinga 1999).

Se ha evidenciado que el PTA puede permanecer en el ambiente durante años, existe evidencia de que la remoción abiótica del ácido tereftálico tiene vidas medias para su hidrólisis química que van de los 4 meses hasta por encima de los 100 años (Kleerebezem et al. 1999a; Vamsee-Krishna and Phale 2008). Para la mayoría de los seres vivos este compuesto y sus derivados tienen un impacto tóxico, esto se debe principalmente a que tiene una biodisponibilidad muy baja, producto de su prácticamente nula solubilidad en agua. Esta característica provoca que sea adsorbida en materia sólida suspendida en los cuerpos de agua o en los lechos de los mismos, de ahí pueden ser ingeridos por peces, los cuales tienen una muy pobre capacidad para degradar el PTA, estos peces son el inicio de fenómenos de bioaumentación que pueden llegar incluso a los seres humanos que consumen alimentos contaminados (Dai et al. 2005; Heise 2004).

En el caso de los humanos, los compuestos como el AT y sus derivados son agentes teratogénicos, estrogénicos y acarrear problemas reproductivos, se le detecta en los fluidos corporales, inducen la formación de litos en la vejiga, al estar expuesto al AT sin equipo de protección, se presenta irritación de ojos, piel, tracto respiratorio y visión borrosa (Vamsee-Krishna and Phale 2008). En mamíferos pequeños provoca malformaciones somáticas y reproductivas, inhibe competitivamente a la glutamato deshidrogenasa en ganado bovino y porcino; esto se debe a que

la distancia interprotonal de los grupos carboxilo del ácido es similar a la distancia existente entre los grupos carboxilo del α -cetoglutarato y el iminoglutarato. Los esteres de AT inhiben la lipooxigenasa 15 relacionada con la β -oxidación (Vamsee-Krishna and Phale 2008).

1.4 Opciones para retirar el ácido tereftálico del medio ambiente.

Las evidencias del impacto negativo de los ftalatos existen, el uso de materiales sintéticos y en especial de los plásticos continua en aumento, por lo tanto los desperdicios generados para la obtención de dichos plastificadores ha llamado la atención en busca de opciones para reducir el impacto de estos desperdicios en el ambiente y los seres vivos. El caso de las aguas residuales es un punto especial debido a lo limitado del recurso para consumo humano, por lo que se han desarrollado diferentes opciones para el tratamiento y mejorar la calidad de estas aguas, existen tratamientos fisicoquímicos (Masuda et al. 1997; Thiruvengkatachari et al. 2007) y biológicos (Ejlertsson et al. 1996c; Fdz-Polanco et al. 1999).

1.4.1 Tratamientos fisicoquímicos para tratamiento de aguas residuales de la producción de ácido tereftálico.

Para la remoción del ácido tereftálico, contenido en las aguas residuales generadas en su producción, existen tratamientos fisicoquímicos los cuales se basan en su oxidación mediante ozono con ayuda de la luz UV, entre estas opciones se encuentra la opción de UV-H₂O₂-Fe, O₃, O₃/Fe, O₃/TiO₂, sin embargo la capacidad de remoción es muy pobre, por ejemplo: se descomponen 50 ppm en 10 horas en el sistema de ozono y óxido de titanio (Thiruvengkatachari et al. 2007). De igual forma se ha reportado la posibilidad de recuperar el ácido tereftálico mediante una mezcla de 70% de vapor y 30% de nitrógeno a temperaturas de 500°C (Masuda et al. 1997). Además de las obvias desventajas energéticas y de costo, también se ha demostrado que se generan compuestos como benzoquinona, benceno, ácido málico y oxálico, sin mencionar que es necesario invertir en la disposición de los residuos obtenidos (Thiruvengkatachari et al. 2007).

1.4.2 Tratamientos biológicos de las aguas residuales de la producción de ácido tereftálico.

Sin embargo, los tratamientos biológicos surgen como una opción más útil que los procesos fisicoquímicos, pues en estos no sólo se logra economía si no la transformación del ácido tereftálico en productos más inocuos (biomasa y CO₂) e incluso energéticamente útiles como el metano. Debido a la presencia y persistencia en el ambiente del AT y compuestos relacionados, los microorganismos han desarrollado y adaptado nuevas rutas metabólicas para degradar estos compuestos. Se han encontrado tanto microorganismo aerobios como anaerobios capaces de degradar estos ácidos y sus esteres (Vamsee-Krishna and Phale 2008). Para el caso del tratamiento anaerobio de AT, se han empleado principalmente consorcios bacterianos. En estos, los microorganismos se desarrollan en sintrofía, en este tipo de interacción uno o más miembros del consorcio produce uno o mas metabolitos necesarios para otros grupos bacterianos miembros del consorcio. Existen diferentes investigaciones donde se ha evidenciado la degradación de ácido tereftálico y compuestos derivados de este en condiciones anaerobias, las cuales se muestran en la Tabla 3.

Biodegradación anaerobia de ácido tereftálico.

Tabla 3. Cultivos capaces de degradar ácido tereftálico y compuestos relacionados en condiciones anaerobias.
Adaptada de (Vamsee-Krishna and Phale 2008)

Organismos	Compuesto metabolizado	Metabolitos intermediarios	Concentraciones iniciales de ácidos ftálicos.	Referencia
<i>Pelotolomaculum terephthalicum</i> , <i>Pelotolomaculum isophthalicum</i>	Isoftalato, ftalato y tereftalato	Benzoato, acetato y metano	2mM de isoftalato, aproximadamente el 50% de degradación en 60 días. (1)	(Yan-Ling Qiu and al. 2006)
<i>Pseudomonas sp. P136</i>	Isómeros de ftalato	Esteres de ftalato y CoA, benzoato, ciclohex-1-enocarboxilato, carboxilato, pimelato, acetato.	15 µM de o-ftalato, consumo superior al 80% en 48 horas. (2)	(Nozawa and Maruyama 1988)
<i>Pelotolomaculum thermoproponicum</i> , <i>Desulfotomaculum thermobenzoicum</i> , <i>Syntrophobacter fumaroxidans</i> , <i>Syntrophus gentianae</i> , <i>Desulfovibrio vulgaris</i> , <i>Methanospirillum hungatei</i> , <i>Methanosaeta concilli</i>	Isómeros de ftalato 1mM de cada uno de los isómeros.	Benzoato y acetato.	1mM de o-ftalato, isoftalato, tereftalato. (3)	
Lodo sin caracterización	Benzoato, isómeros de ftalato, dimetil-ftalato, dimetil-tereftalato 2mM de cada compuesto	Monometiltereftalato, tereftalato, monometilftalato, ftalato y esterres de CoA	2 mM de cada compuesto. (4)	(Kleerebezem et al. 1999a)
Lodo sin caracterización	Di-n-butil ftalato, dietil ftalato, dimetil-ftalato, butil-benzil ftalato	Monoftalato ester, ftalato, benzoato y metano.		
Lodo sin caracterización	Dimetil-ftalato, di-n-butil ftalato, di-n-octil ftalato	Metano.	10 mg/l de cada uno de los compuestos consumiéndose el 90% en 4 días. (6)	(Jianlong et al. 2000)

1.4.3 Sistemas biológicos que pueden usarse en el tratamiento de aguas residuales.

Los procesos de biorremediación son posibles usando la variedad de los sistemas biológicos, dentro de esta variedad los microorganismos pueden usar diferentes moléculas como aceptores finales de electrones con el fin de obtener energía a partir del transporte de electrones, para esta investigación los pares redox de importancia fueron los anóxicos y los anaerobios.

Es importante mencionar que los pares anóxicos implican las condiciones de microaerofilia por lo que en un sistema de este tipo se desarrollan microorganismos anaerobios facultativos y anaerobios estrictos (Baker and Herson 1999; Thauer 1998), tal es el caso de la desnitrificación. Por otro lado el caso de los sistemas anaerobios suele involucrar a microorganismos anaerobios estrictos debido a la ausencia de oxígeno, estos sistemas suelen ser altamente reducidos (Baker and Herson 1999; E.Rittmann and McCarty 2001), un ejemplo de ellos es la metanogénesis. La Tabla 4 muestra los principales pares redox usados por los microorganismos como aceptores finales de electrones.

Tabla 4. Pares redox que pueden ser usados como aceptores de electrones (Baker and Herson 1999).

Par redox	Proceso biológico	Ambiente	ΔG^0 KJ/ e^- eq
CO_2/CH_4	Metanogénesis	Altamente reducido	23.53
CO_2 /acetato	Metanogénesis/fermentación	Reducido	
SO_4^{-2}/H_2S	Sulfato reductor	Reducido	20.85
NO_3^-/NO_2^-	Reducción de nitrato	Reducido moderadamente	
NO_3^-/N_2	Desnitrificación	Anóxico/oxidado	-72.20
Fe^{+3}/Fe^{+2}	Reducción del fierro	Anóxico/oxidado	-74.27
O_2/H_2O	Respiración aerobia	Oxidado	-78.72

Las reacciones de óxido-reducción de los aceptores de electrones anaerobios es endergónica, mientras que en los sistemas anóxicos la reacción es en general exergónica: como resultado de estas diferencias energéticas los procesos y poblaciones anaerobios son desplazados fácilmente por los anóxicos y los aerobios (Baker and Herson 1999; Field et al. 1995).

La presente investigación se desarrolló con cultivos mixtos, consorcios bacterianos desnitrificantes (aceptor de electrones NO_3^-) y metanogénicos (aceptor de electrones CO_2). Una característica importante de los consorcios bacterianos que funcionan con bajas o nulas concentraciones de oxígeno es que los microorganismos desnitrificantes, sulfato reductores y microorganismos metanogénicos suelen no estar relacionados directamente con la degradación de los contaminantes orgánicos que el consorcio consume, en este caso ácido tereftálico, sino que se encargan de mantener y generar las condiciones donde el flujo de electrones puede distribuirse por el sistema y por los diferentes compuestos presentes durante la biotransformación de los contaminantes (Schink 1997). Estas comunidades generan los cambios necesarios para crear las condiciones donde la comunidad se beneficie por el estrés generado y ser un mejor competidor ante otros grupos bacterianos (Field et al. 1995; Thauer 1998). Entre las condiciones importantes

para la desnitrificación y la metanogénesis se encuentra el pH, que incide sobre el potencial redox del sistema, la metanogénesis sólo existe entre las 6.5 y 8 unidades de pH, mientras que la desnitrificación se da entre las 5.8 y 9 unidades, sin embargo la desnitrificación será incompleta si el pH es menor a 7 y se acumularán óxidos de nitrógeno que inhibirán el proceso (Baker and Herson 1999; Tugtas 2007).

1.5 Biodegradación de compuestos aromáticos.

Los compuestos aromáticos son susceptibles a la biodegradación en ambientes aerobios y anaerobios (Baker and Herson 1999; Vamsee-Krishna and Phale 2008). En el caso de los cultivos aerobios la biodegradación se inicia mediante la adición de oxígeno al anillo mediante mono o dioxigenasas, este es un paso previo a la ruptura del anillo, posteriormente el oxígeno también funcionará como aceptor final de electrones (Field et al. 1995). Sin embargo los sistemas aerobios, a pesar de ser efectivos en la degradación de compuestos derivados del petróleo se enfrentan a problemas como la poca concentración de oxígeno presente en el sistema debido a la respiración microbiana, aunado a esto la posibilidad de proporcionar oxígeno al sistema en las concentraciones necesarias es costoso (Wilson and Bouwer 1997).

Para los cultivos anaerobios el oxígeno molecular no estará presente en la biodegradación, como consecuencia de esto, algunos tipos de compuestos aromáticos son difíciles de degradar, principalmente los que carecen de grupos funcionales, por ejemplo el naftaleno y el benceno. Sin embargo compuestos aromáticos con grupos funcionales, por ejemplo los cloro-bencenos, son degradados con mejor desempeño en los sistemas anaerobios que los aerobios. Este hecho puede tener su explicación en que los sistemas anaerobios biodegradan mediante ataques nucleofílicos y muchos de los grupos funcionales presentes en los compuestos aromáticos son electrófilos (Field et al. 1995).

1.5.1 Factores que afectan los procesos de biodegradación de compuestos xenobióticos en condiciones anaerobias.

Existen algunos factores que afectan de forma significativa la biodegradación de compuestos xenobióticos en sistemas anóxicos y anaerobios. El primero de ellos es la adaptación o aclimatación; este factor es importante debido a que los compuestos xenobióticos son desperdicios o productos de la actividad humana, por lo que su existencia en el ambiente no es natural. Debido a esto los microorganismos deben de desarrollar rutas metabólicas para poder usar como fuente de energía o de carbono dichos compuestos químicos (Beristain-Cardoso et al. 2009). Sin embargo estos procesos pueden tomar meses o años (Watts 1997), por lo que es recomendable obtener microorganismos de lugares contaminados con los compuestos que se quieren degradar, lo cual podría darnos cierta seguridad en cuanto a la exposición de los mismos al contaminante (Baker and Herson 1999).

El segundo factor de importancia es la presencia de metales pesados; si bien existen microorganismos capaces de acumularlos, grandes cantidades de estos metales son tóxicas para los microorganismos (Baker and Herson 1999). Aunque metales como el cobre, zinc, mercurio,

cadmio y cromo pueden estar presentes en el ambiente, las concentraciones que pueden contener las aguas residuales industriales exceden por mucho las toleradas por ciertos microorganismos, lo que generaría una inhibición de la degradación de compuestos orgánicos contaminantes (Watts 1997).

Como tercer factor se encuentra las condiciones ambientales donde primeramente esta la temperatura pues las especies de bacterias capaces de usar aceptores de electrones diferentes al oxígeno tienen nichos ecológicos bien definidos por lo que variaciones en esta condición puede volver a los microorganismos inactivos, el pH también incide de formas drásticas pudiendo limitar la biodegradación o llevarla por rutas diferentes a la deseada (Baker and Herson 1999).

Entre los factores que pueden incidir sobre la biodegradación de los compuestos aromáticos se encuentran la biodisponibilidad, como en el caso de polímeros no hidrolizables contruidos con compuestos aromáticos (Baker and Herson 1999). Otro factor importante es la pobre solubilidad que presentan los compuestos xenobióticos debido a su naturaleza no polar, lo que hace que estos compuestos tengan una alta tendencia a adsorberse en la materia orgánica, en este caso lo recalcitrante de estos compuestos se debe más a una cuestión física que biológica (Baker and Herson 1999).

1.5.2 Biodegradación de compuestos monoaromáticos en anaerobiosis.

La biodegradación de compuestos monoaromáticos en condiciones anaerobias se ha comprobado para diferentes compuestos como el tolueno (Baker and Herson 1999; Field et al. 1995; Grbic-Galic and Vogel 1987), benzoato (Baker and Herson 1999; Beristain-Cardoso et al. 2009; Kleerebezem et al. 1999c; Schink et al. 2000), xileno (Beristain-Cardoso et al. 2009; Schink et al. 2000), por mencionar algunos. Sin embargo todos estos confluyen en un modelo central que corresponde al benzoato, de hecho se sabe que la biodegradación de compuestos monoaromáticos, entre ellos el ácido tereftálico, ocurren mediante cuatro rutas diferentes, la última de ellas recientemente descubierta en microorganismos desnitrificantes (Schink et al. 2000).

Las rutas por las que se degradan los compuestos monoaromáticos son: ruta del benzoil-CoA (Schink 1997), ruta del resorcinol (Schink et al. 2000), floroglucinol (Schink et al. 2000) y la ruta donde la hidroxiquinona es el metabolito central (Schink et al. 2000). El paso común de las cuatro rutas metabólicas es la desestabilización del anillo aromático vía reductiva, previo a un ataque oxidativo (Schink et al. 2000). La ruta del benzoil-CoA es la más importante pues muchos de los compuestos entran en ella como el fenol (Schink et al. 2000), hidroxibenzoatos (Schink et al. 2000), fenilacetatos (Schink et al. 2000), anilina, cresoles y algunos hidrocarburos relacionados con el tolueno (KEGG 2010).

En el caso del ácido tereftálico la biodegradación anaerobia se lleva a cabo por la ruta del benzoil-CoA (KEGG 2010), para usar este vía, primeramente el AT es degradado a 3-carboxi-cis,cis-muconato o a 4-carboxi-2-hidroximuconato semialdehído, en condiciones metanogénicas se forman intermediarios como el oxaloacetato, succinil-CoA, acetil-CoA y piruvato, los cuales serán consumidos en el ciclo de Krebs (KEGG 2010; Schink et al. 2000). En el caso de la degradación

anóxica de ácido tereftálico a través de la desnitrificación esta transcurre por β -oxidación. Para la degradación de ácido tereftálico mediante desnitrificación se ha propuesto la ruta de la Figura 2 (Nozawa and Maruyama 1988). La principal diferencia, además del aceptor de electrones, entre la degradación en condiciones metanogénicas y desnitrificantes radica en la inversión de energía. Los microorganismos metanogénicos pueden recuperar sólo un poco de energía en momentos posteriores a la ruptura del anillo, utilizan una reacción donde se introducen cuatro electrones y cuatro protones al anillo aromático llegando directamente al intermediario carboxiliciclohexeno, esta reacción es exergónica, obteniendo electrones en el NADPH sin necesidad de una inversión neta de ATP. En cambio las bacterias desnitrificantes consumen 4 moléculas de ATP antes de abrir el anillo, esta inversión de energía se recuperara mediante la oxidación de intermediarios como el acetato, sin embargo los microorganismos fermentadores como los metanogénicos sólo recuperaran la energía equivalente a tres moléculas de ATP (Schink et al. 2000), por lo que obviamente el sistema desnitrificante tendrá mayor energía disponible que el metanogénico.

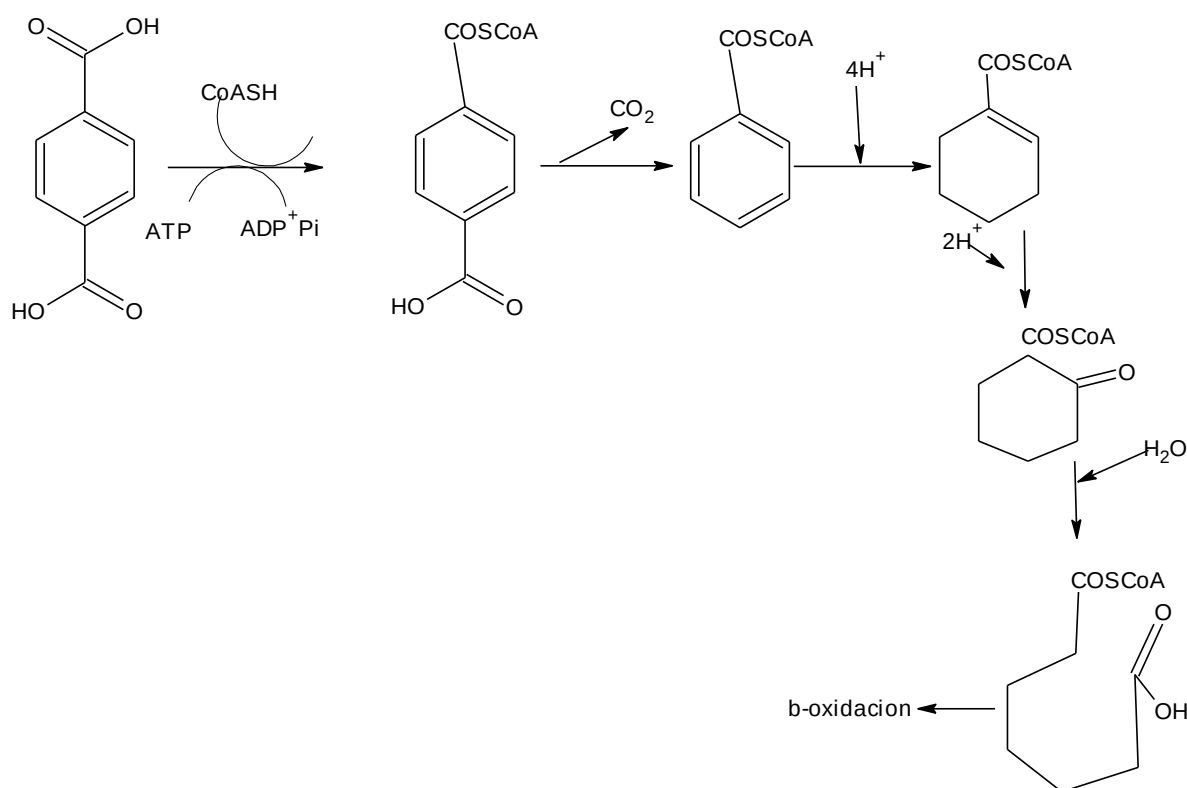


Figura 2. Biodegradación de ácido tereftálico en condiciones desnitrificantes adaptada de (Nozawa and Maruyama 1988)

1.6 Biodegradación de ácido tereftálico en condiciones de desnitrificación y metanogénesis

La degradación de ácido tereftálico en condiciones metanogénicas se ha reportado para diferentes concentraciones y en general con cultivos mixtos. El caso de cultivos puros sólo se ha reportado para el género *Pelotolomaculum* (Yan-Ling Qiu and al. 2006), en este caso los cultivos degradaron concentraciones de 2mM de tereftalato, isoftalato y orto-ftalato, en cultivos separados, donde los microorganismos que se adaptaron a cada uno de los isómeros solo pudieron crecer en este y en ninguno de los otros, a pesar de ser la misma especie bacteriana. Dichos cultivos pudieron usar como aceptores de electrones sulfato, sulfito, tiosulfato, nitrato, fumarato, Fe^{+3} y 4-hidroxibenzoato.

