



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

---

---

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA  
CENTRO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS

## Diseño de una prueba de biodegradabilidad anóxica de compuestos orgánicos en medio líquido

### TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN QUÍMICA

PRESENTA:

MARÍA DE LOS ÁNGELES MARTÍNEZ PÉREZ

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. GABRIELA ALEJANDRA VÁZQUEZ RODRÍGUEZ



El presente trabajo se realizó gracias al financiamiento otorgado por el Programa para el Mejoramiento del Profesorado (PROMEP) para el desarrollo del proyecto de investigación titulado “Biodegradación de moléculas xenobióticas en reactores discontinuos de alimentación secuenciada” (Responsable: Dra. Gabriela Alejandra Vázquez Rodríguez).

María de los Ángeles Martínez Pérez agradece a PROMEP la beca de Licenciatura otorgada.

Parte de esta tesis fue presentada en los siguientes eventos académicos:

- **Martínez P.M.A.**, Beltrán H.R.I. y Vázquez R.G.A. (2006) Biodegradación anóxica de compuestos orgánicos en medio líquido. Memorias del *XI Congreso Nacional y V Internacional de Ciencias Ambientales* (ISBN: 968-878-265-3), Academia Nacional de Ciencias Ambientales, Oaxtepec Mor., 7-9 junio.
  
- **Martínez P.M.A.**, Beltrán H.R.I. y Vázquez R.G.A. (2005) Diseño de una prueba de biodegradabilidad anóxica de compuestos orgánicos en medio líquido. Memorias del *X Congreso Nacional y IV Internacional de Ciencias Ambientales*, Academia Nacional de Ciencias Ambientales, Chetumal Q. Roo, 8-10 junio.
  
- **Martínez M.A.**, Beltrán R.I., Coronel C. y Vázquez G. (2005) Selección del inóculo para una prueba de biodegradabilidad anóxica en medio líquido. *1<sup>st</sup> International Workshop of Biotechnology*, Universidad Politécnica de Pachuca, Pachuca Hgo., 21-25 noviembre.

Así mismo, dio lugar a la publicación del siguiente artículo:

- **Martínez P.M.A.**, Beltrán H.R.I. y Vázquez R.G.A. (2005) Diseño de una prueba de biodegradabilidad anóxica de compuestos orgánicos en medio líquido. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, Vol. 21 Supl. 1, 625-630.

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Ciencias Ambientales, perteneciente al Centro de Investigaciones Químicas, de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

---

---

*A mis Padres  
y hermanos*

---

---

---

---

## AGRADECIMIENTOS

Expreso mi más sincero agradecimiento a la Dra. Gabriela Alejandra Vázquez Rodríguez, por haber dirigido mi proyecto de tesis, quién me otorgó sus conocimientos, paciencia y confianza.

A la Dra. Rosa Icela Beltrán Hernández, por brindarme su ayuda y orientación en diversos aspectos de este trabajo.

A mis padres, Silverio Martínez Juárez y Petra Pérez Ángeles, por su amor y apoyo incondicional.

A mis hermanos, Fabián y Patricia, por su amor, apoyo y comprensión.

Agradezco a José Alberto, los momentos tan maravillosos que pasamos juntos en clase y en el laboratorio.

A mis compañeros y amigos, por brindarme todo su apoyo:

Dora, Alina, Violeta, Felipe, Claudia, Yosselin y Ubaldo.

A todas las personas que de alguna manera colaboraron conmigo en el desarrollo de esta investigación.

---

---

**ÍNDICE**

	Página
<b>LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS</b>	v
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	vi
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	viii
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>2. MARCO TEÓRICO</b>	2
2.1 BIODEGRADACIÓN DE MOLÉCULAS XENOBIÓTICAS	2
2.1.1 Efecto de la actividad microbiana	3
2.1.2 Consecuencias ambientales	6
2.2 LAS PRUEBAS NORMALIZADAS DE BIODEGRADABILIDAD	7
2.2.1 Pruebas de biodegradabilidad inmediata	8
2.2.2 Pruebas de biodegradabilidad intrínseca	11
2.2.3 Pruebas de simulación	13
2.2.3.1 Pruebas de biodegradabilidad en medio sedimentario	14
2.3 EL MEDIO SEDIMENTARIO	15
2.3.1 Principales características de los sedimentos	15
2.3.1.1 Composición	15
2.3.1.2 Estructura	17
2.3.2 Contaminantes orgánicos	18
2.3.3 Repartición de los contaminantes en los sedimentos	20
2.3.4 Factores de control de la repartición de los contaminantes	21
2.3.4.1 pH	21
2.3.4.2 Potencial redox	22