En el caso de los cultivos mixtos existe un trabajo muy extenso de Kleerebezem y colaboradores, que inicia con pruebas de la biodegradabilidad del ácido en botellas serológicas con una concentración de 2 mM (Kleerebezem et al. 1997) , observando la acumulación de acetato y benzoato, así como determinando que los organismos microorganismos metanogénicos acetoclásticos predominantes pertenecían al género *Methanosaeta*, mientras que en los microorganismos metanogénicos hidrogenotróficos predominaban los *Methanobacterium* (Kleerebezem et al. 1999b). Posteriormente en un reactor con un volumen de 1.5 L los microorganismos fueron capaces de degradar 0.5g de ácido tereftálico (Kleerebezem et al. 2005) . Por otro lado, se ha reportado la remoción de aproximadamente la misma concentración de ácido tereftálico con una eficiencia del 90% en condiciones metanogénicas (Fdz-Polanco et al. 1999).

En la degradación de ácidos ftálicos en condiciones desnitrificantes se ha reportado la degradación de 10 μmoles de ácido tereftálico con 50 μmoles de nitrato (Aftring et al. 1981) y la degradación de dimetiltereftalato (DMP) con una velocidad de degradación específica de 0.32 mM/g VSS h usando 8 mM de nitrato (Liang et al. 2007). El uso del nitrato como aceptor final de electrones en lugar del oxígeno tiene como ventajas la promoción de la biorremediación de hidrocarburos aromáticos, además a diferencia del oxígeno el nitrato es muy soluble, lo cual provee una homogénea dispersión, evitando la limitación del proceso relacionada con un ineficiente mezclado (Baker and Herson 1999).

En la Tabla 5 se muestran algunos de los trabajos que han realizado la degradación de AT en reactores anaerobios.

Tabla 5. Uso de reactores para el tratamiento de aguas residuales de la producción de ácido tereftálico.

Tipo de reactor.	Algunas condiciones de operación.	Referencia.
UASB	Volumen -1 l [Sólidos] 40 g SSV/l. [contaminante] 26280 mg DQO/l. tratamiento de agua industrial real	(Fdz-Polanco et al. 1999)
UASB	Volumen-2.5 l [Sólidos] 28 g SSV/l HRT-24 h. [contaminante] Alimentado con 1450 mg DQO/l de los cuales 720 mg DQO corresponden a ácido tereftálico	(Kleerebezem et al. 1997)
UASB	Proceso en dos fases. Primer reactor 3.8 l a 37°C, con pH 7, recirculación de 15 l/h g DQO de AT/l segunda fase tres reactores en paralelo con 0.95 l HRT- 2.2 a 5.3 horas	(Kleerebezem et al. 2005)
UASB	Volumen-3 l [contaminante] 9500 mg DQO/l agua industrial Actividad específica. 0.186 Kg DQO/Kg vss d	(Macarie et al. 1992)

En estos reportes se usaron inóculos anaerobios granulares, los cuales tenían orígenes variados, en el caso de Kleerebezem y col. usaron un inóculo anaerobio de un UASB que ya trataba aguas residuales que contenían fenol y xileno como principales contaminantes, el inóculo que usa en sus investigaciones se obtuvo originalmente de un digestor de estiércol, posteriormente fue adaptado a contaminantes aromáticos como el xileno y el fenol (Kleerebezem et al. 1999a; Kleerebezem et al. 1997). Kleerebezem y su grupo de investigación han trabajado con dicho inóculo degradando el ácido tereftálico por cerca de cinco años, por lo que en su reporte sobre la degradación de AT con un reactor anaerobio alcanzan la velocidad de remoción de 10 g/lh (Kleerebezem et al. 2005).

De los trabajos presentes en la Tabla 5 solo el de Macarie y col. (1992) utilizó un inóculo aerobio como semilla del tratamiento anaerobio de las aguas residuales del ácido tereftálico, en dicha investigación se degradó 36.5 mg de AT/lh (Macarie et al. 1992).

2. Justificación.

El ácido tereftálico es uno de los contaminantes de mayor distribución y amplia persistencia en el medio ambiente. Su uso en distintos productos continúa en aumento, por lo que su descarga al ambiente seguirá la misma tendencia en los próximos años. Desafortunadamente, la legislación ambiental en nuestro país no señala los tratamientos y regulaciones de contaminantes peligrosos como este monoaromático. Estudios de científicos mexicanos han demostrado que en diferentes cuerpos de agua, que son receptores de descargas de aguas industriales contienen compuestos químicos tóxicos como, el ácido tereftálico, a pesar de cumplir con los niveles de normatividad de SEMARNAT en cuestiones como DQO y pH. Por todos estos motivos en nuestro país es de gran importancia desarrollar tecnologías de biodegradación de ácido tereftálico con el fin de proteger el medio ambiente, la salud de la población y que además sean tecnologías sustentables mediante la obtención de energía a partir de fuentes renovables, por lo que los sistemas de tratamiento anaerobio aparecen como una excelente opción pues tienen la capacidad de producir metano como un compuesto final útil, consumir pocos nutrientes extras y generar cantidades pequeñas de lodos biológicos al final del proceso, siendo de esta forma un proceso amigable con el ambiente.

3. Objetivos.

Establecer cultivos anaerobios capaces de degradar ácido tereftálico, a partir de un inóculo proveniente de una planta de tratamiento de aguas residuales.

Evaluar la degradación del ácido tereftálico en condiciones de desnitrificación.

Evaluar la degradación del ácido tereftálico en condiciones metanogénicas.

Arrancar un reactor anaerobio para el tratamiento de aguas residuales que contienen ácido tereftálico.

4. Metodología.

4.1 Recolección de inóculo.

El inóculo usado en esta investigación fue obtenido de la planta de tratamiento de aguas residuales de Cerro de la Estrella, Iztapalapa, Distrito Federal, México. Es de suma importancia mencionar que el inóculo obtenido no se encontraba en condiciones anaerobias, de hecho el proceso en el que se usaba era una laguna aireada por difusión. El inóculo fue transportado a las instalaciones de UPIBI a temperatura ambiente y así se le mantuvo hasta su uso. El agua residual con la que se obtuvo el inóculo fue desechada y remplazada por agua corriente, para disminuir la carga de posibles fuentes de carbono presentes en la muestra. El inóculo fue caracterizado mediante la determinación de sólidos totales (método 2540.B), sólidos disueltos totales (método 2540.B) y sólidos suspendidos volátiles (método 2540.E), de acuerdo con (APHA 1999).

La densidad del lodo se determinó colocando 15 ml de la muestra de la planta de tratamiento de aguas residuales en una probeta de vidrio llevada previamente a peso constante. Se permitió que el lodo presente en la muestra sedimentara libremente, posteriormente se decantó el sobrenadante y se determinó el volumen de lodo obtenido, y por diferencias de peso la cantidad en gramos del mismo.

4.2 Químicos.

En este apartado se muestran los químicos usados para las pruebas de electroforesis capilar y HPLC, las cuales se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Químicos usados en las pruebas analíticas.

Químico	Prueba en la que se uso
Ácido tereftálico (Fluka, pureza >99%, U.S.A.)	Electroforesis capilar y cultivos.
acetato (1000 ppm, Sigma Aldrich, U.S.A.)	HPLC
β -ciclodextrina (98% pureza, Sigma Aldrich, U.S.A.)	Electroforesis capilar
α -ciclodextrina (Sigma Aldrich, 98% pureza, 10% agua, U.S.A.)	Electroforesis capilar
polietilenglicol-800 (Sigma Aldrich, U.S.A)	Electroforesis capilar

4.3 Aclimatación a condiciones anaerobias.

Condiciones metanogénicas.

La adaptación a condiciones metanogénicas se realizó en botellas serológicas de 126 ml de volumen total, sellados con septas de hule y anillos de aluminio. Se emplearon seis botellas para este cultivo. Las botellas serológicas se llenaron con un volumen total de 100 ml, el cual estuvo compuesto por 45 ml de medio de cultivo (Tabla 8), 1 ml de una solución de metales descrita en la (Tabla 9), 20 ml del inóculo, 20 ml de bicarbonato de sodio 5 g/l, 10 ml de agua y 4 ml de una

solución de metanol 125 mM, como única fuente de carbono usada con la finalidad de favorecer bacterias metanogénicas (Lowe et al. 1993; Thauer 1998), sobre otros grupos bacterianos que pudieran estar presentes en el inóculo. En caso de ser necesario el pH se llevó a 7 unidades con ayuda de hidróxido de sodio 0.1 N. Posteriormente las botellas se sellaron y se gasearon durante cinco minutos con nitrógeno para desplazar la atmósfera oxidante del sistema.

Condiciones desnitrificantes.

La adaptación a condiciones desnitrificantes se realizó en botellas serológicas de 126 ml de volumen total, sellados con septas de hule y anillos de aluminio. Se emplearon seis botellas para este cultivo. Las botellas serológicas se llenaron con un volumen total de 100 ml, el cual estuvo compuesto por 45 ml de medio de cultivo (Tabla 8), 1 ml de una solución de metales descrita en la (Tabla 9), 20 ml del inóculo, 20 ml de bicarbonato de sodio 5 g/l, 9 ml de agua, 1 ml de una solución de nitrato de potasio 525 mM y 4 ml de una solución de metanol 125 mM. En caso de ser necesario el pH se llevó a 7 unidades con ayuda de hidróxido de sodio 0.1 N. Posteriormente las botellas se sellaron y se gasearon durante cinco minutos con nitrógeno para desplazar la atmósfera oxidada del sistema.

Para la aclimatación a condiciones anaerobias solo se proporciono metanol, esto en un inicio de la experimentación, posteriormente también se adiciono acetato en mezcla con metanol, esta fase experimental se describe con más detalle en el apartado que sigue.

4.4 Experimentos de microcosmos.

Posteriormente, las botellas usadas para la adaptación de microorganismos se colocaron en una incubadora orbital con una temperatura de 37 °C y una agitación de 150 rpm. Al inicio de la experimentación las botellas eran alimentadas con 4ml de una solución de metanol 125 mM, dos veces por semana. Después de 8 semanas la alimentación se cambió por una mezcla de metanol/acetato (5mM/3mM) hasta la producción de biogás, la cual se tomó como la señal de inicio de la anaerobiosis. Cuando se logró adaptar el inóculo a condiciones anaerobias se iniciaron alimentaciones con 1 mM de metanol y 1 mM de AT, la concentración de metanol se fue disminuyendo 0.3 mM en cada alimentación hasta eliminar el metanol de la alimentación, la de AT se aumento 0.5 mM en cada alimentación hasta llegar a los 3mM; cada una de estas alimentaciones se realizó cada semana. Posteriormente se determinó la biodegradación de AT con electroforesis capilar y la acumulación de ácidos orgánicos producto de la degradación mediante cromatografía de líquidos (HPLC). En estos cultivos también fue posible determinar la factibilidad de la biodegradación anaerobia del ácido tereftálico, mediante el método reportado por (Battersby and Wilson 1989; Shelton and Tiedje 1984).

4.5 Reactores para pre-inoculación del reactor.

Posteriormente dos matraces kitazato (reactor de pre-inóculo) de un litro fueron adaptados para cultivar el consorcio bacteriano y prepararlo para el reactor.

Los reactores de pre-inóculo metanogénico se inundaron completamente con medio de cultivo para favorecer las condiciones anaerobias. Cada reactor de pre-inoculación contenía 600 ml de

medio de cultivo, 35 ml de inóculo, 165 ml de bicarbonato de sodio 5 g/l, 198 ml de agua, 2 ml de solución de metales y 40 ml de metanol. Se montaron dos reactores de pre-inóculo, ambos reactores de pre-inoculación contenían una concentración de sólidos volátiles de 0.635 gSSV.

4.6 Montaje y experimentos en el reactor.

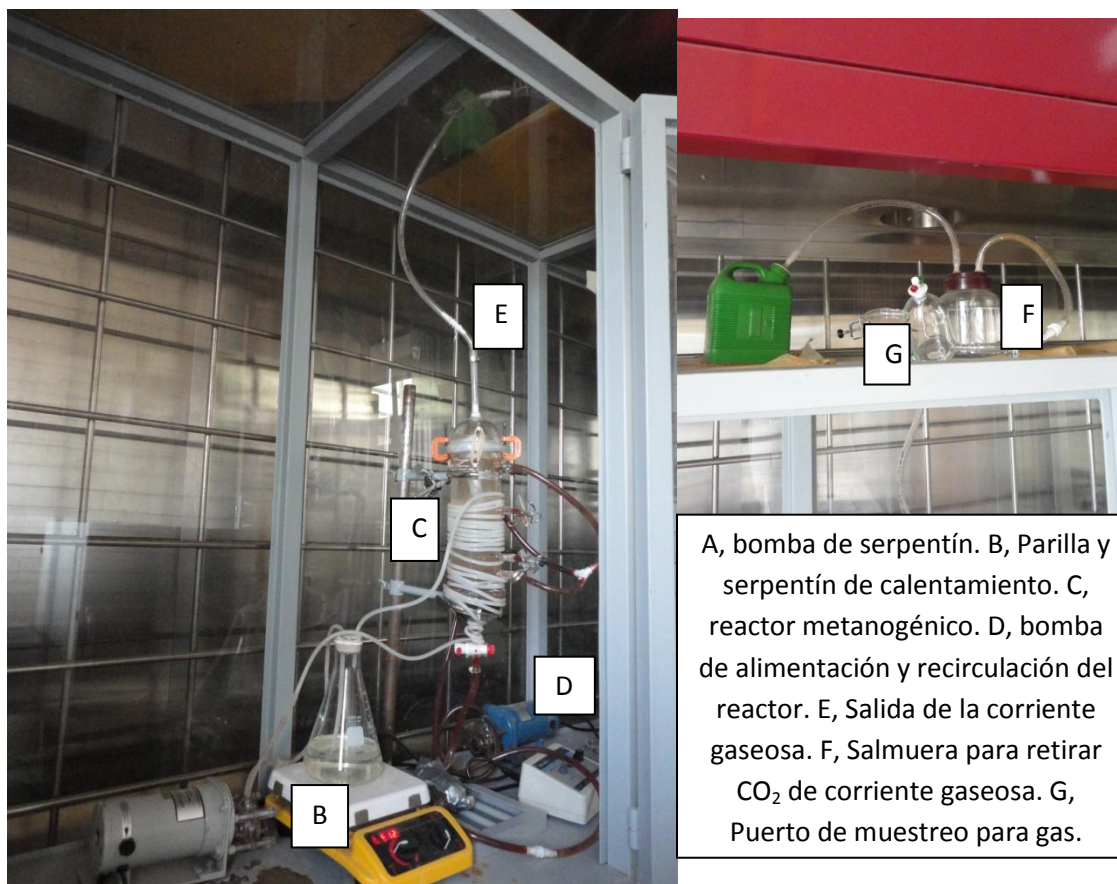


Figura 3. Reactor metanogénico usado en la presente investigación.

Se montó el reactor metanogénico como se ve en la Figura 3, dentro de una cámara de acrílico, el reactor se conectó a una bomba 2-200 rpm (Perkin Elmer, USA) con una manguera de tygon calibre 18 (Saint-Gobain, USA), con la cual se alimentaría y se mantendría en recirculación el reactor. El reactor fue sellado con silicón para vidrio. La salida del embudo para coleccionar gas se conectó a una manguera del mismo calibre que la usada en la bomba, dicha manguera se conectó a un punto de muestreo que consistía en una botella serológica que contenía dos boquillas por donde se conectaba mangueras, con pinzas mohr cuya función era impedir el intercambio gaseoso con el exterior. En la boca principal de la botella se colocó una válvula mininert, después de este punto de muestreo el gas era burbujeado a un recipiente que contenía una solución de hidróxido de sodio 3% donde el dióxido de carbono se disolvería. El resto del gas, compuesto por metano

desplazaría esta solución que se recolectaría en otro frasco anexo al de la solución de hidróxido de sodio. Debido a que no se contaba con un área de temperatura controlada se utilizó un serpentín de calentamiento externo al reactor, para llevarlo a una temperatura de 37°C. El serpentín funcionaba con una manguera de silicón calibre 16 por la que circulaba agua a 85°C, calentada constantemente con una parrilla con un flujo de 15ml/min. La temperatura alcanzada en el interior del reactor fue de 36.5 °C ± 1 °C. Otras características del reactor se detallan en la Tabla 7.

Tabla 7. Características del reactor metanogénico.

Propiedad	Valor numérico.
Longitud (m)	0.24
Diámetro (m)	0.09
Área (m ²)	63.62 x 10 ⁻³
Volumen (m ³)	2.094 x 10 ⁻³
L/D	2.66
Velocidad superficial correspondiente al THR1 (m/h)	9.36 x 10 ⁻³
Velocidad superficial correspondiente al THR2 (m/h)	1.71 x 10 ⁻²

El reactor se operó en las condiciones de los microcosmos metanogénicos, a excepción de la agitación. Se usaron dos tiempos de retención hidráulica, los cuales se presentan en la Tabla 7. El primero de ellos no fue el más adecuado, primeramente por que la biomasa era lavada un poco del reactor, el flujo era demasiado alto y arrastraba algunos flóculos hacia las mangueras, por tal motivo se uso el THR mas grande, con un flujo más pequeño. Sin embargo con el primer tiempo de retención hidráulico se realizó la primera alimentación del sistema con una concentración de 600 mg/l de AT, el primer tiempo de retención hidráulica fue de 7.35 minutos, con un flujo de 285 ml/min.

Tabla 8. Tiempos de retención hidráulica usados en el reactor.

Volumen reactor(ml)	Velocidad bomba	de flujo (ml/min)	TRH (min)
1845	1	156	13.43
1845	2	285	7.35

El reactor metanogénico fue inoculado con ambos reactores de pre-inóculo metanogénico, alcanzando una concentración de 1.35 gSSV, aproximadamente 35 g de inóculo húmedo, vertiendo este en el reactor y completando el volumen (1.8L) con medio de cultivo fresco y dos mililitros más de solución de metales, la composición del medio de cultivo basal y de la solución de metales usada se muestra en la Tabla 8 y Tabla 9 respectivamente, ambas soluciones fueron usados tanto en los experimentos de adaptación, los experimentos de microcosmos y también en el reactor metanogénico.

Tabla 9. Composición del medio basal.

Compuesto	Concentración g/l
NH ₄ NO ₃	0.25
KH ₂ PO ₄	0.1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05
NaCl	0.05

Tabla 10. Solución de Metales traza que se adiciona al medio basal.

Compuesto	Concentración g/100 ml
NaHCO ₃	1.73
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.0736
K ₂ HPO ₄	0.0429
KH ₂ PO ₄	0.0171
CaCl ₂	0.0225
NiSO ₄ ·7H ₂ O	0.0092
CoCl ₂ ·2H ₂ O	0.001
(NH ₄)MoO ₄ ·4H ₂ O	0.007
Resarzurina	0.02

4.7 Métodos analíticos.

4.7.1 Cuantificación de nitrato.

La cuantificación de nitrato se llevó a cabo por el método ultravioleta selectivo. El medio de cultivo se filtró con un filtro de 0.22 µm. Se midió la absorbancia a 220 nm y posteriormente a 275 nm. Es importante que la absorbancia leída a los 275nm no sea mayor al 20% de la absorbancia leída a los 220 nm de ser así el método no es aplicable para el tipo de muestra con el que se trabaja. La ley de Lambert-Beer se cumple hasta los 11 µg/l de nitrato presente en la muestra. La absorbancia real en estas mediciones se obtiene de la siguiente forma.

$$Abs_{real} = Abs_{220nm} - (2 * Abs_{275nm})$$

4.7.2 Cuantificación de ácido tereftálico

El ácido tereftálico se cuantificó por electroforesis capilar (Beckman Coulter). Se usó un buffer de fosfatos 10 mM adicionado con α-ciclodextrina, β-ciclodextrina y PEG-8000, a pH 11, la composición del buffer para 25 ml se muestra en la Tabla 10. Se utilizó un capilar de silica de 65 cm de longitud. Todas las muestras inyectadas en el equipo se filtraron con membranas de nitrocelulosa con un poro de 0.22 µm. El límite de detección de nuestro método fue de 800 µg/l del ácido tereftálico. Previo al uso del capilar este fue lavado con hidróxido de sodio 0.1 N durante 5 min, posteriormente se corrió agua por el mismo tiempo y después buffer de separación (Tabla 10) durante 15 min. Después de este tratamiento las muestras fueron procesadas y entre cada una de ellas se lavó el capilar con buffer de separación durante 2 minutos, el programa de separación usado en el proceso consistió en una inyección de 3 segundos, una posterior espera de 10

segundos, luego se inició la separación por 20 minutos con un voltaje de 25 kV. La adquisición de datos se realizó a 215 nm.

Tabla 11. Composición del buffer para cuantificar ácido tereftálico por electroforesis capilar.

Compuesto	Concentración g/25 ml
Fosfato de potasio	0.0445g
α - ciclodextrina	0.0975g
β - ciclodextrina	0.229g
PEG-8000	0.125g

4.7.3 Cuantificación de acetato y otros ácidos orgánicos.

La cuantificación de estos compuestos se realizó con un equipo de HPLC (Varian), se filtraron 2 ml de muestra a través de membranas de 0.22 μ m de nitrocelulosa, las muestras filtradas fueron separadas en una columna Aminex HPX-87H (300mm x 7.8mm) de exclusión de iones. Las lecturas se realizaron a 210 nm. La fase móvil fue ácido sulfúrico al 0.008 N con un flujo de 0.6 ml/min.

4.7.4 Determinación de la demanda química de oxígeno (DQO).

La determinación de la DQO, se realizó de acuerdo al método semi-micro reportado en el Métodos normalizados para el análisis de agua.(APHA 1999)

4.7.5 Determinación de la actividad metanogénica acetoclástica.

Esta actividad se determinó alimentando el sistema una concentración de acetato de 2 g DQO/l, inmediatamente después de la alimentación el sistema se equilibró a presión atmosférica, mediante la punción del septo con una aguja conectada a una manguera que se sumergía en agua. La producción de metano se midió por desplazamiento de una solución de hidróxido de sodio 3% que se encontraba en una botella sellada, llena al máximo con dicha solución y equilibrada a presión atmosférica. Las mediciones se realizaron cada hora durante 10 horas, la velocidad de producción de metano se obtuvo como la pendiente de la grafica de ml de gas vs tiempo, la velocidad metanogénica acetoclástica se determinó como g DQO-CH₄/g SSV*hora (Gonzales 2007). Usando dicha solución de hidróxido de sodio es posible que la mayoría del dióxido de carbono del biogás sea eliminado y el desplazamiento de volumen solo se deba al metano.

4.7.6 Análisis de la composición de la fase gaseosa y del biogás producido.

Este análisis se realizó por cromatografía de gases con un equipo Autosystem de Perkin Elmer, con una columna empacada Altek de 12 ft, diámetro interior de 0.085 in y un diámetro exterior de 1/8 in. Se uso helio como gas acarreador al 5.5% con un flujo de 30 ml/min. La temperatura inicial del horno fue de 80 °C alcanzando una temperatura final de 110 °C, con una rampa de 10 °C/min. La temperatura del inyector fue de 70 °C. La determinación tomó un tiempo total de 3 minutos con un detector TCD a 200 °C.

5. Resultados y Discusión.

5.1 Características del inóculo y su preparación para incubarse en condiciones anaerobias.

Las características fisicoquímicas del lodo empleado como inóculo para la presente investigación se determinaron de acuerdo a lo descrito en la sección 4.1. Los resultados obtenidos son promedios de duplicados de una muestra de 2.17 ± 0.25 g, arrojando que la cantidad de SSV es de 0.009 ± 0.003 g SSV/g de muestra húmeda. Los sólidos totales presentes en la muestra fueron de 0.1 ± 0.07 g, lo cual muestra que la mayor parte de la muestra es agua, representando el 94% de la muestra procesada. La cantidad de sólidos suspendidos volátiles fue demasiado pequeña, sólo 0.004 g SSV/g muestra húmeda, la cual es cuatro veces más pequeña que la concentración reportada por Kleerebezem y col (1999). Por otro lado, la densidad del lodo fue de 1.35 g/ml a una temperatura de 20°C la cual es consistente con otros estudios en donde se ha reportado que la densidad de lodos aerobios es sumamente baja, incluso menor que la del agua (Wu et al. 1987). El hecho de que la cantidad de SSV presente en el inóculo fuera pequeña implicó inocular las botellas serológicas de adaptación a anaerobiosis con una concentración menor de lodos, la cual aproximadamente fue de 0.243 g SSV en lugar de 10 g SSV en 100 ml.

Como se indicó en la metodología, el inóculo con el que se trabajó era usado en el tratamiento de aguas mediante lagunas aireadas por difusión, por lo tanto el proceso de adaptación del inóculo a las condiciones de anaerobiosis se llevó un tiempo de tres a cuatro meses siendo la desnitrificación el proceso de aclimatación más rápido, con una diferencia de 2 semanas en comparación con el sistema metanogénico. Se tomó como indicativo del inicio de la anaerobiosis la producción de biogás. Inicialmente, las botellas serológicas utilizadas para la aclimatación a anaerobiosis se colocaron a 37°C y 150 rpm, sin alimentación alguna, esperando que las bacterias presentes en el inóculo produjeran biogás, sin embargo después de 2 semanas no hubo una respuesta positiva. Para alcanzar el objetivo de la adaptación se inició la alimentación con metanol (para favorecer el crecimiento de las arqueas metanogénicas). La alimentación fue de 5 mM de metanol cada cuatro días. Después de 8 semanas de esta alimentación se comenzó a alimentar con una mezcla de metanol y ácido acético, 5 mM y 3 mM, respectivamente. A las 13 semanas de cultivo se comenzaron a producir los primeros mililitros de biogás en los cultivos. Es importante mencionar que el comportamiento observado corresponde con la bibliografía; donde existe un aceptor de electrones externo, en este caso nitrato, la producción de metano y dióxido de carbono es menor que en los sistemas donde no se añade un aceptor de electrones extra, en este caso metanogénesis (Maier 2000; Watts 1997).

Es importante desglosar un poco el hecho de que utilizar un lodo aerobio es una excelente opción para instaurar un sistema anaerobio.

El uso de lodos activos aerobios como semillas para sistemas anaerobios es una opción factible, para obtener inóculos anaerobios, cuando no se tienen inóculos de digestores, de hecho se ha demostrado que en todos los lodos activados comunes existen arqueas metanogénicas acetoclásticas e hidrogenotróficas, así como bacterias oxidantes de lactato y propionato sulfatoredutoras, están presentes en los lodos activados de plantas aerobias excepto en los casos

donde se le aérea con oxígeno puro (Kim and Speece 2002). De hecho hay evidencias de que los lodos activados de una planta de tratamiento aerobio común pueden contener dentro de los flóculos presentes en estos lodos existen zonas de anaerobiosis donde bacterias metanogénicas pueden desarrollarse, de hecho se han cuantificado arqueas metanogénicas en el orden de 10^8 g/SS presentes en lodos aerobios (Wu et al. 1987).

Comúnmente la mejor forma de obtener un inóculo anaerobio para el tratamiento de aguas residuales es usar un lodo usado en algún reactor anaerobio, ya establecido, que trate aguas similares. Sin embargo cuando no se cuenta con esta fuente es posible utilizar, e incluso obtener buenos rendimientos de biodegradación, un inóculo aerobio adaptado a anaerobiosis (Macarie et al. 1992), incluso existen reportes donde la producción de metano es mayor en un inóculo cuya semilla era un cultivo aerobio que un inóculo que se obtuvo de un digestor anaerobio mesofílico. Incluso el inóculo inicialmente aerobio produjo biogás a los 5 días de incubación, mientras que el inóculo del digestor tardó 20 días (Kim and Speece 2002). Sin embargo una de las desventajas que se presentan al usar un inóculo de este tipo es el tiempo de adaptación y por lo tanto de arranque del tratamiento anaerobio. En promedio este proceso de adaptación puede tardar entre un mes o dos meses (Ejlertsson et al. 1996b; Macarie et al. 1992; Wu et al. 1987). En contraste con el inóculo de la presente investigación son tiempos más pequeños, esto podría implicar que la cantidad de flóculos en el inóculo semilla original fue muy pequeño, por lo que la cantidad de núcleos anaerobios presentes inicialmente era demasiado pequeño, alargando los tiempos de adaptación a la anaerobiosis.

Para la adaptación de inóculos aerobios a la anaerobiosis es importante tener presentes algunas consideraciones. Los lodos activados aerobios y frescos siempre son inestables y tienen una baja densidad, por lo que es necesario incubarlos al menos por un mes después de haberlos inducido a anaerobiosis, para estabilizarlos, volverlo más denso e incrementar su actividad metanogénica (Wu et al. 1987).

En la presente investigación el inóculo usado fue de una laguna aireada con aire lo cual, como ya se comentó, presenta la posibilidad de que existan microorganismo anaerobios en el mismo inóculo. Además la planta de tratamiento del que se obtuvo se encuentra en una zona densamente poblada y rodeada de zonas industriales, por lo que la posibilidad de haber estado en contacto con contaminantes aromáticos era muy alta.

En un intento por distinguir la morfología de los cultivos se realizaron tinciones de Gram para cada uno de los sistemas, para el desnitrificante y para el metanogénico. Encontrando diferencias cualitativas en la cantidad de microorganismos Gram positivos. En el caso de la desnitrificación se encontró aparentemente una mayor cantidad de Gram positivos (aproximadamente 15 zonas donde hay posibilidad de encontrar UFC coloreadas), que en el caso del sistema metanogénico (aproximadamente 4 zonas donde hay posibilidad de encontrar UFC coloreadas). La Figura 5 muestra las tinciones de Gram para ambos sistemas.

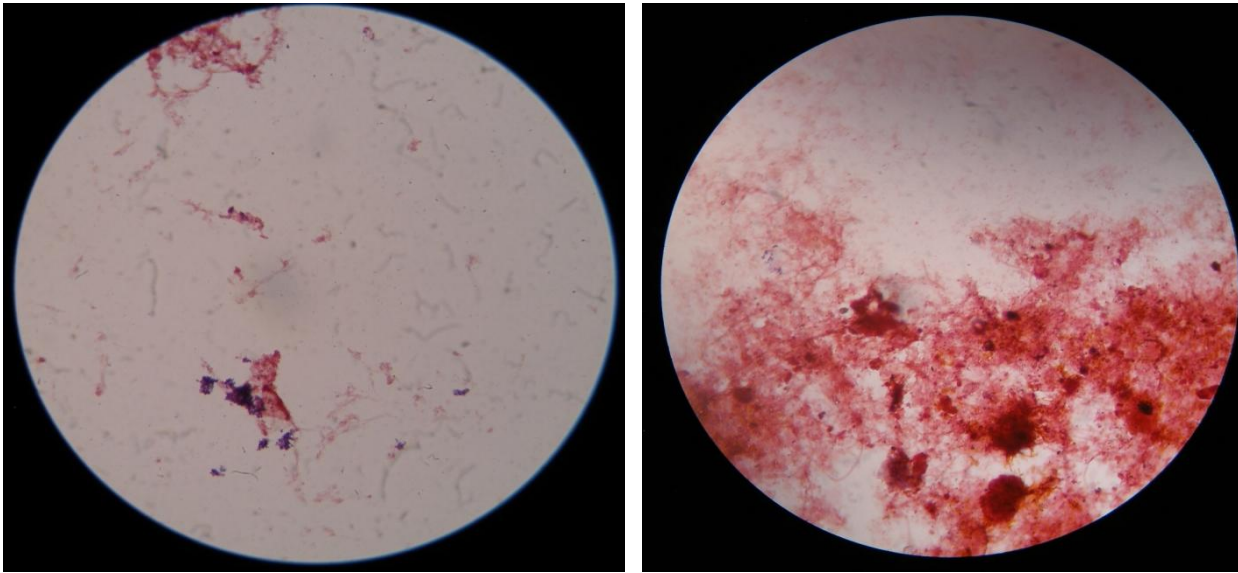


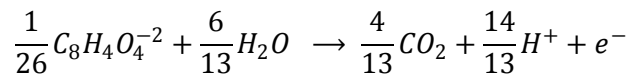
Figura 4. Tinciones de Gram para los cultivos desnitrificante (izquierda) y metanogénico (derecha).

5.2 Balances estequiométricos de la biodegradación de ácido tereftálico en desnitrificación y metanogénesis

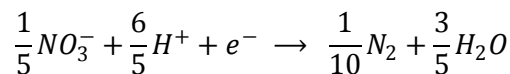
Se plantearon los balances estequiométricos de acuerdo a semireacciones de oxido-reducción (E. Rittmann and McCarty 2001), considerando como fuente de nitrógeno al amonio, única fuente de carbono al ácido tereftálico (donador de electrones), en su forma iónica como tereftalato. Para la desnitrificación se consideró al nitrato como aceptor de electrones, para la metanogénesis se consideró como aceptor de electrones al dióxido de carbono. Los balances estequiométricos permiten conocer el máximo teórico de biogás (como CO_2 o como mezcla de CO_2 y CH_4) que se puede producir durante la biodegradación, así como una idea de la distribución de AT en los diferentes productos en el sistema.

Primero se muestran los balances para la desnitrificación.

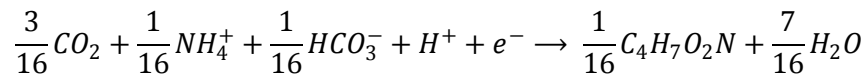
- Reacción del donador de electrones (ácido tereftálico en forma de tereftalato)



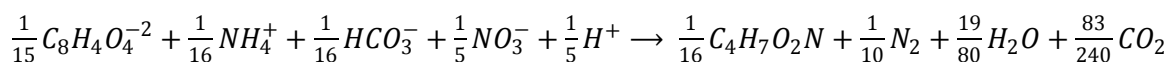
- Reacción del aceptor de electrones (ión nitrato)



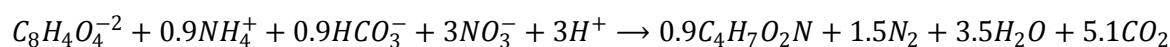
- Reacción de síntesis celular



- Reacción global en el sistema desnitrificante.

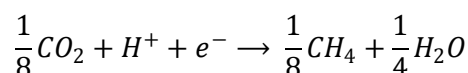


- Reacción global en moles (referenciada a AT) en el sistema desnitrificante.

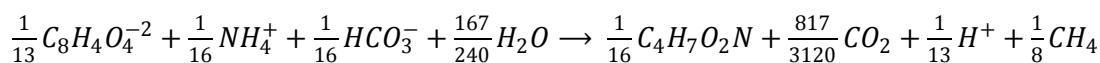


Los balances para el sistema metanogénico se plantearon de la siguiente manera, la reacción del donador de electrones es la misma que en el sistema desnitrificante, por lo que se omitirá su escritura.

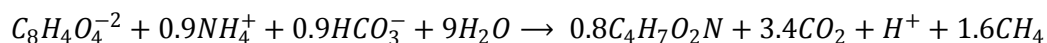
- Reacción aceptor de electrones (considerando al dióxido de carbono como aceptor)



- Reacción global en el sistema metanogénico.



- Reacción global en moles (referenciada al AT) en el sistema metanogénico.



En los balances estequiométricos se puede observar que, en condiciones desnitrificantes, son necesarias tres moles del ión nitrato para consumir un mol de ácido tereftálico, es decir, por cada gramo de ácido tereftálico consumido se consumirán 1.12 g del ión NO_3^- . Para el caso de la metanogénesis cada mol de ácido tereftálico producirá 1.6 moles de metano y 3.4 moles de dióxido de carbono, cuyos volúmenes dependerán de la temperatura y presión.

5.3 Comprobación de la biodegradabilidad del ácido tereftálico en anaerobiosis

La anaerobiosis tiene como una de sus características más representativas la producción de biogás producto de la biodegradación de los compuestos presentes en el cultivo, por lo tanto la cantidad producida de biogás en el sistema puede ser un indicativo de la capacidad del cultivo para consumir un contaminante como única fuente de carbono, esta es la propuesta que podemos encontrar en (Battersby and Wilson 1989; Shelton and Tiedje 1984). Primeramente es necesario calcular el volumen de biogás que se producirá, el cual será el máximo teórico, este máximo teórico fue comparado con la producción real, para la cual se colocaron cultivos alimentados con una concentración definida de carbono. A la par de este cultivo y con las mismas condiciones de incubación (150 rpm, 37°C, 0.0962 mg C/ml, atmósfera sustituida con N_2) se colocaron controles estériles, para evaluar la producción de biogás abiótica. Una vez en incubación se monitoreó la producción de biogás durante 2 semanas, realizando mediciones cada dos días. De acuerdo con la cantidad de biogás producido puede expresarse como porcentaje en referencia con el máximo teórico de biogás que se podría obtener de ese compuesto. Si se produce 80% o más del volumen

de gas teórico se considera como una mineralización completa del compuesto, una producción menor del 30% corresponderá a un compuesto persistente en el sistema, cuando no se produce gas en el sistema el compuesto químico es inhibitorio para el sistema (Battersby and Wilson 1989). Primeramente se debe de calcular el máximo teórico de biogás en condiciones estándar, dicho valor se obtiene usando la ecuación de los gases ideales, tomando en cuenta la concentración de carbono presente en el sistema, y haciendo la consideración de que toda esta concentración pasará a la fase gaseosa, en una mezcla de metano y dióxido de carbono cuya proporción no es de importancia para este primer experimento. En la presente investigación este experimento se realizó con una concentración de 1mM de ácido tereftálico en un volumen de 100ml, lo cual equivale a 9.62 mg de carbono en el sistema, los que pasarán a la fase gaseosa, esta cantidad de carbono generará 18 ml de biogás en un caso teórico ideal, cálculo realizado con la ley de los gases ideales.

Este experimento se realizó por triplicado en cada uno de los sistemas, desnitrificante y metanogénico, los promedios de la producción de gas se presentan en la Figura 5. En el caso de la metanogénesis se produjeron 17.67 ml de gas lo que equivale a 98% del gas teórico, para la desnitrificación se produjeron 15.33 ml de gas lo que equivale a 85%.

Estos resultados indicarían que el sistema metanogénico tiene una mayor capacidad de biodegradación que el sistema desnitrificante, sin embargo esta afirmación no es necesariamente cierta puesto que la producción de biogás es propia de la metanogénesis. Dicho proceso biológico se encuentra al final de la torre de potencial, incluso necesitando la inversión de energía para que pueda llevarse a cabo (Beristain-Cardoso et al. 2009; Maier 2000), por lo que la presencia de cualquier otro aceptor de electrones diferente al dióxido de carbono, en este caso el nitrato, disminuiría la producción de biogás en el sistema, desplazando la producción de metano, dióxido de carbono y sulfuro de hidrógeno, si es que ambos fenómenos acontecen en el sistema. Además haciendo referencia a la desnitrificación esta es un proceso donde la mayor parte del biogás producido es dióxido de carbono (Banihani et al. 2009) el cual es soluble en agua, provocando una disminución en el volumen total de gas producido (Battersby and Wilson 1989).

Además de esto la desnitrificación puede acumular el ión nitrito el cual es sumamente tóxico, disminuyendo la población microbiana y por ende la producción de biogás (Lowe et al. 1993; Tugtas 2007). En cuanto a la prueba de biodegradabilidad ambos sistemas son capaces de biodegradar completamente el ácido tereftálico, comparado con otros autores, la proporción de biodegradabilidad parece ser aceptable, ya que (Battersby and Wilson 1989) reporta una producción de biogás referida al máximo teórico de 100%, mientras que (Shelton and Tiedje 1984) reportan haber probado diferentes inóculos que arrojan la producción de biogás referida al máximo teórico en un intervalo que va desde el 73% al 100%.

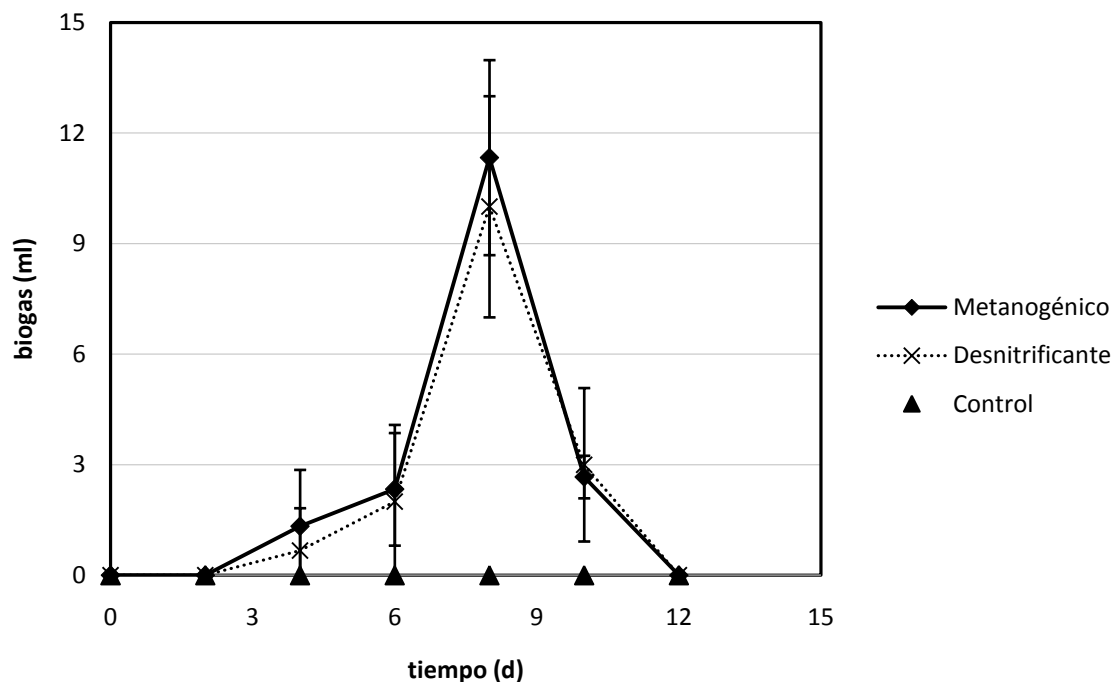


Figura 5. Evidencia de la biodegradación del ácido tereftálico mediante la producción de biogás a lo largo del tiempo.

5.4 Comportamiento de los microcosmos de adaptación del sistema desnitrificante.

Si bien la biodegradabilidad en ambos sistemas se había evidenciado con los métodos propuestos anteriormente (Battersby and Wilson 1989; Shelton and Tiedje 1984) era necesario comprobar la biodegradación del AT en el seno del líquido, para este fin se analizaron las muestras con ayuda de la electroforesis capilar encontrándose que 249 mg/l (1.5mM) de AT son degradados en aproximadamente 96 horas, aproximadamente 2.6 mg/lh, Figura 7.