2.3.4.3 Capacidad de intercambio catiónico y superficie específica	24
2.3.4.4 Dureza y salinidad	24
2.3.4.5 Fracción mineral	24
2.3.5 Importancia de los procesos anóxicos en el medio sedimentario	25
2.3.5.1 La desnitrificación en el medio sedimentario	26
<b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN</b>	<b>28</b>
3.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	28
3.2 JUSTIFICACIÓN	28
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>30</b>
4.1 OBJETIVO GENERAL	30
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>31</b>
5.1 MATERIAL SEDIMENTARIO	31
5.2 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE SEDIMENTOS	32
5.2.1 Análisis de textura	32
5.2.2 Determinación de pH	33
5.2.3 Análisis de iones nitrato	34
5.2.4 Análisis de iones nitrito	34
5.2.5 Análisis de carbono orgánico	34
5.2.6 Análisis de carbono inorgánico	35
5.2.7 Análisis de fósforo	36
5.2.8 Determinación del contenido de humedad	36
5.3 PRUEBAS DE BIODEGRADABILIDAD ANÓXICA	37
5.3.1 Dispositivo experimental	38
5.3.2 Medición del CO <sub>2</sub> producido	38
5.4 PRUEBAS DE BIODEGRADABILIDAD AEROBIA	39

5.4.1 Método OCDE 301A	39
5.4.2 Método OCDE 301 F	40
5.5 INÓCULOS MICROBIANOS	41
5.5.1 Sedimentos lacustres	41
5.5.2 Extractos de sedimento	41
5.5.3 Inóculo comercial	41
5.6 ANÁLISIS DE LA VIABILIDAD CELULAR	42
5.7 ANÁLISIS DE MOLÉCULAS XENOBIÓTICAS	42
5.7.1 Medición colorimétrica de fenol	42
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>44</b>
6.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DE LOS SEDIMENTOS DE LA LAGUNA DE TECOCOMULCO, HGO.	44
6.2 VALIDACIÓN DEL DISPOSITIVO EXPERIMENTAL	48
6.3 SELECCIÓN DEL INÓCULO MICROBIANO	51
6.3.1 Pruebas de biodegradabilidad con un inóculo comercial (Polyseed®)	52
6.3.2 Prueba de biodegradabilidad con un sedimento entero	55
6.3.3 Prueba de biodegradabilidad con un extracto de sedimento	56
6.4 PRUEBAS DE BIODEGRADABILIDAD DE MOLÉCULAS XENOBIÓTICAS	59
6.4.1 Anilina	59
6.4.2 Fenol	61
<b>7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</b>	<b>67</b>
<b>8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>69</b>
<b>9. ANEXOS</b>	<b>73</b>
<b>A. ANILINA</b>	<b>73</b>

A.1 PRODUCCIÓN	73
A.2 USOS	73
A.3 DESCARGAS AL MEDIO AMBIENTE	73
A.4 TRANSPORTE	73
A.5 TRANSFORMACIÓN/PERSISTENCIA	74
<b>B. FENOL</b>	<b>75</b>
B.1 PRODUCCIÓN	75
B.2 USOS	75
B.3 DESCARGAS AL MEDIO AMBIENTE	75
B.4 TRANSPORTE	76
B.5 TRANSFORMACIÓN/PERSISTENCIA	76
<b>C. EL CICLO DEL NITRÓGENO</b>	<b>77</b>
C.1 AMONIFICACIÓN, NITRIFICACIÓN Y DESNITRIFICACIÓN	77

## LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

BPC	Bifenilos policlorados
CI	Cationes intercambiables
CIC	Capacidad de intercambio catiónico
CID	Carbono inorgánico disuelto
CO	Carbono orgánico
COC	Carbono orgánico coloidal
COD	Carbono orgánico disuelto
COP	Carbono orgánico particulado
COT	Carbono orgánico total
CV	Coefficiente de variación
DBO	Demanda bioquímica de oxígeno
DTO	Demanda teórica de oxígeno
ECB	Oficina Europea de Sustancias Químicas
Eh	Potencial redox
HAP	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
ISO	Organización Internacional de Normalización
Koc	Coefficiente de repartición
Kow	Coefficiente de repartición octanol-agua
Kp	Coefficiente de repartición de los productos orgánicos entre el agua y las partículas
OCDE	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico
PCE	Percloroetano
SCAS	<i>Semi Continuous Activated Sludge</i>
TCE	Tricloroetano
ThCO <sub>2</sub>	Producción teórica de CO <sub>2</sub>
t <sub>L</sub>	Tiempo de latencia
t <sub>1/2</sub>	Tiempo de vida media
UFC	Unidad formadora de colonias
US-EPA	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 2.1	5
Modelo hipotético para el cambio de población y metabolismo de un compuesto modificado por (A) mineralización y (B) cometabolismo (Alexander, 1981)	
Figura 2.2	11
Representación esquemática de un proceso de biodegradación (Vázquez-Rodríguez y Beltrán-Hernández, 2004)	
Figura 2.3	18
Curvas de isoconcentración del oxígeno disuelto (% de saturación) en función de un ciclo anual (Bonnet, 2000)	
Figura 2.4	20
Principales procesos que controlan el ciclo de los contaminantes en el medio acuático (Bonnet, 2000)	
Figura 2.5	22
Comportamiento de la toxicidad de las moléculas orgánicas en función del pH (Howe <i>et al.</i> , 1994)	
Figura 2.6	23
Hipótesis simplificadas de los principales ciclos biogeoquímicos en los sistemas sedimentarios de agua dulce en función del potencial redox (Eh en mv) (Bonnet, 2000)	
Figura 5.1	32
Recolección (A) e incubación (B) del sedimento a temperatura ambiente	
Figura 5.2	33
Diagrama triangular de clasificación de sedimentos en función de su textura (Campy y Meybeck, 1995)	
Figura 5.3	38
Dispositivo experimental de las pruebas de biodegradabilidad anóxica	
Figura 6.1	47
Porcentaje total de las fracciones que integran el sedimento	
Figura 6.2	49
Cinética de captura de CO <sub>2</sub> . Los puntos representan los datos experimentales; la línea continua, el ajuste del modelo logístico, y la discontinua, un nivel de 50% de recuperación de CO <sub>2</sub>	
Figura 6.3	53
Cinéticas de biodegradación anóxica de glucosa con suspensión de Polyseed <sup>®</sup> a (●) 10% v/v y (○) 1% v/v como niveles de inoculación	

Figura 6.4	Cinética de biodegradación aerobia de glucosa con suspensión de Polyseed® a 1% v/v como inóculo	54
Figura 6.5	Cinética de biodegradación anóxica de glucosa con sedimento lacustre entero como inóculo	55
Figura 6.6	Cinética de biodegradación anóxica de glucosa con extracto de sedimento lacustre como inóculo	58
Figura 6.7	Cinética de biodegradación anóxica de anilina con extracto de sedimento como inóculo	60
Figura 6.8	Cinética de biodegradación aerobia de anilina con suspensión de Polyseed® a 1% v/v como inóculo	61
Figura 6.9	Cinética de biodegradación anóxica de fenol con extracto de sedimento como inóculo	62
Figura 6.10	Biodegradación anóxica de fenol con extracto de sedimento como inóculo. Seguimiento de (●) la producción de CO <sub>2</sub> (mineralización) y (○) el consumo de fenol	63
Figura 6.11	Ruta metabólica de biodegradación anóxica de fenol (Evans y Fuchs, 1998)	63
Figura 6.12	(●) % de biodegradación y (○) consumo de fenol en la prueba aerobia OCDE 301 A con extracto de sedimento como inóculo	64
Figura 6.13	Cinética de biodegradación de fenol en la prueba aerobia 301 F con suspensión de Polyseed® a 1% v/v como inóculo	65
Figura C.1	Ciclo del nitrógeno (Schwedt, 1996)	78

## ÍNDICE DE TABLAS

	Página
iTabla 2.1	Persistencia de pesticidas en el suelo (Brock, 1999) 3
Tabla 2.2	Pruebas de biodegradabilidad normalizadas o en curso de normalización por parte de la OCDE y su correspondencia con pruebas ISO, US-EPA y ECB 9
Tabla 2.3	Condiciones experimentales de las pruebas de biodegradabilidad inmediata de la OCDE (1992) 10
Tabla 2.4	Condiciones experimentales de las pruebas de biodegradabilidad intrínseca de la OCDE (1992) 12
Tabla 2.5	Principales minerales que componen los sedimentos de agua dulce (Bonnet, 2000) 16
Tabla 2.6	Principales compuestos orgánicos presentes en sedimentos (Bonnet, 2000) 19
Tabla 5.1	Fechas de los muestreos realizados 31
Tabla 5.2	Composición del medio de cultivo anóxico (mg/l) 37
Tabla 5.3	Composición del medio de cultivo aerobio (mg/l) 40
Tabla 6.1	Caracterización fisicoquímica de los sedimentos muestreados durante la investigación 46
Tabla 6.2	Caracterización fisicoquímica de los extractos de sedimento utilizados en las pruebas de biodegradabilidad anóxica 57
Tabla 6.3	Tiempos de latencia ( $t_L$ ) y de vida media ( $t_{1/2}$ ) de la biodegradación de glucosa estudiada con los distintos inóculos 58