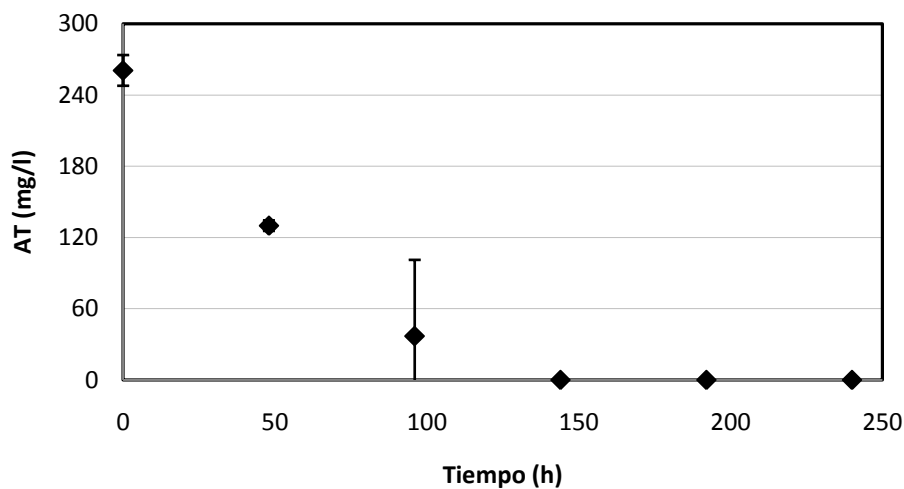


Figura 6. Consumo de 1.5mM de AT en sistema desnitrificante.

El consumo de AT coincide en tiempos con el trabajo de (Jianlong et al. 1999) donde el dibutilftalato se consume en 100 horas. En la presente investigación también se midió la presencia de ácidos orgánicos como intermediarios o remanentes de la degradación, sin encontrar ninguno de los posibles detectables por la columna de HPLC (acetato, oxálico y fórmico). Estos experimentos se repitieron con concentraciones más altas de AT, el primero de ellos se realizó con una concentración de 498 mg/l (3mM), Figura 8. El crecimiento de la biomasa también fue determinado para la concentración de 1.5mM, la biomasa se expresó en términos de g SSV, Figura 9.

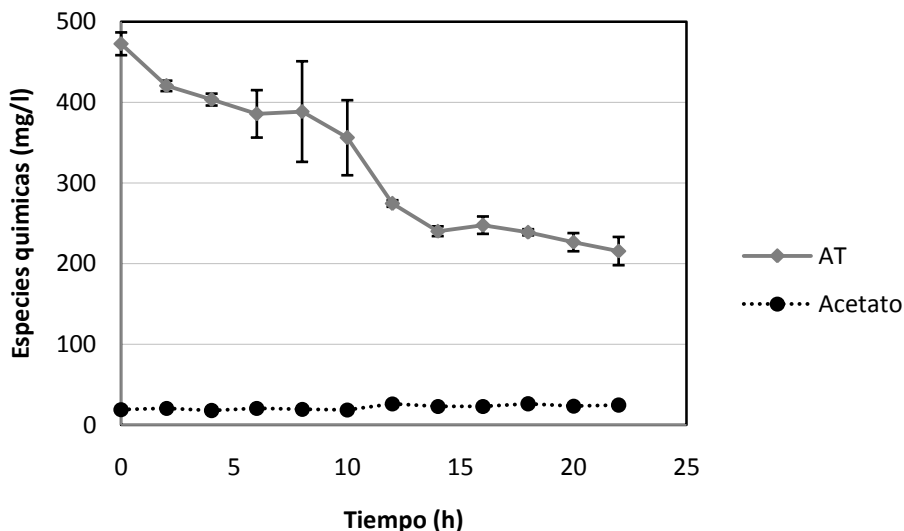


Figura 7. Determinación de la velocidad de consumo de AT en sistema desnitrificante y acumulación de acetato.

Para la concentración de 3mM se obtuvo una velocidad de remoción de ácido tereftálico de 12.13 mg/lh de AT (0.07 mM/lh). En este ensayo la concentración de ácidos orgánicos si fue detectable, en especial de acetato, dicha concentración osciló en un rango entre los 19-25 mg/l ± 2.7 .

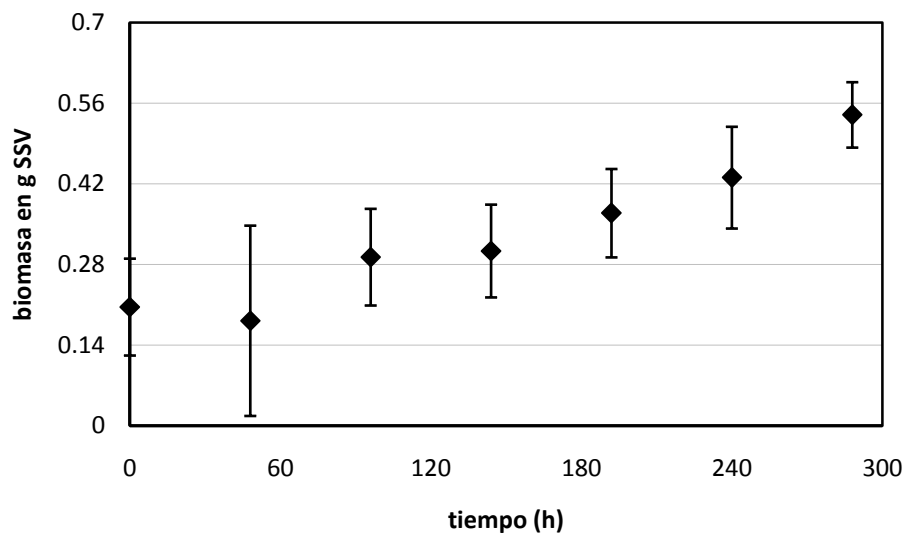


Figura 8. Crecimiento de la biomasa durante el consumo de 1.5mM de AT.

El consumo del ión nitrato bajo estas condiciones se muestra en la Figura 10. El consumo de nitrato no es lineal, lo cual no es muy distinto a lo reportado por otros autores, donde el nitrato presenta un consumo lineal sólo durante unas horas del cultivo, específicamente después de las 30 horas, (Jianlong et al. 1999) . Los resultados de la Figura 10 son un indicio de desnitrificación, sin embargo no se cuenta con datos que soporten la idea de una desnitrificación completa puesto que no se conoce la concentración de ión nitrito que se acumuló y la evidencia de la presencia de nitrógeno en la fase gaseosa no corresponde a la teórica de acuerdo a la estequiometría de la degradación del AT utilizando nitrato como aceptor de electrones.

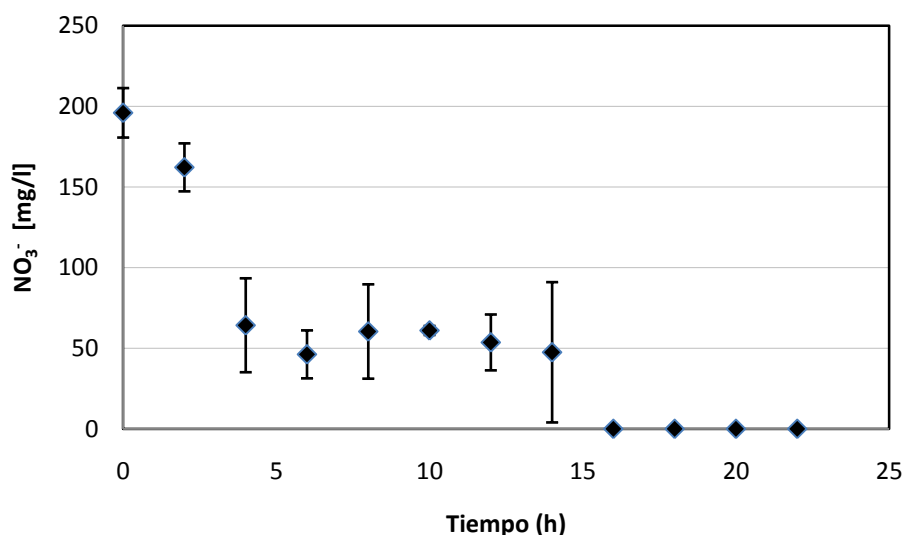


Figura 9. Consumo de nitrato con una alimentación de 3mM ión nitrato y la misma concentración de AT.

El comportamiento del pH en el sistema desnitrificante de estos experimentos también fue determinado, el valor del pH osciló entre las 6 y 7 unidades, es importante mencionar que debido a que las mediciones se realizaron con tiras reactivas el error es considerable. Recordando que la desnitrificación completa sólo ocurre entre las 7 y 8.5 unidades de pH, es posible que la desnitrificación completa no haya ocurrido, acumulándose el ión nitrito, la cantidad de nitrógeno presente en el espacio gaseoso producto de la desnitrificación correspondía a 68.72 mg del gas, que se produjeron a las 16 horas, observando que el pH de se encontraba en las 7 unidades las cuales pueden correlacionarse con las concentraciones planteadas como el máximo teórico. De este modo, de acuerdo a la estequiometría de la reacción de consumo de AT bajo condiciones de desnitrificación, los 68.72 mg que se obtuvieron equivalen a 71.6% del máximo teórico para nitrógeno gas.

El trabajo realizado por Aftring y col (1981) reportó el consumo de 3.1 mg/l (0.05mM) de nitrato en 4 horas junto con un consumo de 1.66 mg/l (0.01mM) de AT en el mismo periodo. Por otro lado, (Liang et al. 2007) reportan la degradación de 1mM de DMP usando 496 mg/l (8mM) de nitrato, trabajando en un pH entre las 7 y 8 unidades. La investigación de (Jianlong et al. 1999) evidenció que concentraciones de 620 mg/l (10mM) de nitrato y superiores inhiben fuertemente el crecimiento microbiano y que es posible la degradación de 1.25mM de dibutilftalato en 100 horas con una concentración de 372 mg/l (6mM) de nitrato, la cual ellos proponen como la concentración más adecuada para la biodegradación de AT y compuestos derivados de este.

En la presente tesis se consumió el 79% del ión nitrato (159.42 mg) durante la fase lineal de consumo del ión que duró 6 horas aproximadamente. Durante este periodo se degradaron 87 mg de AT (0.52mM), esto podría significar que el nitrato favorece la biodegradación de AT, como se puede apreciar en la Figura 7 y 9. Durante el tiempo que el nitrato se consume linealmente la tendencia de consumo del AT también parece ser lineal, sin embargo cuando el consumo de nitrato disminuye la degradación de AT también parece estancarse. A lo largo de la fase de mayor consumo de nitrato se degrada el 18% del AT presente en el sistema, lo cual no es despreciable pues, al menos durante ese tiempo, se observó un consumo mucho mayor al reportado en los trabajos de Aftring y col. (1981) y Liang y col. (2007).

Sin embargo después de las 6 horas se consumen 172.5 mg/l de AT, sólo con un 20% restante de NO_3^- lo que podría significar que el ión no es necesario para la biodegradación en este sistema, incluso en este punto podría darse el caso de que la desnitrificación haya sido desplazada y el resto del nitrato se esté consumiendo por otro mecanismo como la reducción del nitrato a amonio sin asimilación (DNRA), pues la relación materia orgánica y ión NO_3^- presenta mayor cantidad de aceptor de electrones, dichas características son condiciones necesarias para que la mayoría del nitrato se consuma por esta ruta y no por desnitrificación, un escenario que puede ser común pues en el caso de las aguas residuales la mayoría de las veces el 60 % del nitrato presente se consume por DNRA y sólo el 40 % restante se consume por desnitrificación (Maier 2000; Tugtas 2007).

En cuanto a la producción de biogás se esperaba de forma teórica que la mayoría del gas producido fuera dióxido de carbono (Baker and Herson 1999; Beristain-Cardoso et al. 2009), lo cual se evidenció mediante cromatografía de gases. En realidad la producción de gas en los experimentos con 3mM de AT no presentaron una producción continua de biogás, sin embargo de acuerdo con los resultados de la cromatografía de gases sólo hubo dióxido de carbono y nitrógeno en la fase gaseosa, se midió un blanco de la fase gaseosa el cual sólo consistía de aire arrojando como resultado una concentración de 28.74mM de nitrógeno, por lo que cada uno de las concentraciones de nitrógeno que se presentan deben de ser superiores a dicho valor. El exceso de nitrógeno presente en la muestra correspondería con la cantidad de nitrógeno producida mediante desnitrificación de acuerdo al balance estequiométrico de la biodegradación del AT utilizando nitrato como aceptor de electrones.

Durante el tiempo donde la degradación de AT fue lineal, antes de las 48 horas, sólo se produjo biogás en tres ocasiones, la primera a las 2 horas, la segunda a las 16 horas (en esta misma también se encontró la producción de nitrógeno) y el último registro de biogás dentro de la cinética de 24 horas fue precisamente al final de la misma. Posteriormente se continuó midiendo la producción de biogás puesto que se esperaba que el AT se degradara por completo alrededor de las 100 horas, encontrándose la producción de biogás sólo hasta las 96 horas. El comportamiento intermitente de la fase gaseosa podría tener relación con las concentraciones de metabolitos inhibidores de la desnitrificación, este es el caso del nitrito del cual ya se han comentado sus efectos tóxicos. Si bien no fue posible medir la cantidad de nitrito en el sistema, pueden relacionarse las concentraciones de nitrato con las de los componentes de la fase gaseosa, Figura 11.

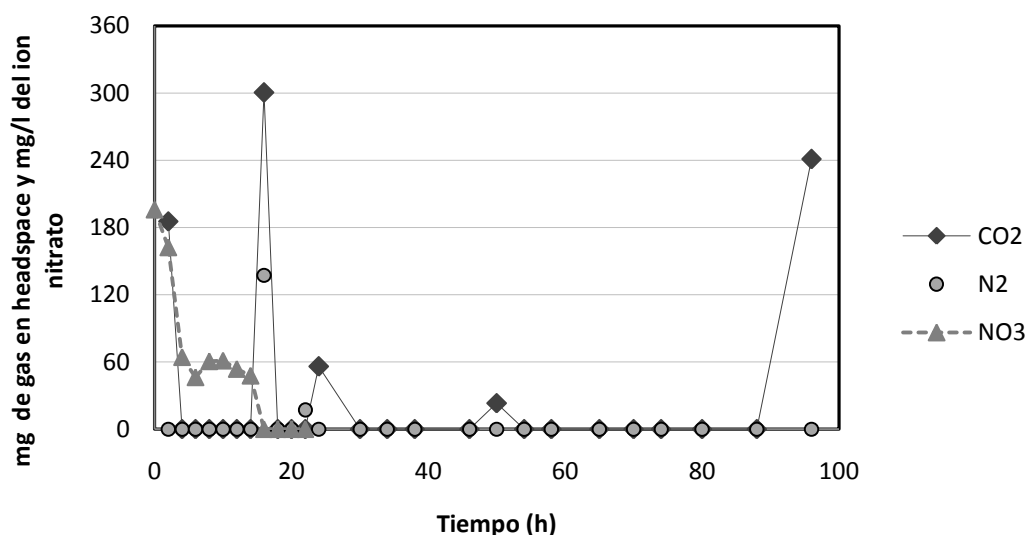


Figura 10. Comportamiento de la fase gaseosa durante la desnitrificación con 3 mM de AT y 3 mM de NO_3^- .

Es de llamar la atención que los puntos donde se produce nitrógeno las concentraciones del ion nitrato ya es muy baja, incluso en el segundo punto donde aparece nitrógeno el ion nitrato ya no

fue detectable por el método usado, lo que indica que se tenía una concentración menor a $1\mu\text{g/l}$ del ión. La Figura 11 muestra el comportamiento de la fase gaseosa en relación con el patrón de consumo del ión nitrato de la Figura 10. La Figura 12 corresponde a la gráfica final para las botellas desnitrificantes consumiendo 3 mM de AT, con 3 mM de NO_3^- . Mostrando todas las determinaciones realizadas en el sistema, incluyendo acumulación de acetato y comportamiento de la fase gaseosa.

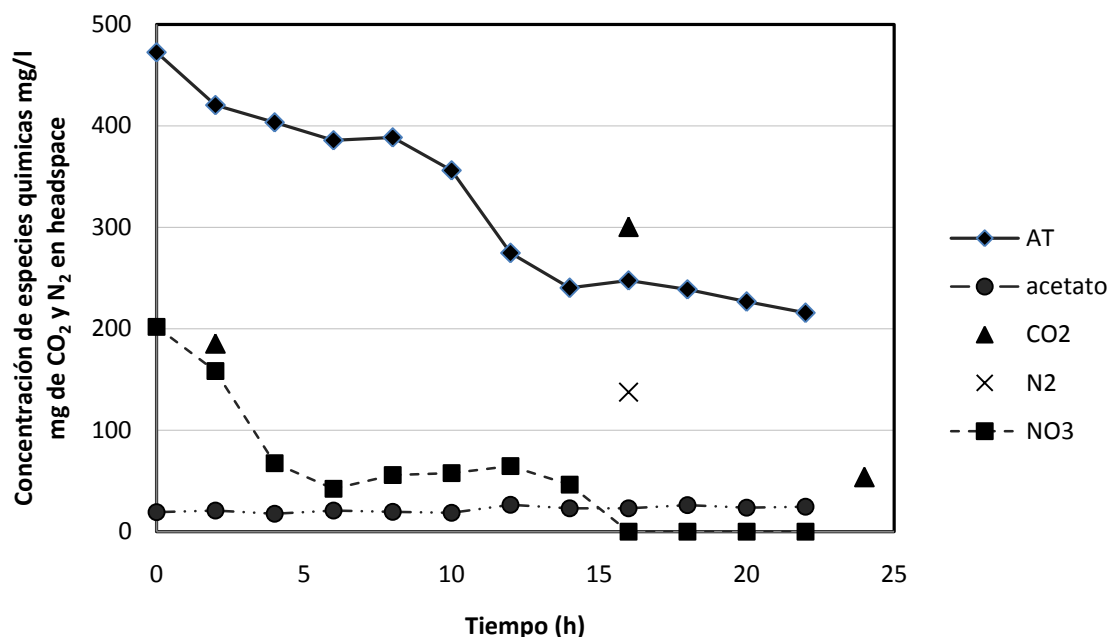


Figura 11. Comportamiento de la biodegradación de AT en desnitrificación.

Con el fin de tener una idea más clara sobre el comportamiento del proceso de biodegradación del AT en el sistema desnitrificante se compararon los rendimientos teóricos y prácticos del sistema. En el caso de la desnitrificación se compararon los rendimientos para un proceso de desnitrificación completa y otro para desnitrificación incompleta con acumulación de nitrito, estos resultados pueden verse en la Tabla 12.

Tabla 12. Posibles reacciones presentes en el sistema desnitrificante y sus rendimientos.

Desnitrificación completa con crecimiento de biomasa.	$Y_{NO_3-/AT}$ teórico	$Y_{N_2/AT}$ teórico	$Y_{CO_2/AT}$ teórico	$Y_{NO_3-/AT}$	$Y_{N_2/AT}$	$Y_{CO_2/AT}$
$C_8H_4O_4^{-2} + 0.9NH_4^+ + 0.9HCO_3^- + 3NO_3^- + 3H^+ \rightarrow 0.9C_4H_7O_2N + 1.5N_2 + 3.5H_2O + 5.1CO_2$	3	1.5	5.1	3.73 ± 0.8	0.44 ± 1.8	1.59 ± 2.2
Desnitrificación completa sin crecimiento de biomasa						
$C_8H_4O_4^{-2} + 6NO_3 + 30H^+ \rightarrow 3N_2 + 10H_2O + 8CO_2$	6	3	8	3.73 ± 0.8	0.44 ± 1.8	1.59 ± 2.2
Desnitrificación incompleta sin crecimiento de biomasa		$Y_{NO_2/AT}$ teórico			$Y_{NO_2/AT}$	
$C_8H_4O_4^{-2} + 15NO_3^- + 2H^+ \rightarrow 15NO_2^- + 8CO_2 + 3H_2O$	15	15	8	3.73 ± 0.8	SM	1.59 ± 2.2
Desnitrificación incompleta con crecimiento de biomasa		$Y_{NO_2/AT}$ teórico			$Y_{NO_2/AT}$	
$C_8H_4O_4^{-2} + 0.9NH_4^+ + 0.9HCO_3^- + 7.5NO_3^- + 2H^+ \rightarrow 0.9C_4H_7O_2N + 7.5NO_2^- + 6H_2O + 5.1CO_2$	7.5	7.5	5.1	3.73 ± 0.8	SM	1.59 ± 2.2

En la tabla anterior el indicativo SM significa, que no se midió. Comparando los rendimientos presentes en la tabla podemos ver que los rendimientos experimentales corresponden más a los de un sistema desnitrificante sin crecimiento de biomasa que a un sistema que si desarrolla biomasa, este resultado contrasta con la medición de biomasa realizada en la experimentación, donde se determino una velocidad de crecimiento de 0.0036 h^{-1} . Sobre estos resultados podemos decir que la evidencia puede indicarnos que en realidad se está realizando una desnitrificación incompleta, lo que se puede apreciar en la pobre producción de nitrógeno, además la velocidad de crecimiento determinada en la botellas serológicas es pequeña comparada incluso con la del sistema metanogénico, lo cual sin duda indica la existencia de un compuesto inhibidor para el crecimiento. Ya que la degradación de AT fue continua y el nitrato se consumió demasiado pronto es muy probable que el compuesto toxico presente en el cultivo sea el ion nitrito.

5.5 Comportamiento de los microcosmos bajo condiciones de metanogénesis

Para el sistema metanogénico se utilizaron concentraciones idénticas a las del sistema desnitrificante, 249 mg/l (1.5 mM) para comprobar la biodegradación de AT, por lo que las primeras evidencias de degradación en este sistema también se obtuvieron con determinaciones cada 48 horas. Los resultados se muestran en la Figura 13, con una velocidad de consumo aproximada de 1.7 mg/lh. En este sistema los ácidos orgánicos, específicamente acetato fueron detectados desde los primeros experimentos, el principal ácido que se encontró fue el acetato en concentraciones siempre superiores a los 15 mg/l (0.25 mM). Este compuesto adquiere una gran importancia debido a que alrededor del 85% del metano que se produce por bacterias proviene de la metanogénesis acetoclástica (Schink 1997) , por lo que la acumulación de acetato podría indicar que la población acetoclástica no es muy robusta y además la acumulación de acetato podría

inhibir completamente el proceso de metanogénesis, lo cual ocurre en concentraciones desde 30 mM o superiores (Dolfing and Tiedje 1988).

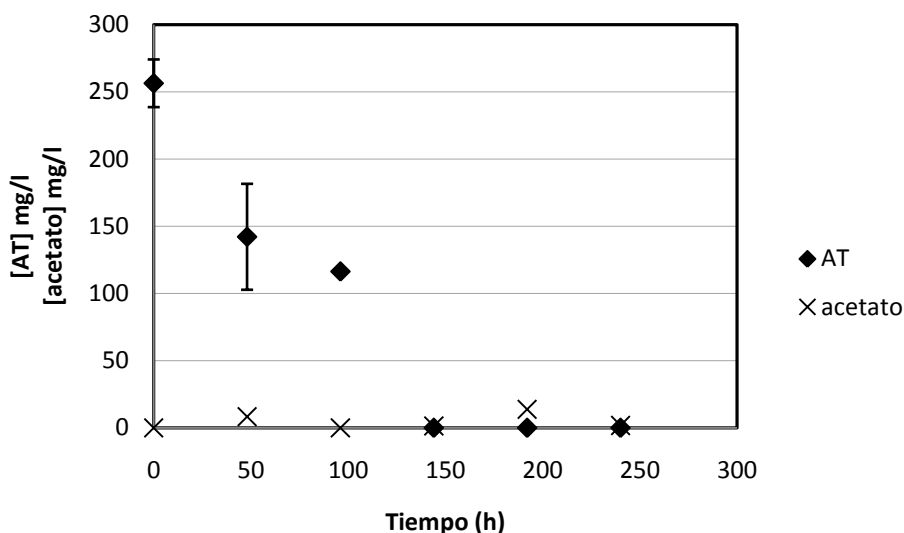


Figura 12. Evidencias de la biodegradación de AT en sistema metanogénico. Concentración inicial de AT 1.5mM.

Si bien es cierto que las arqueas metanogénicas no son las encargadas de degradar al compuesto monoaromático su trabajo removiendo el acetato y manteniendo la presión parcial de hidrógeno en un nivel bajo son fundamentales para lograr que el resto del consorcio se mantenga activo (Lowe et al. 1993; Schink 1997). Es de hacer notar que la velocidad de degradación que se presentó en este sistema metanogénico fue mayor que la reportada por (Yan-Ling Qiu and al. 2006) para concentraciones similares de AT, el reporta 166 mg/l degradados en aproximadamente 15 días, lo que equivale a una velocidad de degradación de 0.46 mg/lh.

La velocidad de degradación mayor, obtenida en la presente investigación, podría deberse a la presencia de mas poblaciones bacterianas con la capacidad de degradar AT, pues en el trabajo de (Yan-Ling Qiu and al. 2006) se trabajó con cepas puras por lo que la cantidad de microorganismos capaces de degradar el ácido tereftálico estaría limitado a una sola población bacteriana. Dentro de los reportes de degradación con consorcios metanogénicos la concentración más parecida es la reportada por (Kleerebezem et al. 1999a) donde 348.6 mg/l son degradados en 16 días, lo que equivale a 0.906 mg/lh.

En la presente investigación también se determinó el crecimiento de biomasa consumiendo 1.5 mM de AT, Figura 14. Una vez más se obtuvo la velocidad de degradación de AT con una concentración inicial de 498 mg/l también se determinaron las concentraciones de acetato, los resultados de dicho experimento se muestran en la Figura 15.

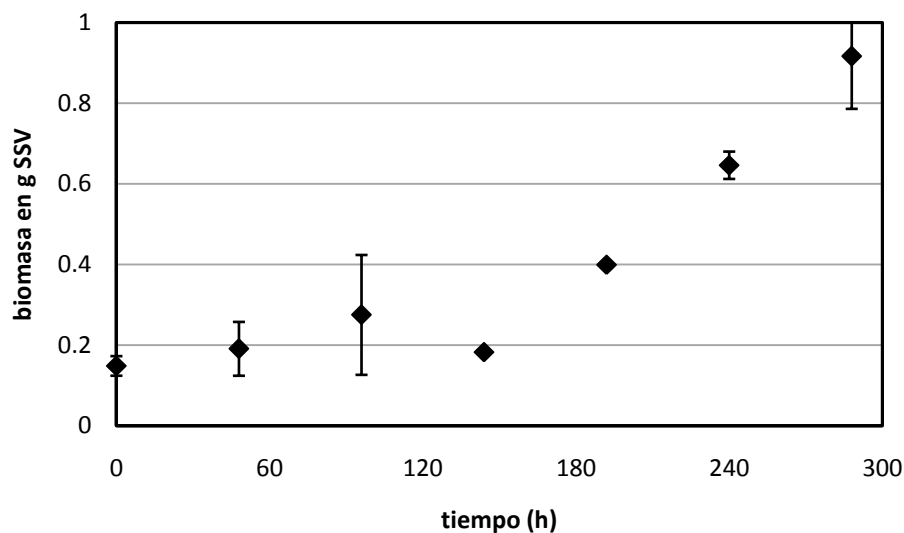


Figura 13. Crecimiento de la biomasa en el sistema metanogénico, consumiendo 1.5mM de AT.

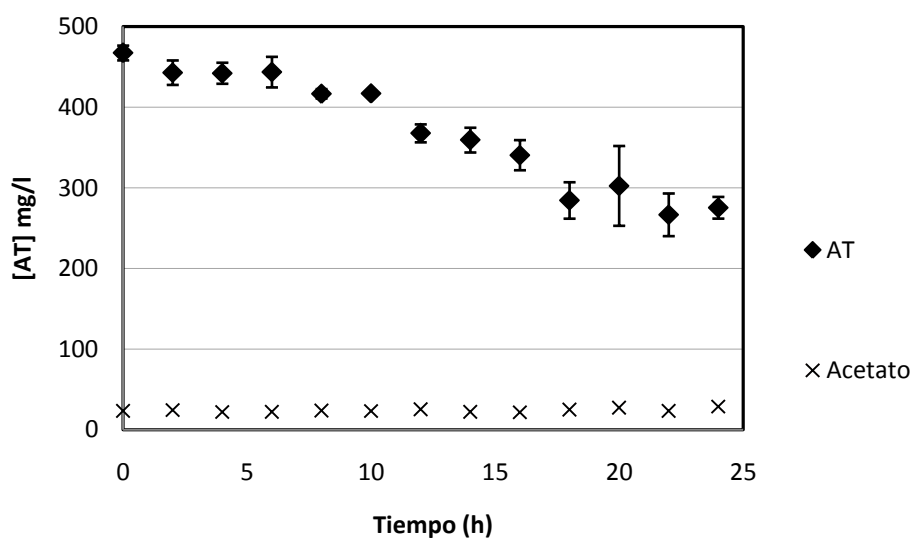


Figura 14. Velocidad de biodegradación de AT en metanogénesis. Concentración inicial de 3 mM de AT.

La velocidad de degradación del AT en metanogénesis fue de 9.28 mg/lh, lo cual es 1.3 veces más pequeña que en la desnitrificación degradando la misma concentración de 498 mg/l de AT en este mismo trabajo. Sin embargo es superior a la reportada para sepas puras por (Yan-Ling Qiu and al. 2006) y mayor a la reportada para cultivos mixtos por (Kleerebezem et al. 1999a; Kleerebezem et al. 1999b).

La producción de metano a partir de esta cantidad de AT también fue determinado, sin embargo previamente se determinó la velocidad de metanogénesis acetoclástica, usando la metodología de (Gonzales 2007), colocando 11.32 mg/l de acetato, equivalentes a 0.2g DQO la tendencia en la producción de metano con acetato (ml de CH₄) es completamente distinta a la producción de

metano usando como sustrato el AT (ml de CH_4), la Figura 16 muestra el patrón de producción del metano usando acetato como fuente de carbono, es importante recordar que gran parte del dióxido de carbono queda atrapado en la solución de hidróxido de sodio al 3%, por lo que podría considerarse que el gas medido en este experimento es en su mayoría metano.

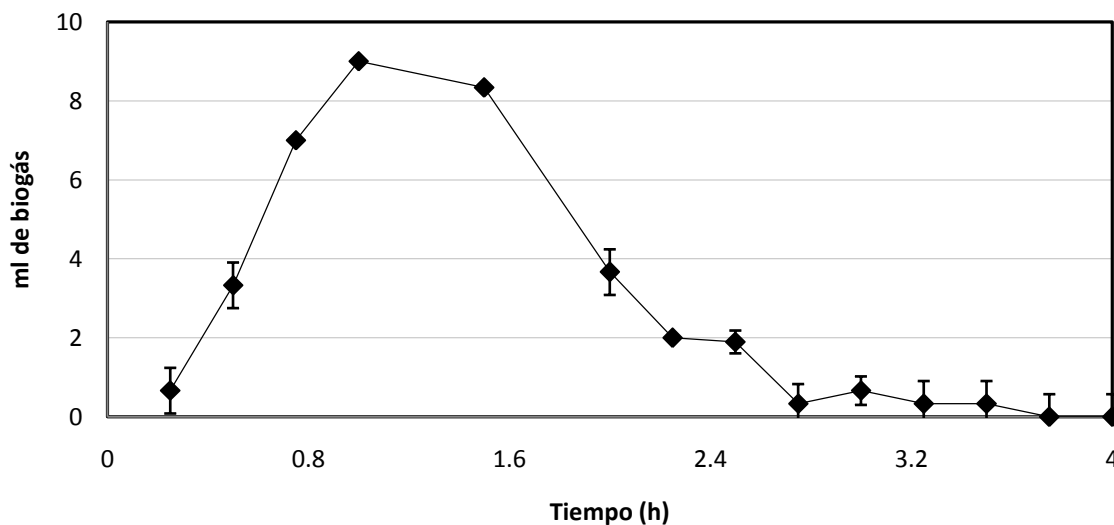


Figura 15. Patrón de la producción de biogás usando acetato como fuente de carbono. Alimentación con 11.32 mg/l de acetato.

De la grafica anterior podemos ver que a pesar de que se produce metano durante dos horas y media, sólo la fase que va de las cero a la hora y media servirá para determinar una velocidad de metanogénesis acetoclástica, la cual dio un valor de 55.2 mg DQO- CH_4 /h, la cual considerando que la botella serológica contenía 0.243 gSSV, nos arroja una valor para la metanogénesis acetoclástica específica de 227.2 mg DQO- CH_4 / gSSVh, la Figura 17 muestra la velocidad de metanogénesis acetoclástica.

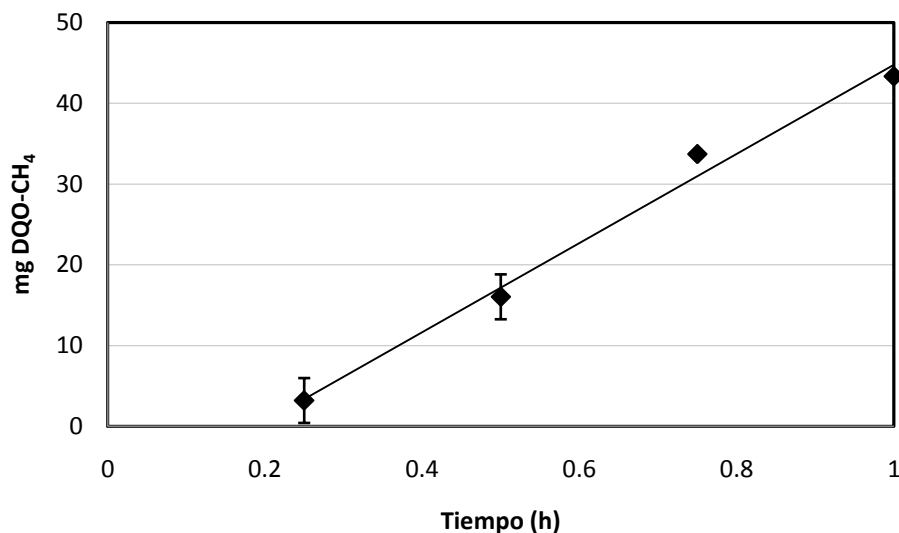


Figura 16. Actividad metanogénica acetoclástica del inóculo.

También se determinó la velocidad de la metanogénesis pero esta vez usando al AT como fuente de carbono, para este fin se alimentaron 0.2 g DQO al sistema metanogénico, lo cual equivale a 138 mg/l de AT, los resultados mostraron que la metanogénesis se retrasa, Figura 18, la actividad metanogénica disminuye, Figura 19, y el periodo de producción de metano se acorta. De hecho se sabe que el AT tiene un impacto negativo en la producción de biogás en un sistema anaerobio, el nivel de impacto dependerá de la capacidad de producción de biogás del inóculo, lo cual comúnmente está relacionado con la edad del inóculo y por tanto la estabilidad de las poblaciones bacterianas que conforman el consorcio. Sin embargo se sabe que el AT puede disminuir en 50 % la metanogénesis a concentraciones de 100 mM en reactores inoculados con lodo granular metanogénico (Fajardo et al. 1997).

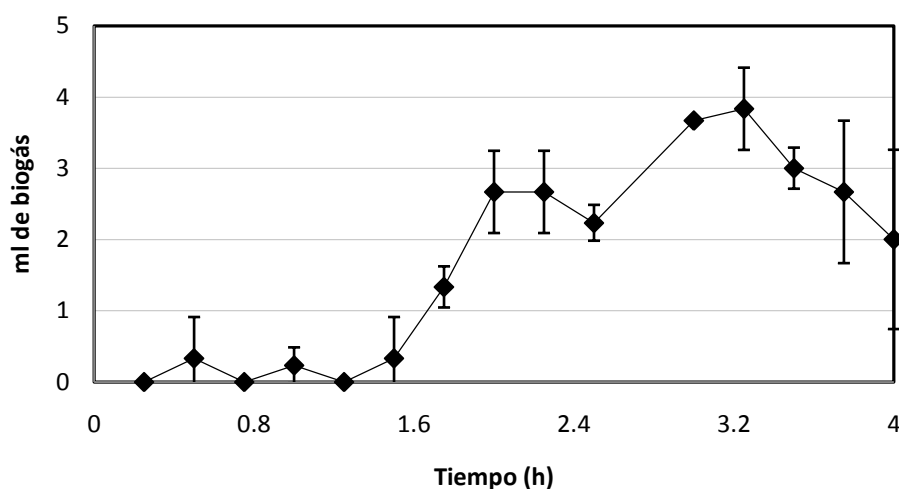


Figura 17. Patrón de la producción de biogás en presencia de AT como fuente de carbono. Alimentación con 138 mg/l de AT.

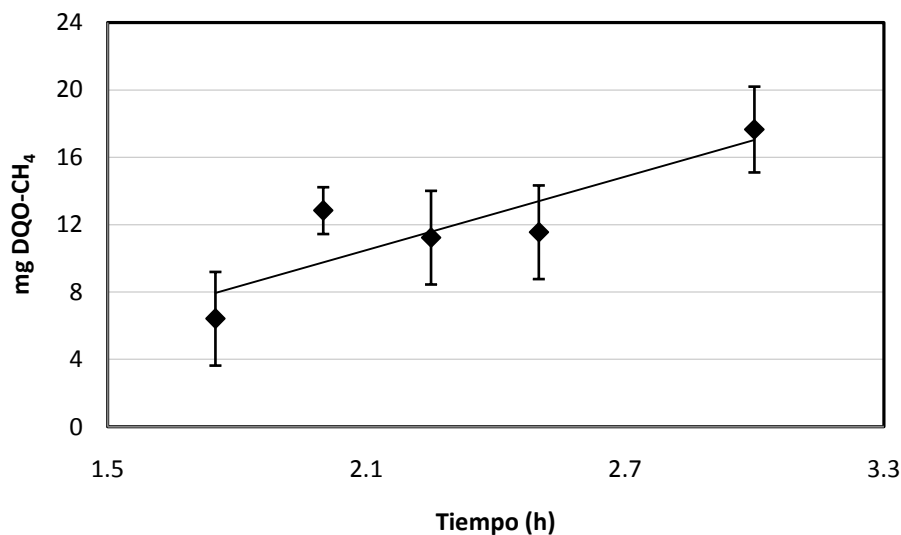


Figura 18. Actividad metanogénica usando al AT como fuente de carbono

Al agregar AT al sistema la actividad metanogénica disminuye hasta 28.8 mg DQO-CH₄/ gSSVh, por lo tanto esperamos que la producción de metano durante la biodegradación del ácido tereftálico al menos pueda manifestarse, ya que el impacto negativo del AT es evidente, los resultados obtenidos, demuestran que el AT es un compuesto que impacta el equilibrio del sistema metanogénico. En el sistema con 3mM de AT fueron sumamente pequeños en comparación con los volúmenes obtenidos en el experimento de la velocidad de metanogénesis, esto podría deberse a las concentraciones de ácidos orgánicos presentes en el sistema metanogénico los cuales inhiben el proceso de metanogénesis desde concentración 2mM, reduciéndola hasta en un 50% (Koster and Cramer 1987). La Figura 20 muestra el comportamiento de la fase gaseosa en los cultivos metanogénicos y se le correlaciona con el acetato, el principal intermediario de la degradación en el presente sistema metanogénico. El acetato es una molécula de particular interés en este sistema metanogénico, ya que puede existir una competencia por dicho sustrato entre bacterias metanogénicas acetoclásticas y otras poblaciones bacterianas que recurrirán a él como una fuente más sencilla de carbono y energía.

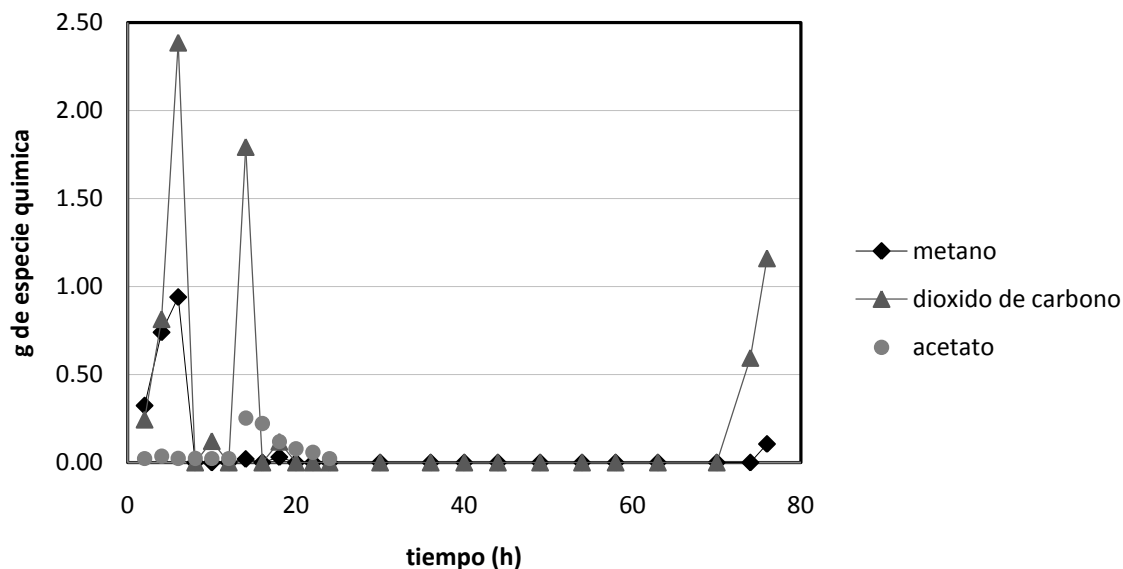


Figura 19. Presencia de metano y dióxido de carbono en el microcosmos metanogénico con respecto al tiempo

La grafica final del comportamiento del sistema metanogénico no se presenta debido a que las concentraciones de la fase gaseosa son demasiada altas como para unificarlas en una sola grafica. Podemos resaltar el hecho de que la remoción de AT es menor que la del sistema desnitrificante, lo cual es un resultado esperado, pues el sistema desnitrificante contiene bacterias que se desarrollan más rápido que los consorcios metanogénicos.

Los consorcios metanogénicos están formados por tres grupos bacterianos fundamentales, el primero de ellos es el grupo denominado fermentadoras primarias cuya función consiste en convertir polímeros o compuestos químicos en sustancias más sencillas como; ácidos orgánicos volátiles, succinato, lactato, alcoholes o en compuestos que sirvan como alimento a la arqueas metanogénicas, como compuestos de un carbono e hidrógeno. Posteriormente actúan las bacterias fermentadoras secundarias que se encargan de desdoblar las moléculas intermediarias como los alcoholes y los ácidos orgánicos volátiles en acetato, hidrógeno y compuestos de un sólo carbono, los cuales serán consumidos por las arqueas metanogénicas acetoclásticas o las oxidantes del hidrógeno, por lo tanto el desempeño del sistema metanogénico depende en gran medida de que las poblaciones metanogénicas sean capaces de remover la mayor cantidad posible de acetato, hidrógeno y compuestos de un carbono (Schink 1997), pues esto permitirá el desarrollo y actividad de las poblaciones capaces de degradar ácido tereftálico. Sin embargo si la actividad de las fermentadoras primarias fuera grande, como parece indicar la Figura 12, donde en las primeras horas la degradación parecer darse sin fases de adaptación, podrían acumularse acetato y benzoato que inhibiría el proceso de degradación de ácido tereftálico (Kleerebezem et al. 1999c). Dichos compuestos pueden inhibir la degradación de AT debido a que son más sencillos de degradar y por lo tanto los microorganismos preferirán el acetato y el benzoato en lugar del AT, además el acetato por si mismo tiene la capacidad de inhibir la metanogénesis hasta en un 50% a concentraciones entre los 10mM y 20mM (Dolfing and Tiedje 1988).