---

---

# INTRODUCCIÓN

---

---

### 1. INTRODUCCIÓN

La biodegradabilidad es un parámetro esencial para conocer el riesgo que representa la dispersión de las sustancias en el medio ambiente. Se define como la capacidad de las moléculas de ser degradadas por microorganismos para formar productos finales más simples. Esta propiedad del compuesto depende de las condiciones fisicoquímicas en las que se degrade, así como de su estructura química. Ésta última influye decisivamente en la descomposición natural de los compuestos orgánicos; así, la naturaleza química de muchos detergentes, plásticos, materiales de embalaje y residuos médicos los hace resistentes a la degradación microbiana.

Para estimar este parámetro, se han diseñado y normalizado varios protocolos experimentales, también llamados *pruebas de biodegradabilidad*, que buscan cuantificar la persistencia de estructuras químicas en ambientes naturales o industriales. Existen pruebas que simulan suelos, aguas superficiales o procesos de lodos activados, generalmente en condiciones óxicas. Sin embargo, en algunas situaciones cabe preguntarse acerca del destino del compuesto investigado en condiciones anóxicas, como las que prevalecen en las plantas de depuración anaerobia de aguas residuales, los sedimentos acuáticos o en ciertos horizontes del suelo. Por lo general, en condiciones óxicas la gama de compuestos químicos degradables es mayor y su degradación es más rápida que en condiciones anóxicas. Sin embargo, la dechloración reductora y la eliminación por nitro-sustitución reductora de algunos compuestos se aceleran en condiciones anóxicas.

Dado que la persistencia de una sustancia en ausencia de oxígeno puede conllevar su acumulación en ciertos compartimientos naturales, en este trabajo se propone el diseño de un protocolo experimental que permita evaluar la biodegradabilidad de moléculas orgánicas en medios anóxicos, y pueda ser utilizado como una herramienta de predicción del comportamiento de las mismas en el medio acuático.

---

---

# MARCO TEÓRICO

---

---

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 BIODEGRADACIÓN DE MOLÉCULAS XENOBIÓTICAS

La enorme cantidad de compuestos químicos de origen sintético, también llamados *xenobióticos*, que es descargada deliberadamente al ambiente representa un gran peligro para los diversos ecosistemas. Actualmente, se considera que tales compuestos están presentes en aguas superficiales y marinas, suelos y sedimentos.

En un ecosistema terrestre o acuático, las moléculas xenobióticas pueden estar sujetas a reacciones enzimáticas o no enzimáticas, realizadas por los organismos que habitan dicho ecosistema y por diversos factores ambientales, respectivamente. Se pueden dar mecanismos abióticos en sistemas acuáticos naturales y originar cambios en la sustancia química, como es el caso de las reacciones fotoquímicas. Sin embargo, es poco frecuente que ocurran reacciones no enzimáticas que originen cambios apreciables en la estructura del compuesto. Pocos mecanismos abióticos llegan a convertir completamente las moléculas orgánicas en productos que no produzcan efectos negativos al ambiente (Alexander, 1981). Por lo anterior, se considera que la biodegradación es el principal mecanismo de transformación de la materia orgánica en el medio ambiente.

Algunos compuestos xenobióticos poseen una estructura semejante a los compuestos que existen en el ambiente de forma natural; por ello, es factible que se degraden biológicamente. Por el contrario, pueden ser difícilmente biodegradables, o incluso persistir, aquellos compuestos xenobióticos que son químicamente muy diferentes a los naturales. Sin embargo, incluso compuestos químicos de estructura muy parecida pueden diferir grandemente en cuanto a su degradabilidad, como muestra la Tabla 2.1 en relación a la persistencia de diferentes pesticidas (Brock, 1999). No obstante, estos datos son sólo aproximaciones, puesto que la descomposición de una molécula está influenciada por una gran variedad de factores ambientales, tales como temperatura, pH, humedad, aireación, entre otros.