Por lo tanto los puntos donde se evidencia que la degradación se estanca un poco en el presente sistema metanogénico se debe a la acumulación de algún intermediario, sería difícil afirmar que sea el benzoato, pues este se detectó en contadas ocasiones y en concentraciones sumamente bajas. En cambio el acetato se encuentra presente en casi todo el proceso de biodegradación, sin embargo como se ve en la Figura 14 en las primeras 12 horas de la biodegradación la producción de metano no parece verse afectada por la presencia de acetato. En la Tabla 13 se comparan los rendimientos experimentales y teóricos de la metanogénesis para tener una idea de cómo se desarrolla el sistema.

Algunos lodos que degradan AT usando la metanogénesis se han analizado, encontrándose las siguientes poblaciones; 78.5 % de bacterias pertenecientes al género δ -proteobacteria, 7.5 % bacterias verdes no sulfato-reductoras, 0.9 % *Synergistes* y 13.1 % de bacterias no cultivadas, en cuanto a las arqueas el 81.7 % corresponde a *Methanosaeta* y el 18.3 % a *Methanospirillum* (Wu et al. 2001). Suponemos que la menor velocidad del sistema metanogénico tiene que ver con la interdependencia de las especies, pues las degradadoras primarias (donde podemos ubicar a las poblaciones degradadoras de AT) dependen literalmente de la producción de metano y la producción de este depende de la producción de los sustratos adecuado por las fermentadoras primarias y principalmente de las fermentadoras secundarias (Lowe et al. 1993; Schink et al. 2000). Otro punto muy importante que pudo incidir sobre los resultados obtenidos es la composición de la fase gaseosa inicial, la cual como se reporta en materiales y métodos se uso nitrógeno, sin embargo no es la mejor opción que debe usarse para generar anaerobiosis, esto específicamente para la biodegradación de AT. De acuerdo con otras investigaciones la biodegradación del AT y sus isómeros se ve potencializada por la presencia de niveles elevados de hidrógeno y dióxido de carbono, usando una atmósfera de nitrógeno la biodegradación de AT puede tener un periodo de adaptación de hasta 127 días (Liu and Chi 2003). A pesar de lo anterior y de que el inóculo originalmente era aerobio, parece ser que el tiempo de adaptación del presente inóculo no fue demasiado grande, pues se han reportado tiempos entre los 65-150 días para la adaptación a este contaminante (Kleerebezem et al. 1997; Liang et al. 2007; Liu and Chi 2003).

Tabla 13. Posibles reacciones en el sistema metanogénico y sus rendimientos.

Metanogénesis con crecimiento de biomasa.	$Y_{CH_4/AT}$ teórico	$Y_{CO_2/AT}$ teórico	$Y_{ace/AT}$ teórico	$Y_{CH_4/AT}$	$Y_{CO_2/AT}$	$Y_{ace/AT}$
$C_8H_4O_4^{-2} + 0.9NH_4^+ + 0.9HCO_3^- + 9H_2O \rightarrow 0.8C_4H_7O_2N + 3.4CO_2 + H^+ + 1.6CH_4$	1.6	3.4	0	0.4 ± 0.2	1.19 $\pm$ 2.2	1.74 $\pm$ 2.02
Metanogénesis incompleta, acumulando acetato y biomasa						
$C_8H_4O_4^{-2} + 0.18NH_4^+ + 0.18HCO_3^- + 16.5H_2O \rightarrow 3CH_3COO^- + 0.18C_4H_7O_2N + 1.35CO_2 + H^+ + 0.3CH_4$	0.3	1.35	3	0.4 ± 0.2	1.19 $\pm$ 2.2	1.74 $\pm$ 2.02
Metanogénesis incompleta sin crecimiento de biomasa						
$C_8H_4O_4^{-2} + 4.5H_2O \rightarrow 3CH_3COO^- + 1.25CO_2 + H^+ + 0.75CH_4$	0.75	1.25	3	0.4 ± 0.2	1.19 $\pm$ 2.2	1.74 $\pm$ 2.02

En el caso del sistema metanogénico los rendimientos parecen colocarlo entre la metanogénesis completa y la incompleta, sin embargo las evidencias producto del muestreo indican un metanogénesis incompleta sin crecimiento de biomasa, sin embargo una vez más las evidencias recopiladas al medir la biomasa indican que el crecimiento de la biomasa si se presenta en el sistema metanogénico, con una velocidad de 0.0062 h^{-1} , sin embargo este crecimiento podría ser atribuible a los organismo acidogénicos del consorcio, pues este presento un desarrollo en forma de biopelícula, lo cual indica el dominio poblacional de organismos acidogénicos, pues si hubiera mayor cantidad de organismo metanogénicos el inóculo se encontraría en forma granular (Kim and Speece 2002; Wu et al. 2001).

5.6 Reactores de pre-inoculación para el reactor UASB.

En estos sistemas se realizó un seguimiento durante 19 días, los cuales comenzaron a contarse a partir de que los pre-inóculos entraron en anaerobiosis, lo cual se consideró que había sucedido cuando el indicador resarsurina se mantuvo sin coloración, por lo que los cultivos se mostraban transparentes. Durante estos 19 días se midió el consumo de materia orgánica (AT) en forma de DQO y la desaparición del NO_3^- en el caso del pre-inóculo desnitrificante. Para el sistema metanogénico sólo se determinó el consumo de AT mediante la DQO, la producción de gas no fue valorada debido a que no se implementaron mecanismos para atraparlo. Las Figuras 21 y 22 muestran los resultados de estos pre-inóculos. Ambos pre-inóculos contenían 0.635 g SSV en un volumen de 1200 ml

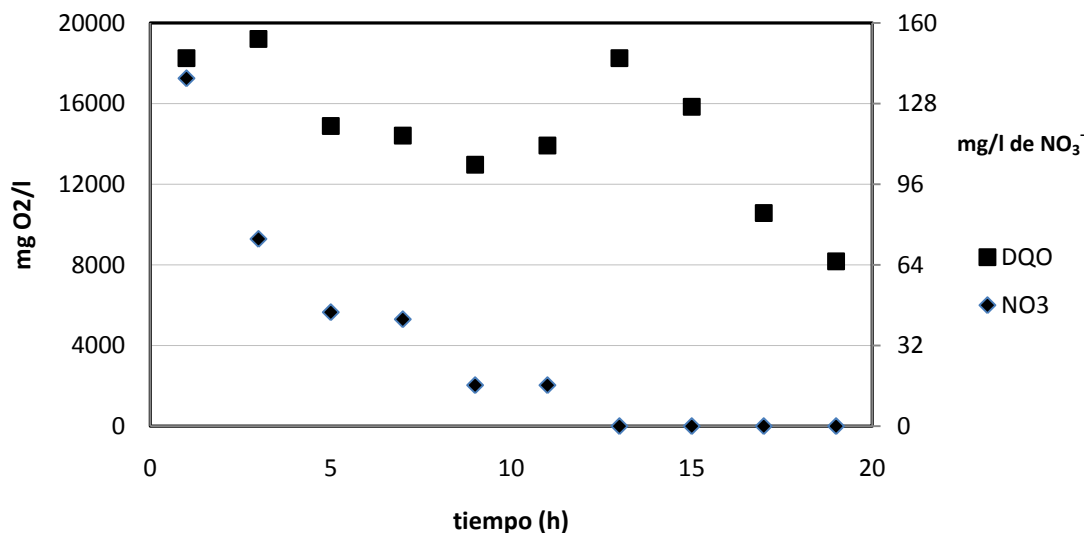


Figura 20. Comportamiento del pre-inóculo desnitrificante durante 19 días.

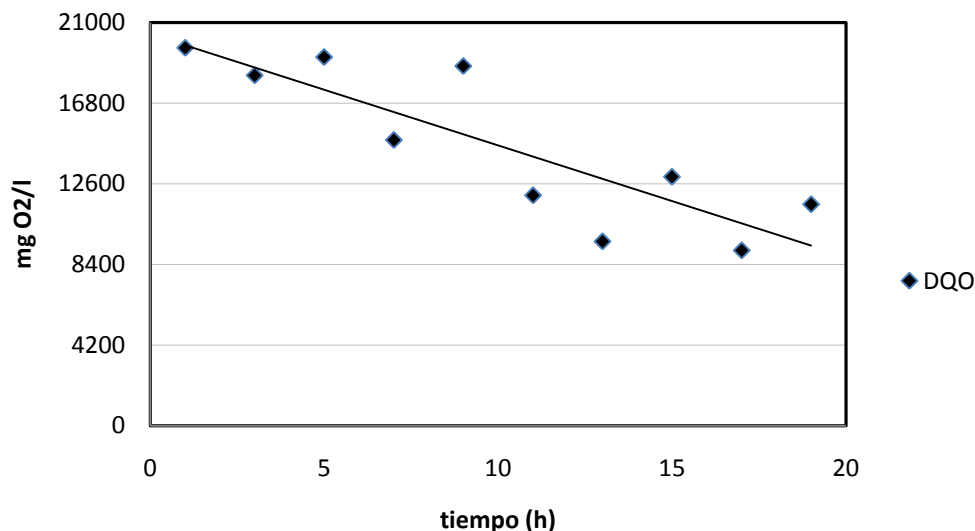


Figura 21. Comportamiento de pre-inóculo metanogénico, durante 19 días.

Como es posible apreciar, el pre-inóculo metanogénico presenta una tendencia más marcada hacia el consumo de la materia orgánica presente en el líquido, incluso se pudo cuantificar una velocidad de degradación de 578 mgO₂/lh, lo que equivale aproximadamente a 0.4 g/lh, considerando que toda esta DQO corresponde al AT. En ambos casos es importante mencionar que los puntos donde la demanda química de oxígeno presenta un aumento en su valor precedido por una disminución del mismo, puede deberse a la existencia de algún intermediario durante la biodegradación. La presencia de intermediarios incide sobre la determinación de DQO debido a que esta prueba no es discriminativa sobre la materia orgánica oxidable que cuantifica, por lo que no es un método fiable para esta investigación.

En esta investigación se observa una mayor perturbación de las mediciones de DQO en el sistema desnitrificante que en el metanogénico. Desglosando este hecho; el sistema desnitrificante posiblemente presente esta mayor cantidad de perturbaciones por la inestabilidad del mismo proceso la cual se debe principalmente al ión nitrito. Dicho ión es sumamente tóxico para la mayoría de los microorganismos en concentraciones sumamente bajas hasta de 1mM (Tugtas 2007). El hecho de que el ión se acumule en un sistema desnitrificante puede deberse a cambios de pH, o a la falta de materia orgánica que proporcione los electrones necesarios para continuar con la reducción del ión hasta nitrógeno (Tugtas 2007). En el caso de la presente investigación este último factor no puede ser el causante puesto que existió aun ácido tereftálico en el sistema, de hecho en experimentos ya mostrados el nitrato desaparece antes de que el ácido tereftálico sea consumido en su totalidad. El pH podría ser el causante de la acumulación del ión. Además este ion interfiere con las determinaciones de DQO.

En esta investigación el sistema desnitrificante consumió, al parecer, menor cantidad de ácido tereftálico que el sistema metanogénico, lo cual no concordaría con los experimentos en microcosmos, dicha variación se debe sin duda a la presencia de otras moléculas orgánicas que

son oxidadas al medir la DQO y que tal vez no tengan relación con compuestos monoaromáticos, las cuales bien podrían ser producto de la biodegradación o de algún metabolismo secundario en las poblaciones presentes en el sistema. En el caso de la metanogénesis parece existir un consumo más estable en el pre-inóculo. Debido a que el pre-inóculo metanogénico consume la materia orgánica de forma más reproducible, a la simplicidad del sistema y a que sólo se contaba con un reactor en esos momentos se optó por montar sólo el reactor metanogénico y no ambos (desnitrificante y metanogénico) sin embargo el reactor de pre-inóculo desnitrificante sirvió para constatar que es posible adaptar el lodo obtenido de la planta de tratamiento a las condiciones anaerobias para volúmenes más grandes y que ambos sistemas son capaces de degradar AT. Al pre-inóculo desnitrificante se le sustituyó por completo el medio de cultivo y se alimentó con 118 mg/l de acetato y se mantuvo por una semana más en las mismas condiciones de cultivo previas (37°C y 150 rpm), posteriormente a esto ambos inóculos se vaciaron con un poco de medio de cultivo al reactor metanogénico.

5.7 Desempeño del reactor UASB metanogénico.

Se usaron dos tiempos de retención hidráulica, la comparación entre ambos se realizó con una alimentación de 600 mg/l de AT, el primer tiempo de retención hidráulica fue de 7.35 minutos, mientras que el segundo tiempo de retención era de 13.25 minutos. Con cada uno de los tiempos de retención hidráulica (ver Tabla 8) se determinó la velocidad de degradación del ácido tereftálico y la acumulación de acetato. La Figura 23 corresponde a un flujo de 285 ml/min, mientras que la Figura 24 corresponde al flujo de 156 ml/min

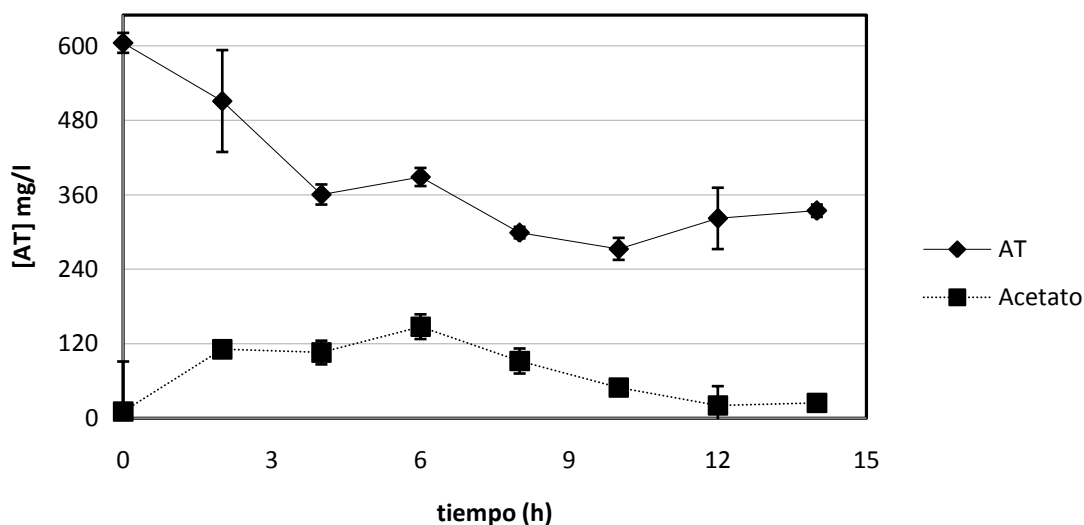


Figura 22. Consumo de ácido tereftálico en el reactor con un flujo de 285 ml/min.

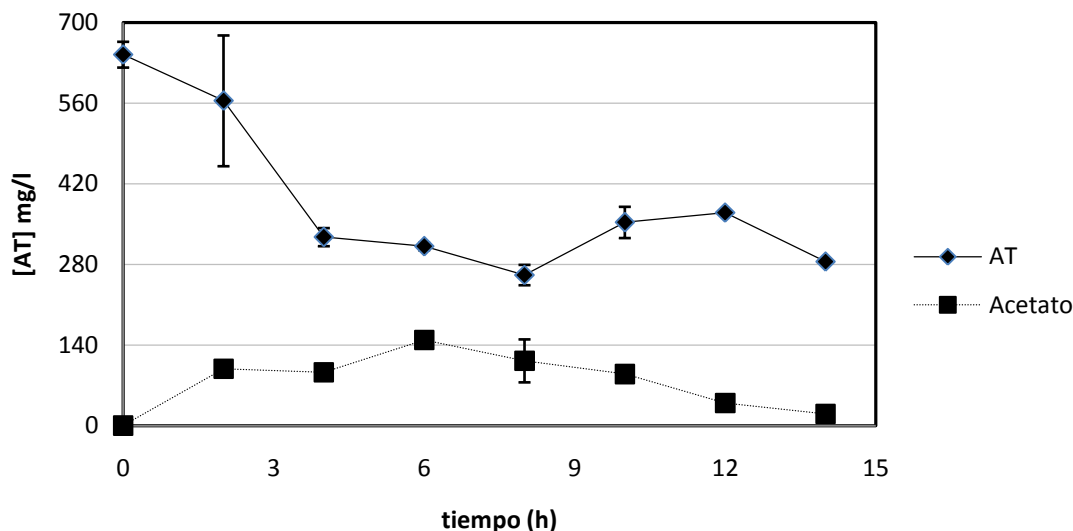


Figura 23 . Consumo de ácido tereftálico en el reactor con un flujo de 156 ml/min.

Como se observa en las graficas el tiempo de retención hidráulica mayor aumenta la velocidad de remoción del ácido tereftálico, aunque es importante mencionar que el incremento de la degradación es poco significativo (19 mg/lh aumentan a 20.6 mg/lh), el cual podría deberse a la estabilidad mayor del sistema usando un flujo más pequeño. También se debe comentar que realizando un análisis sobre los tiempos de retención hidráulica y las velocidad de crecimiento obtenida en condiciones metanogénicas; los resultados de dicho análisis mostraron que ambos flujos usados eran demasiado altos, pues en ambos casos la velocidad de dilución era mucho mayor a la de crecimiento de biomasa, sin embargo esta no se perdía pues se recirculaba dentro del sistema, por lo que la biomasa lavada del sistema reingresaba al mismo. Se optó por utilizar este último tiempo de retención hidráulica (13 minutos) pues da una velocidad de degradación mayor y también crea un ambiente de mayor estabilidad para los flóculos dentro del reactor los cuales no son arrastrados al exterior del mismo. Al finalizar los 45 días de operación del reactor se midió la concentración de SSV en el reactor, quedando en un valor de 2.96 g SSV. La población bacteriana en el reactor se duplicó, pues el reactor se inició con una concentración de 1.27 g SSV.

Cuando se determinaron las velocidades de biodegradación del AT en el reactor con los diferentes THR y una concentración inicial de 0.6 g-AT/l se encontró que ambas son menores a las reportadas en (Kleerebezem et al. 1997), la cual fue de 24 mg AT/l d y todavía más pequeñas que la reportada por el mismo autor con un reactor de alto rendimiento de dos fases, donde logro remover 10 g-AT/l d (Kleerebezem et al. 2005). Estas diferencias se deben sin duda alguna a las diferencias existentes entre los inóculos, pues en el primer caso (Kleerebezem et al. 1997) el autor usa un inóculo anaerobio estricto desde el inicio de la experimentación, proveniente de un reactor UASB con una operación ya estable. Mientras que en su segundo artículo utiliza el mismo inóculo el cual ha tratado aguas residuales que contienen ácido tereftálico y se ha adaptado a estas aguas durante al menos 5 años lo cual implica el establecimiento de una población lo suficientemente robusta y con la capacidad de consumir el ácido tereftálico con altos rendimientos.

En la presente investigación debemos de recordar que el inóculo se adaptó de aerobiosis a anaerobiosis, sin embargo para poder brindar un mejor desempeño en un tratamiento anaerobio el inóculo deberá de encontrarse en forma granular o en flóculos. Un cultivo aerobio que se adapte a anaerobiosis puede formar flóculos con las condiciones adecuadas. Los lodos activados aerobios frescos comúnmente son inestables (baja cohesión) y tienen una baja densidad, por lo tanto es necesario incubarlo al menos por un mes para estabilizarlo, volverlo más denso e incrementar su actividad metanogénica (Wu et al. 1987). Ya que se tiene el inóculo adaptado a anaerobiosis, es necesario favorecer su floculación. Las características del agua a tratar es importante, principalmente el pH y una baja concentración de sólidos suspendidos. El pH debe de mantenerse entre las 7 y 7.5 unidades, la temperatura no debe de ser lo más constante posible y debe de haber una alimentación semi-continua (lo ideal es un cultivo continuo) de elementos traza, medio de cultivo fresco y de alguna fuente de carbono. Tal vez lo más importante sea la concentración de g SSV, la cual se recomienda de al menos 15 g SSV/l para poder asegurar la floculación (Wu et al. 1987; Zhang and Bennett 2005).

Retomando los resultados; con el tiempo de retención hidráulica de 13 minutos se realizaron dos alimentaciones diferentes, la primera de aproximadamente 2 g/l de AT y la segunda de aproximadamente 3 g/l de AT. El consumo de cada una de estas concentraciones en el reactor aparece en la Figura 24. Con la concentración de 2 g/l de ácido tereftálico se obtuvo una velocidad de degradación de 187.6 mg AT/l d, mientras que para la concentración de 3 g/l de AT se alcanzó la velocidad de degradación de 115.52 mg AT/l d. Con este último resultado se rebasa la velocidad de degradación reportada por (Kleerebezem et al. 1997) que es de 24 mg AT/l d en un trabajo similar en cuanto a la escala del reactor usado. Sin embargo la reportada en (Macarie et al. 1992) que es de aproximadamente 0.129 g AT/g SSV, es al menos tres veces más grande que la de la presente tesis que es de 39 mg AT/g SSV, para la concentración de 3 g/l de AT. El comportamiento del consumo en el reactor durante los 45 días de cultivo se muestra en la Figura 25.