**Tabla 2.1** Persistencia de pesticidas en el suelo (Brock, 1999)

<b>Sustancia</b>	<b>Tiempo requerido para la desaparición del 75-100%</b>
<i><b>Insecticidas clorados</b></i>	
DDT [1,1,1-tricloro-2,2-bis-(p-clorofenil) etano]	4 años
Aldrin	3 años
Clordano	5 años
Heptacloro	2 años
Lindano (hexaclorociclohexano)	3 años
<i><b>Insecticidas organofosforados</b></i>	
Diazinón	12 semanas
Malatión	1 semana
Paratión	1 semana
<i><b>Herbicidas</b></i>	
2,4-D (ácido 2,4- diclorofenoxiacético)	4 semanas
2,4,5-T (ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético)	20 semanas
Dalapina	8 semanas
Atrazina	40 semanas
Simazina	48 semanas
Propazina	1.5 años

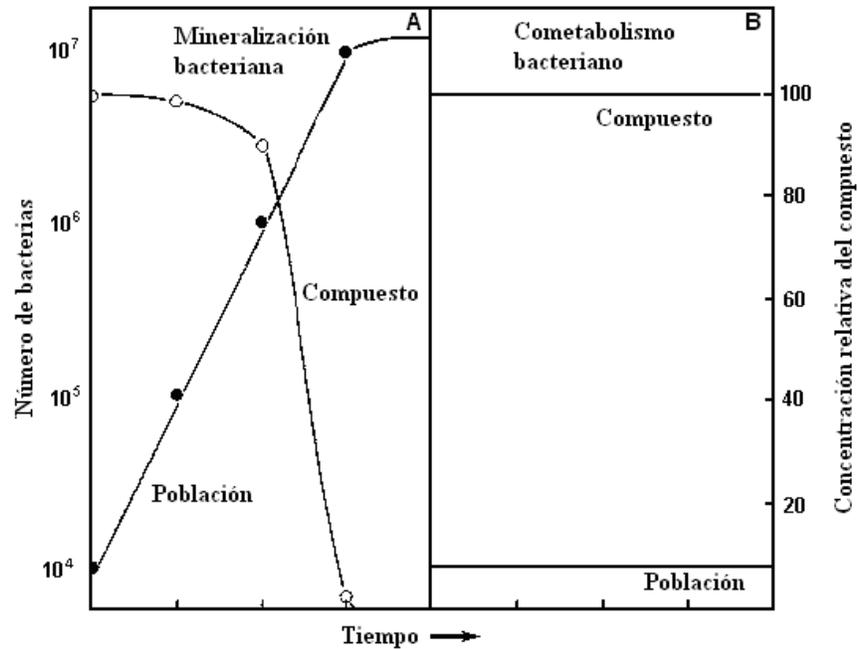
### 2.1.1 Efecto de la actividad microbiana

Frecuentemente, la acción de los microorganismos sobre una molécula orgánica se caracteriza por la mineralización o por su biodegradación. Ambos mecanismos llevan a cabo transformaciones en la molécula mediante una reacción que es catalizada biológicamente, produciendo compuestos más simples en el caso de la biodegradación, o bien, compuestos inorgánicos de bajo peso molecular cuando el mecanismo que se desarrolla es la *mineralización* (Alexander, 1981).

Cuando los microorganismos utilizan como sustrato una molécula orgánica, ésta les proporciona la energía y el carbono necesarios para sintetizar sus componentes celulares; al tiempo que aquéllos asimilan el carbono y obtienen energía, su masa aumenta. Sin embargo, los compuestos no biodegradables o persistentes difícilmente pueden constituir fuentes de carbono y sólo pueden ser atacados ligeramente, o definitivamente no serlo, aunque con frecuencia pueden ser degradados parcial o totalmente si en el medio hay algún otro compuesto que pueda servir como fuente primaria de carbono y energía. Este fenómeno se conoce como *cometabolismo* (Brock, 1999). Desde el punto de vista bioquímico, el cometabolismo es un fenómeno de biotransformación, del que se desprenden dos consecuencias ambientales.

Primeramente, la población responsable de la transformación no incrementa su masa, ni aún como resultado de la introducción directa del xenobiótico en el mismo medio. Esto no ocurre durante la mineralización, en donde el tamaño de la población aumenta luego de la introducción de un sustrato (Figura 2.1A). Esta ausencia de crecimiento refleja la incapacidad de los microorganismos para asimilar el xenobiótico y adquirir energía para la biosíntesis.

La velocidad de modificación estructural de un compuesto sujeto a cometabolismo es relativamente lenta, debido a que las poblaciones que actúan sobre muchos compuestos sintéticos son a menudo pequeñas en comparación a las que realizan la mineralización de compuestos biodegradables (Figura 2.1B). Los puntos trazados en la Figura 2.1A representan lo comúnmente observado cuando la población microbiana se encuentra en presencia de un sustrato que puede servir como fuente de carbono y energía para su crecimiento. En la Figura 2.1B se muestra un modelo hipotético para el cometabolismo, caracterizado por la falta de incremento en el tamaño de la población bacteriana y una escasa disminución en la concentración del compuesto químico cometabolizado. En este caso, otro material orgánico es utilizado como fuente primaria de carbono y energía.



**Figura 2.1** Modelo hipotético para el cambio de población y metabolismo de un compuesto modificado por (A) mineralización y (B) cometabolismo (Alexander, 1981)

En segundo lugar, los productos del cometabolismo, que son semejantes estructuralmente a los compuestos originales, suelen acumularse debido a que los organismos responsables de la modificación no forman la cantidad suficiente de enzimas para provocar una transformación notable en la molécula, como ocurre en secuencias metabólicas normales. La acumulación de productos de este tipo ha sido observada en ambientes naturales, ecosistemas modelo y cultivos microbianos en medios artificiales (Alexander, 1981).

Desafortunadamente, un cambio moderado en la estructura de la molécula puede no resultar en detoxificación, puesto que los microorganismos no pueden remover suficientemente la fracción de la molécula relacionada con la toxicidad para las diferentes especies que habitan en el ambiente (Alexander, 1981).

### 2.1.2 Consecuencias ambientales

En diferentes ecosistemas en los que han sido introducidos compuestos xenobióticos, la actividad microbiana resulta por lo general en una detoxificación. En este caso, la modificación de la sustancia ajena al ecosistema implica que las poblaciones bacterianas destruyen sus efectos potencialmente nocivos para una o más especies susceptibles, como animales, plantas o especies microbianas. Aunque la característica primordial de la mineralización es la detoxificación, en algunas secuencias metabólicas podrían perdurar por algún tiempo cierto tipo de intermediarios, por ejemplo, durante la conversión de herbicidas fenólicos en suelos para producir intermediarios fitotóxicos (Alexander, 1981).

No obstante, existen compuestos sintéticos que por sí mismos son inocuos, pero que al ser transformados enzimáticamente resultan ser nocivos para alguna u otra especie. Este proceso es a menudo llamado *activación*. Esto ha sido observado por Alexander (1981), quien reporta la conversión de compuestos inocuos a carcinógenos potentes, como las nitrosaminas. Gran parte de los precursores orgánicos e inorgánicos de nitrosaminas se encuentran muy difundidos, puesto que se encuentran en plantas superiores, fitoplancton, residuos de animales y en una gran cantidad de xenobióticos, por lo que son incorporados en grandes cantidades al medio ambiente. Los precursores orgánicos pueden ser aminas secundarias, terciarias, o compuestos que poseen nitrógeno cuaternario. El nitrito como precursor inorgánico es frecuentemente generado en suelo y agua durante la nitrificación. Se ha observado la formación de nitrosaminas en muestras de agua, aguas residuales y suelos utilizadas como ecosistemas modelo. En la simulación de estos ecosistemas se pueden nitrar aminas secundarias para producir compuestos carcinógenos, entre los que se encuentran dialquilaminas y dietanolaminas. La reacción de nitración puede ser catalizada enzimáticamente por componentes celulares bacterianos o por otros materiales orgánicos complejos (Alexander, 1981).

Otra clase importante de transformaciones implica la conversión de compuestos tóxicos que son activos contra un organismo en productos que afectan a otro. Debido a tales

transformaciones, es esencial identificar los productos que se generan, ya que la detoxificación ambiental en estos casos no se ha alcanzado y las especies se han puesto bajo tensión. Un ejemplo notable de esta categoría de transformación es la deshalogenación y oxidación del alcohol pentaclorobencílico, un compuesto introducido en Japón para controlar un hongo patógeno del arroz. Este agente antimicrobiano no era dañino a las plantas de arroz a las cuales fue aplicado, pero cuando los residuos de la planta que contenían el fungicida fueron incorporados al suelo, se formaron ácidos benzoicos tri y tetraclorados. Estos productos suprimieron el desarrollo de las plantas sembradas después de que el arroz original fuera cosechado, en un proceso que es al parecer microbiano y cometabólico (Alexander, 1981).

Así, el reto al que se enfrentan los científicos ambientalistas, químicos y biólogos, es conocer el comportamiento y destino final de los compuestos xenobióticos en los diferentes medios naturales, principalmente de aquellos que son de preocupación ambiental. Por ello, los organismos reguladores han puesto en marcha programas con el fin de disminuir los impactos ambientales y los daños a la salud relacionados con tales compuestos (Alexander, 1981).