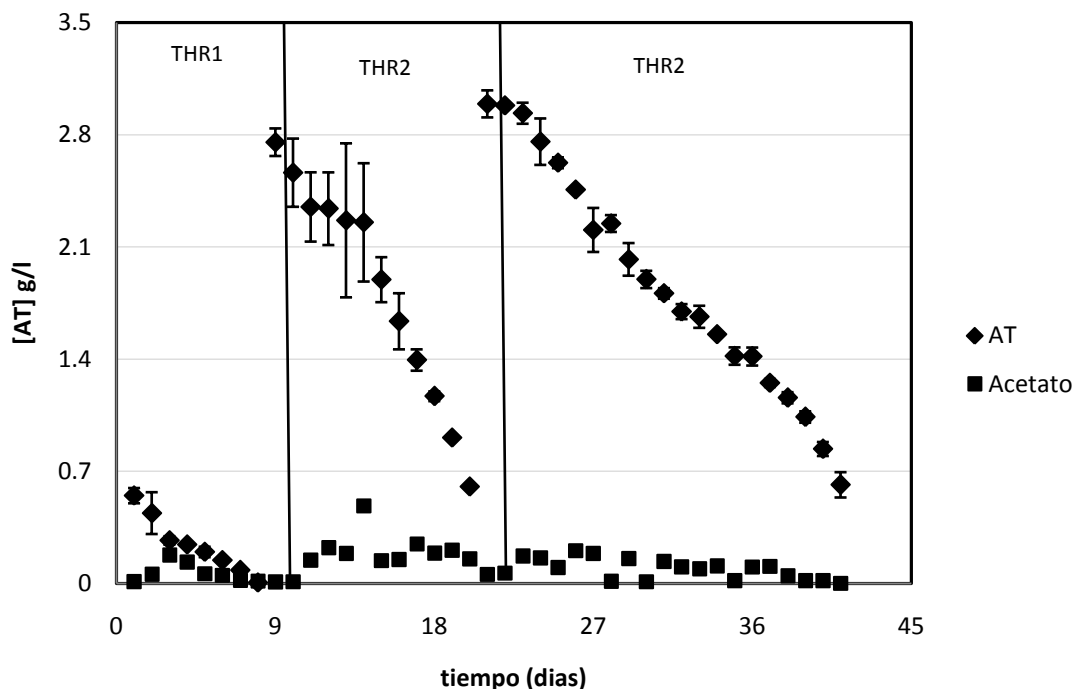


Figura 24. Consumo del ácido tereftálico en el reactor así como la acumulación de acetato.

Como puede observarse las velocidades de consumo en las alimentaciones de mayor concentración son superiores a las de menor concentración lo cual puede deberse a una mayor disponibilidad de sustrato en estos casos, lo que podría indicar que la capacidad de degradación de este inóculo se encuentra por encima de estas concentraciones probadas. Otra posible explicación es que la población de microorganismos capaces de degradar ácido tereftálico aumentó y a que las mismas poblaciones son más estables después de las primeras alimentaciones. De hecho, uno de los factores de mayor peso en la degradación de xenobióticos en reactores anaerobios es la edad del inóculo. Pues tiene una relación directa con que tan robusta es la población de microorganismos degradadores del xenobiótico y de la población metanogénica (Zhang and Bennett 2005).

De acuerdo con estos resultados y otros reportados en la bibliografía el uso de un reactor UASB no parece ser suficiente para el tratamiento de estas aguas residuales, debido a que se requiere un rendimiento y una velocidad de biodegradación mayores para el AT. De hecho el mejor rendimiento se encuentra reportado en (Kleerebezem et al. 2005) donde se eliminaron 10 g AT/l d, pero este es un proceso de dos fases continuo, donde siendo estrictos se trabaja con 4 reactores UASB.

Todos los factores mencionados en el párrafo anterior junto con las limitaciones microbiológicas y técnicas ya mencionadas sin duda tuvieron un impacto negativo sobre la biodegradación de AT en la presente tesis.

El comportamiento de la fase gaseosa en el espacio gaseoso del reactor a lo largo de los 40 días de operación se muestra en la Figura 26

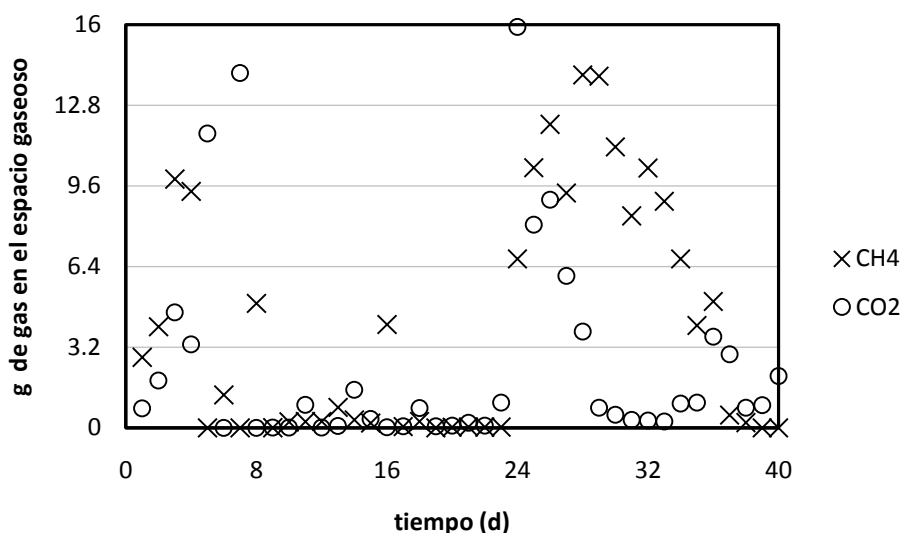


Figura 25. Comportamiento de la fase gaseosa durante la operación del reactor metanogénico.

La composición de la fase gaseosa durante la degradación del AT en la metanogénesis fue muy variable, por lo que la velocidad de producción en este caso no fue posible de determinar. Los volúmenes de metano producidos variaron desde los 0.78 ml hasta los 75 ml del gas, dichos valores se encuentran por debajo de lo producido en la investigación de (Fdz-Polanco et al. 1999), quien obtuvo 390 ml de metano por cada gramo de DQO removido, sin embargo una de las principales diferencias entre ambas investigaciones radica en que la investigación de Fdz-Polanco trato aguas residuales industriales reales, las cuales no sólo contenían ácido tereftálico si no también compuestos aromáticos y volátiles, los cuales pudieron contribuir con la producción de biogás, recordando que la presencia de otros compuestos pueden desplazar la biodegradación de AT a un segundo plano, hasta que las fuentes de carbono alternativas se agoten(Fajardo et al. 1997; Kleerebezem et al. 1999c).

En la presente investigación la producción total de biogás en el reactor fue inferior a los 225 ml, puesto que este era el volumen del espacio gaseoso que había que desplazar, para generar un cambio de nivel en la salmuera usada para remover el dióxido de carbono de la corriente gaseosa, esta pobre producción de gas podría deberse al origen del inóculo, donde la población metanogénica sería muy pequeña debido a la baja cantidad de núcleos anaerobios presente en el inóculo (Wu et al. 1987). Pero la explicación más factible en el presente sistema es primero la acumulación de ácidos orgánicos en el seno del líquido los cuales inhiben la metanogénesis, específicamente acetato y oxálico(Dolfing and Tiedje 1988) así como la acumulación de algún intermediario de la biodegradación del ácido tereftálico no detectable por los métodos analíticos utilizados. Esta explicación es una posibilidad por los diferentes metabolismos que interaccionan en el cultivo mixto lo cual genera diferentes intermediarios metabólicos y consume rápidamente

otros mas, un escenario posible seria que la población de microorganismos fermentadores primarios (encargados de desdoblar los compuestos complejos como el AT en alcoholes y ácidos orgánicos de al menos cuatro carbonos de longitud) creció rápidamente debido a su alta capacidad para consumir compuestos monoaromáticos, esta idea puede ser soportada en la evidencia de que la degradación de AT no decreció o se detuvo durante la operación del reactor, independientemente de la composición de la fase gaseosa. Después, si existían fermentadores secundarios, consumieron los compuestos sencillos y los ácidos orgánicos de cadena corta, limitando los sustratos disponibles para las arqueas metanogénicas acetoclásticas, las cuales producen alrededor del 85% de metano posible en cualquier sistema metanogénico (Dolfing and Tiedje 1988; Schink 1997; Vavilin et al. 2005; Zeikus 1977), por lo que el poco metano producido en el reactor en realidad es producido por arqueas metanogénicas hidrogenotróficas, pues la degradación de AT, debido a que es energéticamente desfavorable (34.9 kJ/mol) necesita que la presión parcial de hidrógeno se mantenga baja en la fase gaseosa del cultivo para que la degradación de ácido tereftálico continúe y ya que la degradación de AT no se detuvo está opción es factible. También vale la pena mencionar que las concentraciones de AT usadas en la presente investigación podrían ser mayores, pues el inóculo continuó con la degradación de dichas concentraciones con decrementos poco marcados en el consumo del AT. Tabla 14

Por otro lado la producción de intermediarios de degradación del ácido tereftálico puede inhibir la misma, es decir, al existir en el sistema un compuesto más sencillo que el AT o más sencillo de degradar que este los microorganismos tendrán preferencia por consumir este ultimo en lugar de AT, lo cual podría suceder con el acetato y benzoato, a pesar de que este detectó muy pocas veces en el sistema. El acetato remanente en el sistema puede ser un importante evidencia de que en el presente cultivo mixto las poblaciones metanogénicas acetoclásticas son pequeñas. Además de los intermediarios capaces de inhibir la degradación del AT en los sistemas metanogénicos, también se ha reportado el hecho de que concentraciones superiores a los 200 mM de sodio inhiben la metanogénesis y la degradación de AT (Fajardo et al. 1997), esas concentraciones de sodio provienen de proporcionar el AT en forma de sal de sodio, neutralizándolo con hidróxido de sodio. Por lo que se han propuesto otros sistemas diferentes a los reactores UASB, como los TFF, o en el caso de usar UASB lo mejor es usarlo en un régimen continuo que no permita la acumulación de dicho ión.

Tabla 14. Velocidades de degradación determinadas en esta tesis.

	Biomasa	AT	Velocidad de consumo
Sistema desnitrificante	2.43 g SSV/l	249 mg/l	2.6 mg/lh
	2.43 g SSV/l	498 mg/l	12.13 mg/lh
Sistema metanogénico	2.43 g SSV/l	249 mg/l	1.7 mg/lh
	2.43 g SSV/l	498 mg/l	9.28 mg/lh
	3 g SSV/l	600 mg/l	19 mg/lh
	3 g SSV/l	2000 mg/l	8 mg/lh
	3 g SSV/l	3000 mg/l	4.8 mg/lh

6. Perspectivas.

Si bien en esta investigación se logró la degradación de ácido tereftálico en condiciones metanogénicas en concentraciones de hasta 3 g/l, queda abierto a trabajos posteriores el aumento en la concentración de ácido tereftálico que pueda consumirse en el reactor así como el funcionamiento del mismo en forma continua. En la presente investigación se le operó como lote secuencial. Además sería de suma importancia llevar el modelo experimental a un ambiente real, es decir, realizar investigaciones donde el agua a tratar sea agua industrial real que como ya se comentó contiene otros compuesto extras al AT, los cuales podrían desplazar el consumo de AT si es que fueran más sencillos de degradar o podrían volver el entorno más toxico limitando el desarrollo del consorcio metanogénico. En esta investigación los resultados obtenidos corresponden a un modelo meramente de laboratorio, e incluso el AT degradado era de grado analítico. También sería de gran interés estudiar el desempeño del inóculo en un reactor diferente como los TFF, los cuales ofrecen ventajas sobre un UASB, como el crecimiento mayor de la población bacteriana, lo que generaría una mayor velocidad de degradación reduciendo los tiempos de retención hidráulica y aumentando la producción de biogás. De hecho autores como Macarie y col. (1992) concluyen que el uso de un reactor UASB no es la mejor elección para el tratamiento de estas aguas residuales y proponen el uso de reactores tubulares de película fija. El autor propone el uso de los reactores TFF principalmente por las facilidades de desarrollo que proporciona al inóculo anaerobio. Los reactores TFF promueven un mayor crecimiento de biomasa que el UASB, pues estos están limitados por la pobre transferencia de masa, en comparación con un reactor TFF. Dicha desventaja de los UASB genera que solo una parte de la cama de lodos este en contacto con el contaminante y por lo tanto activa para participar en la remoción de DQO del influente. En cambio en un reactor TFF la mejor transferencia de masa genera que haya una mejor distribución de la biomasa en el reactor, principalmente por el flujo descendente, el cual también al chocar con las burbujas en su camino ascendente genera perturbaciones que favorecen el mezclado, con lo cual la biomasa se distribuye por el reactor, lo cual provoca que la mayoría de la biomasa se encuentre activa y además le confiere resistencia a los coloides tóxicos que pueden contener estas aguas, que en los reactores UASB pueden ser atrapados en la cama de lodos inhibiendo la actividad bacteriana (L.Grady and G.Daigger 1999; Macarie et al. 1992).

En cuanto a los reactores UASB, es importante inducir la formación de flóculos o gránulos en los cuales el desarrollo de las poblaciones metanogénicas será mayor. Para este fin se pueden usar varias estrategias como colocar el reactor en continuo, recircular los lodos a un sedimentador, los lodos sedimentados se ingresan nuevamente al reactor. También es posible que la presencia de sólidos suspendidos en el inóculo facilite la formación de flóculos pues servirían como soporte para la formación de los mismos, la alimentación de concentraciones similares de DQO también favorecerá la estabilización de la población y la formación de flóculos, el aumento de la densidad de población también favorecerá el aumento de la densidad lo que también favorecerá la formación de flóculos (Macarie et al. 1992; Wu et al. 1987).

También sería interesante que el montaje de un reactor desnitrificante usando el mismo inóculo pues debido a los orígenes del mismo es posible que se obtenga un mejor desempeño de los

microorganismos presentes pues la mayoría de las bacterias capaces de realizar la desnitrificación son aerobias facultativas, además de que estas bacterias son comunes en plantas de tratamiento de aguas residuales, sin embargo no debe de perderse de vista el hecho de que si se desea mantener las proporciones estequiométricas de la desnitrificación es posible que sólo pueda degradarse, bajo este régimen, la concentración de AT equivalente a la de un tercio de la concentración del ion nitrato, pues este es toxico para los microorganismos a concentraciones superiores a los 20 mM (1.28 g/l del ion nitrato), sin embargo un reactor continuo desnitrificante podría arrojar resultados sumamente interesantes.

La investigación de la composición poblacional de inóculo podría ser también muy interesante, pues en reportes sobre la composición de inóculos capaces de degradar estos compuestos se ha reportado que la mayoría de la población se encuentra conformada por δ -proteobacterias, bacterias no sulfatoredutoras y grupos metanogénicos (Chen et al. 2004; Yang-Ling Qiu 2004), sin embargo muchos de estos análisis se han realizado solo a inóculos cuyo origen es un digestor anaerobio, reportes similares a este donde se analizara la población de lodos activados aerobios adaptados a la anaerobiosis. De hecho haciendo referencia al origen del inóculo se ha reportado que en la mayoría de los lodos activados se encuentran bacterias desnitrificantes y bacterias como *Pseudomonas* (Banihani et al. 2009; Ejertsson et al. 1996a). Sin embargo también se ha demostrado que en lodos activados también existen bacterias anaerobias salvo en los lodos activados que se han gaseado con oxígeno puro (Jer-Horng Wu 2001; Kim and Speece 2002).

Por otra parte este inóculo, del cual se obtuvo un volumen extra al original en fechas recientes, podría ser usado para otras investigaciones de biodegradación en la Unidad puesto que es evidente que puede consumir compuestos monoaromáticos (presente investigación) además de que su versatilidad también se puso a prueba arrojando resultados interesantes como la adaptación a condiciones metanogénicas, por otro lado el hecho de que la planta de tratamiento de donde se obtuvo se encuentre en una zona densamente poblada y además rodeada de diferentes zonas industriales abre la posibilidad de que el inóculo sea capaz de degradar otros contaminantes presente en diferentes efluentes, podrían probarse la biodegradación de componentes compuestos clorados, compuestos de la familia BTEX, etcétera. Además una posibilidad importante que surge por la naturaleza del inóculo es el uso sistemas mezclados o anóxicos-anaerobios, estos sistemas donde existen dos aceptores de electrones externos, en este caso se podría montar un sistema desnitrificante-metanogénico, el cual sería un estudio muy interesante que podría arrojar resultados de mayor degradación para el AT por la existencia de dos ambientes en conjunción donde habría más variedad en las poblaciones que consumen el AT. (Beristain-Cardoso et al. 2009; Tugtas 2007)

7. Conclusiones.

1. Es posible degradar ácido tereftálico en condiciones desnitrificantes y metanogénicas de forma separada, haciendo uso de un inóculo proveniente de un sistema aerobio adaptado a las condiciones mencionadas.
2. El sistema desnitrificante degrada más rápido el AT en 100 horas, mientras que el metanogénico lo degrada en 150 horas, esto en una concentración de 1.5 mM.
3. La velocidad de degradación para la desnitrificación en botellas serológicas fue de 12 mg AT/l h, mientras que para la metanogénesis fue de 9 mg AT/l h, ambos sistemas con una concentración de 0.5 g/l de AT.
4. En la degradación en ambos sistemas (metanogénico y desnitrificante) se acumula acetato, en concentraciones que no superan las 30 ppm, al parecer el sistema usado en esta investigación degrada el ácido tereftálico sin la acumulación de intermediarios aromáticos o ácidos orgánicos de cadena larga que sean detectables con los métodos analíticos usados en esta investigación.
5. La desnitrificación presenta velocidades de biodegradación superiores a los del sistema metanogénico, sin embargo este sistema puede estar limitado por las concentraciones demasiado elevadas de nitrato necesarias para la degradación del ácido tereftálico, lo cual generaría un sistema tóxico para la mayoría de los microorganismos. Sin embargo también parece ser que el nitrato no es estrictamente necesario para la degradación de AT, en el sistema lo cual puede verse en el hecho de que el consumo del AT no se vio alterado a pesar de que solo restaba el 20% de nitrato para consumir cerca del 70 % del AT en el sistema de las botellas serológicas.
6. De acuerdo a la composición de la fase gaseosa en la desnitrificación, la mayor parte del AT podría permanecer en la biomasa, puesto que los niveles de dióxido de carbono no son considerables. También parece ser que la desnitrificación fue incompleta en un principio, pues no existe nitrógeno en la fase gaseosa de la botella serológica, hacia el final de la degradación del AT el resto del nitrato presente en el sistema pudo haber sido consumido por DNRA.
7. En el sistema metanogénico el ácido tereftálico se descompone y sigue las siguientes proporciones aproximadas; 26% se transforma en metano, 28.6% en dióxido de carbono,

2.2 % se acumula en acetato que permanece remanente en el sistema y aproximadamente el 42% restante de carbonos es atrapado en la biomasa, aunque es mas probable que esta cantidad de carbono realmente se encuentre en intermediarios que no pudieron cuantificarse, pues debemos recordar que en la metanogénesis el crecimiento de biomasa es sumamente lento. Para la desnitrificación las proporciones son muy distintas transformándose el 6.6% en dióxido de carbono, el 2% en acetato y cerca del 90% del AT se atrapa en la biomasa y en intermediarios no detectados.

8. La velocidad de degradación del ácido tereftálico en el sistema metanogénico fue muy variada, sin embargo con las concentraciones promedio se obtuvo una remoción promedio de 8.5 mg/lh sin embargo dado que el consumo de AT no se detuvo aun con la concentración de AT de 3 g/l es posible que la concentración inhibitoria se encuentre por arriba de los tres gramos.
9. Las velocidades de degradación del AT en el reactor UASB para la concentración de 2 g/l y de 3 g/l de AT fueron de 187 mg/l h y de 113 mg/l h, respectivamente. Las concentraciones usadas en el reactor se consumen en un lapso de 15 días, donde se obtiene un 90% de degradación. Es importante el montaje de un reactor en sistema continuo para la degradación de AT, para tratar concentraciones superiores y evitar las interferencias producto de la acumulación de acetato y posiblemente de sodio.
10. La cantidad de metano presente en la fase gaseosa del reactor es sumamente variable, obteniéndose desde el 6% (v/v) de concentración hasta de 41% (v/v), esto se debe primeramente el hecho de que el cultivo por lote alimentado permite la acumulación de acetato, inhibidor de la metanogénesis y a que el AT va desapareciendo con lo cual la fuente de donde las arqueas metanogénicas esperarían el sustrato se agota, limitando la producción de metano. Por otro lado es posible que la población metanogénica hidrogenotrófica sea la más grande que la acetoclástica, generando una menor concentración de metano, lo cual también podría explicar por qué el acetato se acumula.

8. Anexos.

Anexo 1 Cuantificación de ácido tereftálico por electroforesis capilar.

Para la cuantificación del ácido tereftálico se usó un equipo de electroforesis capilar de Beckman Coulter. La fase móvil fue buffer de fosfatos con un pH de 11. El pH se ajustó con NaOH 0.1M y H_3PO_4 0.1 M. El buffer también contenía α -ciclodextrina y β -ciclodextrina y PEG-8000, todas las soluciones se prepararon con agua milliq, las cantidades exactas de cada componente para preparar 50ml de buffer se presentan en la Tabla 14. Todas las soluciones se filtraron con membrana de metilcelulosa con poros de 0.22 μ m de diámetro para retirar cualquier partícula suspendida presente en la solución el cual podría tapar el capilar. Previo a realizar las determinaciones correspondientes el capilar debe de recibir un pretratamiento para estabilizarlo, dicho proceso consiste en un primer lavado con agua milliq con una presión de 10psi por 5 minutos, posteriormente se realiza un segundo lavado con NaOH 0.1M una presión de 10psi por 3 minutos, después se realiza un último lavado con buffer de separación durante 5 minutos a 10 psi de presión.