### **2.2 LAS PRUEBAS NORMALIZADAS DE BIODEGRADABILIDAD**

La evaluación del comportamiento ambiental de las sustancias químicas se basa en un parámetro primordial, la biodegradabilidad. Mediante la biodegradación, los microorganismos transforman compuestos orgánicos, algunos de ellos con estructuras muy complejas, en moléculas más simples.

Por lo anterior, organismos internacionales como la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) se han interesado en diseñar y normalizar pruebas de biodegradabilidad, que permiten estimar la persistencia de las sustancias en ambientes naturales o industriales (Tabla 2.2). De estas pruebas normalizadas se derivan los métodos estandarizados por la Organización Internacional de Normalización (ISO), la Agencia de

Protección Ambiental de los Estados Unidos de América (US-EPA) y la Oficina Europea de Sustancias Químicas (ECB).

En el esquema establecido por los Programas de Evaluación de Productos Químicos de la OCDE, la biodegradabilidad de una sustancia se determina utilizando tres niveles sucesivos de ensayo, las pruebas de biodegradabilidad inmediata, de biodegradabilidad intrínseca y de simulación (OCDE, 1992), las cuales se describen a continuación.

### **2.2.1 Pruebas de biodegradabilidad inmediata**

Las condiciones necesarias para realizar este tipo de ensayos incluyen la incubación aerobia estática, o por lote, a una temperatura comprendida entre 20 y 25°C, de una baja concentración de biomasa en un medio mineral y a pH neutro. La sustancia se añade, a una concentración conocida, como única fuente de carbono y energía, siendo el inóculo una población microbiana natural que no haya sido expuesta al compuesto de prueba (Tabla 2.3). Como controles positivos, se incluyen compuestos de fácil biodegradabilidad, tales como glucosa, anilina, benzoato o acetato de sodio.

Estas pruebas restringen al máximo las posibilidades de que la biodegradación suceda, razón por la cual se considera que un resultado positivo indica la biodegradabilidad de la sustancia en la mayoría de los medios naturales y de los sistemas de tratamiento (Nyholm, 1991).

El monitoreo de la molécula en estudio se realiza mediante parámetros directos, como el Carbono Orgánico Disuelto (COD), o bien, con parámetros indirectos como la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO) o la producción de CO<sub>2</sub>. Para garantizar que los resultados no se deben a una degradación abiótica, la eliminación física de la molécula por adsorción, la toxicidad de la sustancia o a una actividad deficiente del inóculo, las pruebas se corren en paralelo a varios testigos. Los resultados de los ensayos respirométricos se corrigen con la respiración endógena del inóculo, la cual se mide en ausencia de la molécula en estudio.

**Tabla 2.2** Pruebas de biodegradabilidad normalizadas o en curso de normalización por parte de la OCDE y su correspondencia con pruebas ISO, US-EPA y ECB

Descripción	OCDE <sup>a</sup>	ISO <sup>b</sup>	US-EPA <sup>c</sup>	ECB <sup>d</sup>
<b>Pruebas de biodegradabilidad inmediata</b>				
Prueba AFNOR modificada - pérdida de COD	301 A	7827	835.311	C.4-A
Prueba de Sturm modificada - desprendimiento de CO <sub>2</sub>	301 B	9439	835.311	C.4-C
Prueba MITI I modificada	301 C	-	835.311	C.4-F
Prueba en frasco cerrado	301 D	10707	835.311	C.4-E
Prueba modificada de detección de la OCDE - pérdida de COD	301 E	7827	835.311	C.4-B
Prueba de respirometría manométrica	301 F	9408	835.311	C.4-D
Prueba de desprendimiento de CO <sub>2</sub> en recipientes cerrados	310	14593	835.312	-
<b>Pruebas de biodegradabilidad intrínseca</b>				
Prueba SCAS ( <i>Semi-Continuous Activated Sludge</i> ) modificada	302 A	9887	835.321	C.12
Prueba de Zahn-Wellens modificada	302 B	9888	835.32	C.9
Prueba MITI II modificada	302 C	-	-	-
Prueba CONCAWE	302 D <sup>e</sup>	-	-	-
<b>Pruebas de simulación</b>				
Prueba de simulación de tratamiento aerobio con unidades de lodos activados	303 A	11733	-	C.10
Prueba de simulación de tratamiento aerobio con biomasa fija	303 B	-	-	-
Prueba de biodegradabilidad intrínseca en suelos	304 A	14239	835.33	-
Prueba de biodegradabilidad en agua marina	306	-	835.316	-
Prueba de transformación aerobia y anaerobia en suelos	307	-	-	C.23
Prueba de transformación aerobia y anaerobia en sedimentos acuáticos	308	-	-	C.24
Prueba de mineralización aerobia en agua superficial	309	14592-1	-	-
Prueba de producción de biogás a partir de lodo anaerobio diluido	311	11734	-	-
Prueba de simulación para determinar la biodegradabilidad primaria y última de compuestos químicos descargados a aguas residuales	(3xx) <sup>e</sup>	-	-	-