Las características del equipo y las condiciones usadas para la determinación fue un capilar de longitud de 67 cm, la detección se realizó con longitud de onda de 215nm, un voltaje de 23kV y una temperatura de inyección de 25°C. Previo a cada determinación se realizó un lavado con buffer de separación durante 3 minutos con 20psi de presión, posteriormente se realizó la inyección con un tiempo de inyección de 3 segundos con una presión de 0.3psi, posterior a esto se dio un tiempo de espera de 30 segundos, antes de realizar la separación. El pico correspondiente al ácido tereftálico se detectó a los 12 minutos. Para la presente investigación se planteó la curva de calibración siguiente.

Tabla 15. Curva de calibración para el AT.

mMoles de ácido tereftálico	Miligramos de ácido tereftálico	Proporciones
3mM	498 mg	750 μ l stock+750 μ l de agua
2.5mM	415 mg	625 μ l stock+875 μ l de agua
2mM	332 mg	500 μ l stock+1000 μ l de agua
1.5mM	249 mg	375 μ l stock+1125 μ l de agua
1mM	166 mg	250 μ l stock+1250 μ l de agua
0.5mM	83 mg	125 μ l stock+1375 μ l de agua

El valor del coeficiente de correlación fue de 0.939, la ecuación de calibración fue $[AT] = 1590x - 17636$

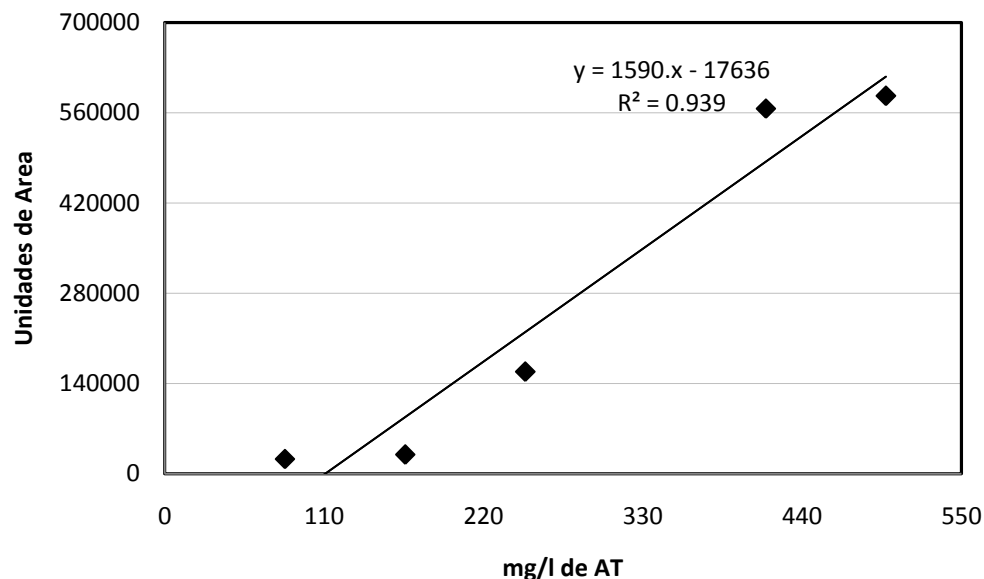


Figura 26. Curva de calibración para AT.

Anexo 2. Análisis de la composición de la fase gaseosa de los cultivos por cromatografía de gases.

Para la cromatografía de gases fue necesario realizar curvas patrón para cada uno de los gases que se determinaron, en este caso dióxido de carbono, metano y nitrógeno. Las determinaciones se realizaron en un cromatografo de gases Este análisis se realizó por cromatografía de gases con un equipo Autosystem de Perkin Elmer, con una columna empacada Altek de 12 ft, diámetro interior de 0.085 in y un diámetro exterior de 1/8 in. Se uso helio como gas acarreador al 5.5% con un flujo de 30 ml/min. La temperatura inicial del horno fue de 80 °C alcanzando una temperatura final de 110 °C, con una rampa de 10 °C/min. La temperatura del inyector fue de 70 °C. La determinación tomó un tiempo total de 3 minutos con un detector TCD a 200 °C, este tipo de detectores se basa en la variación de la conductividad térmica del gas acarreador cuando fluye a la par el analito. A continuación de muestran la curvas de calibración para cada uno de los gases cuantificado con la cromatografía.

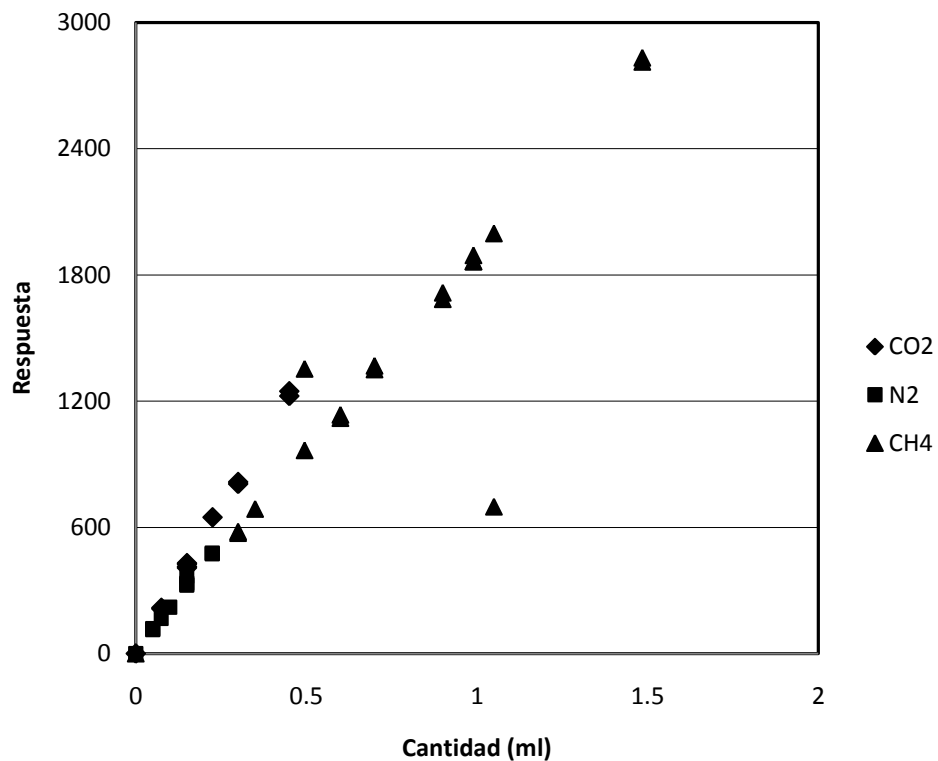


Figura 27. Curvas de calibración para metano, dióxido de carbono y nitrógeno gaseoso.

La curva de calibración para el metano fue $1715x + 96.5$ con un coeficiente de correlación de 0.826. En el caso del dióxido de carbono la curva de calibración fue $2720x + 9.53$ con un coeficiente de correlación de 0.998. Para el nitrógeno se obtuvo una curva de calibración de $2126x + 9.97$ con un coeficiente de correlación de 0.991.

Anexo 3. Calibración para el acetato.

La cuantificación de estos compuestos se realizó con un equipo de HPLC (Varian), se filtraron 2 ml de muestra a través de membranas de 0.22 μm de nitrocelulosa, las muestras filtradas fueron separadas en una columna Aminex HPX-87H (300mm x 7.8mm) de exclusión de iones. Las lecturas se realizaron a 210 nm. La fase móvil fue ácido sulfúrico al 0.008 N con un flujo de 0.6 ml/min.

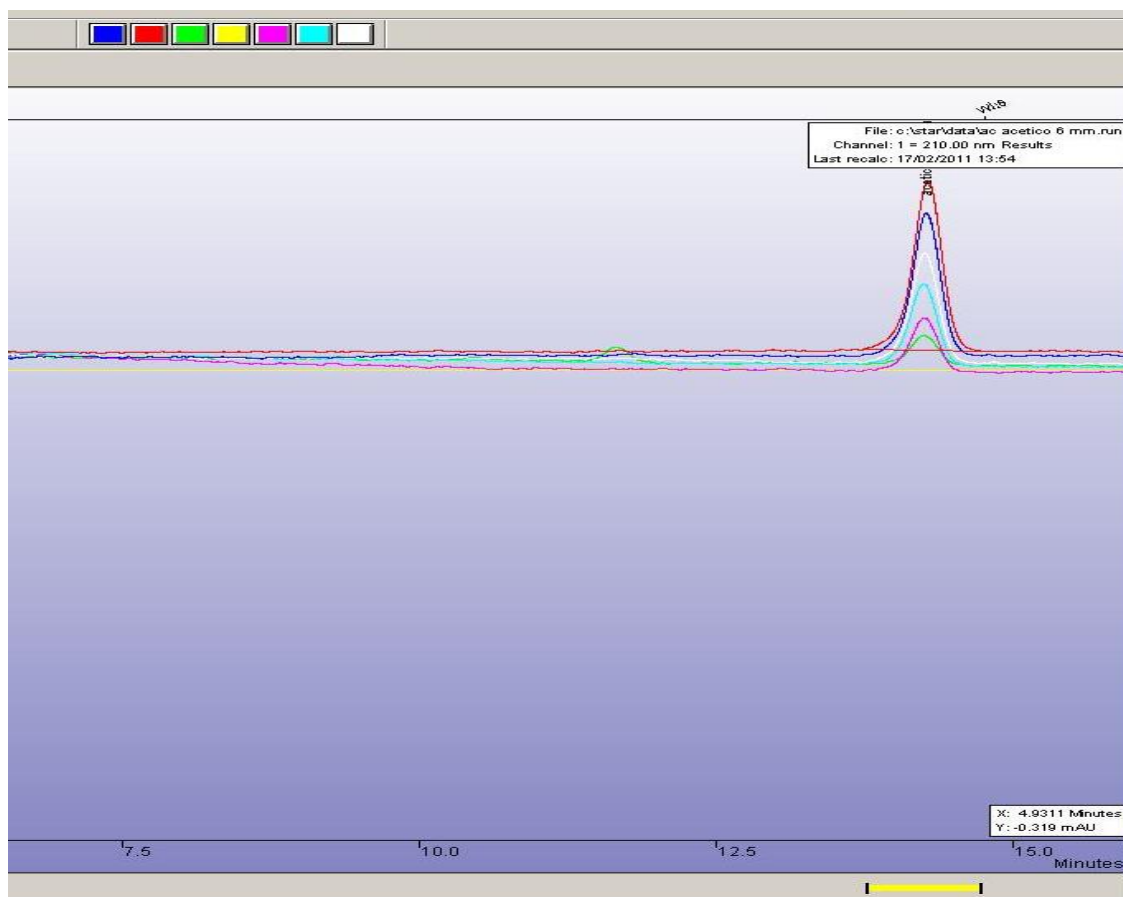


Figura 28. Curva de calibración para el acetato.

Bibliografía.

- Aftring RP, Chalker BE, Taylor BF. 1981. Degradation of phthalic acids by denitrifying, mixed cultures of bacteria. *Appl Environ Microbiol* 41(5):1177-83.
- APHA. 1999. *Standar Methods for the Examination of Water*: APHA.
- Baker KH, Herson DS. 1999. *Bioremediation*: Mc Graw Hill.
- Banihani Q, Sierra-Alvarez R, Field JA. 2009. Nitrate and nitrite inhibition of methanogenesis during denitrification in granular biofilms and digested domestic sludges. *Biodegradation* 20(6):801-12.
- Battersby NS, Wilson V. 1989. Survey of the anaerobic biodegradation potential of organic chemicals in digesting sludge. *Appl Environ Microbiol* 55(2):433-9.
- Beristain-Cardoso R, Texier A-C, Razo-Flores E, Méndez-Pampín R, Gómez J. 2009. Biotransformation of aromatic compounds from wastewaters containing N and/or S, by nitrification/denitrification: a review. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 8(4):325-342.
- Centroamérica-Europa Adae. 2007. *Acuerdo de asociación entre Centroamérica-Europa*
- Chen C-L, Macarie H, Ramirez I, Olmos A, Ong SL, Monroy O, Liu W-T. 2004. Microbial community structure in a thermophilic anaerobic hybrid reactor degrading terephthalate. *Microbiology* 150(10):3429-3440.
- Dai G, Cui L, Song L, Gong N, Chen J, Zhao R, Wang S, Chang HC, Wang X. 2005. Terephthalic acid occupational exposure and its effect on organ functions in fiber workers. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 20(1):209-214.
- Dolfing J, Tiedje JM. 1988. Acetate inhibition of methanogenic, syntrophic benzoate degradation. *Appl Environ Microbiol* 54(7):1871-3.
- Dylewsky SW. 1981. *Organic Chemical Manufacturing, Volume 7: Selected Processes*. Research Triangle Park, NC.
- E.Rittmann B, McCarty PL. 2001. *Environmental Biotechnology: principles and aplications*: Mc Graw Hill.
- Ejlertsson J, Johansson E, Karlsson A, Meyerson U, Svensson B. 1996a. Anaerobic degradation of xenobiotics by organisms from municipal solid waste under landfilling conditions. *Antonie van Leeuwenhoek* 69(1):67-74.
- Ejlertsson J, Johansson E, Karlsson A, Meyerson U, Svensson BH. 1996b. Anaerobic degradation of xenobiotics by organisms from municipal solid waste under landfilling conditions. *Antonie van Leeuwenhoek* 69(1):67-74.
- Ejlertsson J, Meyerson U, Svensson BH. 1996c. Anaerobic degradation of phthalic acid esters during digestion of municipal solid waste under landfilling conditions. *Biodegradation* 7(4):345-352.
- Fajardo C, Guyot JP, Macarie H, Monroy O. 1997. Inhibition of anaerobic digestion by terephthalic acid and its aromatic by products. *Wat. Sci. Tech.* 36:83-90.
- Fdz-Polanco F, Hidalgo MD, Fdz-Polanco M, García Encina PA. 1999. Anaerobic treatment of Polyethylene Terephthalate (PET) wastewater from lab to fullscale. *Water Science and Technology* 40(8):229-236.
- Ferro CT. 2008. *El envase de polietilentereftalato: su impacto ambiental y los métodos para su reciclado*. La Habana, Cuba: Editorial Universitaria.

- Field JA, Stams AJ, Kato M, Schraa G. 1995. Enhanced biodegradation of aromatic pollutants in cocultures of anaerobic and aerobic bacterial consortia. *Antonie van Leeuwenhoek* 67(1):47-77.
- Gonzales S. 2007. Determinación de parámetros cinéticos y de inhibición por sulfuro en un reactor UASB sulfato-reductor. San Luis Potosí: Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica.
- Grbic-Galic D, Vogel TM. 1987. Transformation of toluene and benzene by mixed methanogenic cultures. *Appl Environ Microbiol* 53(2):254-60.
- Heise L. 2004. Deskstudy phthalates. Berlin: German Federal Environmental Agency.
- Jer-Horng Wu W-TL, I-Cheng Tseng and Sheng-Shung Cheng. 2001. Characterization of microbial consortia in a terephthalate-degrading anaerobic granular sludge system. *Microbiology* 147:373-382.
- Jianlong W, Lujun C, Hanchang S, Yi Q. 2000. Microbial degradation of phthalic acid esters under anaerobic digestion of sludge. *Chemosphere* 41(8):1245-1248.
- Jianlong W, Ping L, Yi Q. 1999. Microbial metabolism of di-butyl phthalate (DBP) by a denitrifying bacterium. *Process Biochemistry* 34(6-7):745-749.
- KEGG. 2010. Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation.
- Kim M, Speece RE. 2002. Aerobic waste activated sludge (WAS) for start-up seed of mesophilic and thermophilic anaerobic digestion. *Water Research* 36(15):3860-3866.
- Kleerebezem R, Beckers J, Hulshoff Pol LW, Lettinga G. 2005. High rate treatment of terephthalic acid production wastewater in a two-stage anaerobic bioreactor. *Biotechnol Bioeng* 91(2):169-79.
- Kleerebezem R, Hulshoff Pol LW, Lettinga G. 1999a. Anaerobic biodegradability of phthalic acid isomers and related compounds. *Biodegradation* 10(1):63-73.
- Kleerebezem R, Hulshoff Pol LW, Lettinga G. 1999b. Anaerobic degradation of phthalate isomers by methanogenic consortia. *Appl Environ Microbiol* 65(3):1152-60.
- Kleerebezem R, Hulshoff Pol LW, Lettinga G. 1999c. The role of benzoate in anaerobic degradation of terephthalate. *Appl Environ Microbiol* 65(3):1161-7.
- Kleerebezem R, Mortier J, Hulshoff Pol LW, Lettinga G. 1997. Anaerobic pre-treatment of petrochemical effluents: Terephthalic acid wastewater. *Water Science and Technology* 36(2-3):237-248.
- Koster IW, Cramer A. 1987. Inhibition of methanogenesis from acetate in granular sludge by long-chain Fatty acids. *Appl Environ Microbiol* 53(2):403-9.
- L. Grady, G. Daigger. 1999. Biological wastewater treatment. New York. USA: Marcel Dekker.
- Liang D-W, Zhang T, Fang H. 2007. Denitrifying degradation of dimethyl phthalate. *Applied Microbiology and Biotechnology* 74(1):221-229.
- Liu SM, Chi WC. 2003. CO₂-H₂-dependent anaerobic biotransformation of phthalic acid isomers in sediment slurries. *Chemosphere* 52(6):951-958.
- Lowe SE, Jain MK, Zeikus JG. 1993. Biology, ecology, and biotechnological applications of anaerobic bacteria adapted to environmental stresses in temperature, pH, salinity, or substrates. *Microbiol Rev* 57(2):451-509.
- Macarie H, Noyola A, Guyot JP. 1992. Anaerobic treatment of petrochemical wastewater from a terephthalic acid plant. *Wat. Sci. Tech.* 25:223-235.
- Maier RM. 2000. Environmental microbiology: Academic Press.
- Masuda T, Miwa Y, et al. 1997. Degradation of waste poly(ethyleneterephthalate) in a steam atmosphere to recover terephthalic acid and to minimize carbinaceous residues. *Polymer degradation and stability* 58:315-320.

- Nozawa T, Maruyama Y. 1988. Anaerobic metabolism of phthalate and other aromatic compounds by a denitrifying bacterium. *J Bacteriol* 170(12):5778-84.
- R.Kleerebezem, Lettinga LWHyG. 1999. Anaerobic biodegradability of phthalic acid isomers and related compounds. *Biodegradation* 10:63-73.
- Schink B. 1997. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiol Mol Biol Rev* 61(2):262-80.
- Schink B, Philipp B, Müller J. 2000. Anaerobic Degradation of Phenolic Compounds. *Naturwissenschaften* 87(1):12-23.
- Shelton DR, Tiedje JM. 1984. General method for determining anaerobic biodegradation potential. *Appl Environ Microbiol* 47(4):850-7.
- Thauer RK. 1998. Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson:1998 Marjory Stephenson Prize Lecture. *Microbiology* 144(9):2377-2406.
- Thiruvengkatachari R, Kwon TO, Jun JC, Balaji S, Matheswaran M, Moon IS. 2007. Application of several advanced oxidation processes for the destruction of terephthalic acid (TPA). *Journal of hazardous materials* 142(1-2):308-314.
- Tugtas AE. 2007. Effect of nitrate reduction on the methanogenic fermentation: process interactions and modeling: Georgia Institute of Technology.
- Vamsee-Krishna C, Phale P. 2008. Bacterial degradation of phthalate isomers and their esters. *Indian Journal of Microbiology* 48(1):19-34.
- Vavilin V, Jonsson S, Svensson B. 2005. Kinetic analysis of the transformation of phthalate esters in a series of stoichiometric reactions in anaerobic wastes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 69(4):474-484.
- Watts. 1997. Bioremediation.
- Wilson LP, Bouwer EJ. 1997. Biodegradation of aromatic compounds under mixed oxygen/denitrifying conditions: a review. *J Ind Microbiol Biotechnol* 18(2-3):116-30.
- Wu J-H, Liu W-T, Tseng I-C, Cheng S-S. 2001. Characterization of microbial consortia in a terephthalate-degrading anaerobic granular sludge system. *Microbiology* 147(2):373-382.
- Wu W, Hu J, Gu X, Zhao Y, Zhang H, Gu G. 1987. Cultivation of anaerobic granular sludge in UASB reactors with aerobic activated sludge as seed. *Water Research* 21(7):789-799.
- Yan-Ling Qiu YS, al. e. 2006. *Pelotolomaculum terephthalicum* sp. nov. and *Pelotolomaculum isophthalicum* sp.nov.:two anaerobic bacteria that degrade phthalate isomers in syntrophic association with hydrogenotrophic methanogens. *Arch Microbiology* 185:172-182.
- Yang-Ling Qiu YS, Hiroyuki Imachi, Yoichi Kamagata, I-Cheng Tseng, Sheng-Shung Cheng, Akiyoshi Ohashi and Hideki Harada. 2004. Identification and Isolation of Anaerobic, sintrophic phthalate isomer-degrading microbes from methanogenic sludges treating wastewater from terephthalate manufacturing. *Applied and environmental microbiology* 70(3):1617-1626.
- Zeikus JG. 1977. The biology of methanogenic bacteria. *Bacteriol Rev* 41(2):514-41.
- Zhang C, Bennett GN. 2005. Biodegradation of xenobiotics by anaerobic bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 67(5):600-18.