<sup>a</sup>OCDE: Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico

<sup>b</sup>ISO: Organización Internacional de Normalización

<sup>c</sup>US-EPA: Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América

<sup>d</sup>ECB: Oficina Europea de Sustancias Químicas

<sup>e</sup>Prueba en proceso de normalización

COD: Carbono orgánico disuelto

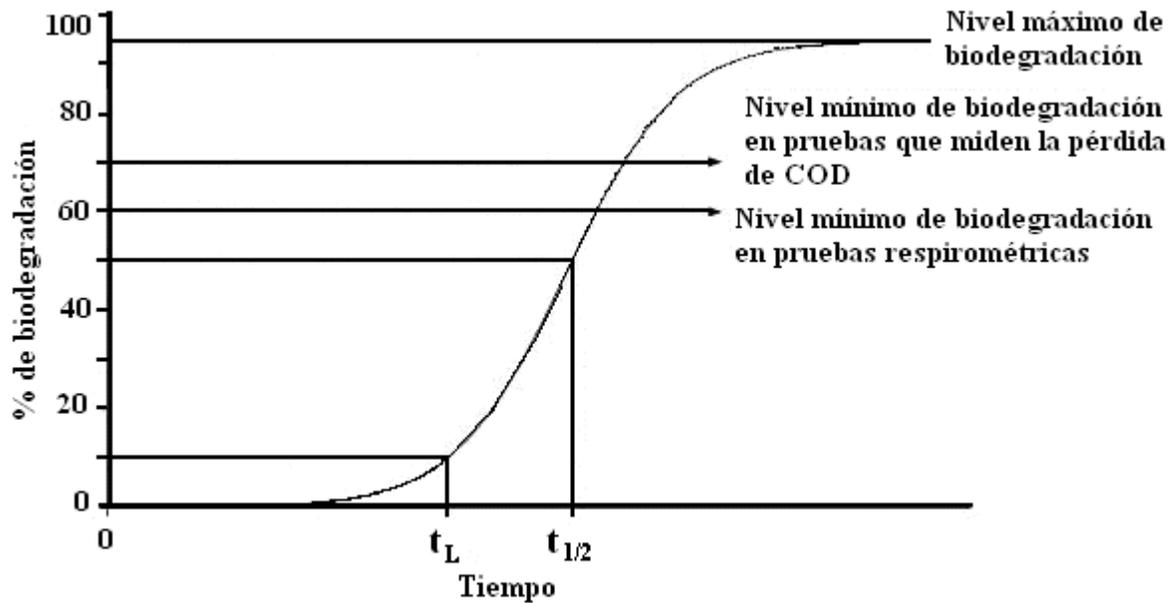
**Tabla 2.3** Condiciones experimentales de las pruebas de biodegradabilidad inmediata de la OCDE (1992)

Prueba	Fuente del inóculo	Inóculo (células/l)	Compuesto de prueba (mg/l)	Descripción
301 A	Efluente secundario, extracto de suelo, agua superficial o lodos activados	$10^7-10^8$	10-40 (mg COD/l)	Prueba en matraz agitado con seguimiento de la pérdida de COD
301 B	Efluente secundario, extracto de suelo, agua superficial o lodos activados	$10^7-10^8$	10-20 (mg COD/l)	Prueba respirométrica en un dispositivo que capta el CO <sub>2</sub> producido
301 C	Lodos <sup>a</sup> precultivados con peptona y glucosa	$10^7-10^8$	100	Prueba respirométrica en un medidor de DBO
301 D	Efluente secundario, agua superficial	$10^4-10^6$	2-10	Prueba respirométrica en un medidor de DBO
301 E	Efluente secundario	$10^5$	10-40 (mg COD/l)	Prueba en matraz agitado con seguimiento de la pérdida de COD
301 F	Efluente secundario, extracto de suelo, agua superficial o lodos activados	$10^7-10^8$	100	Prueba de respirometría manométrica
310	Efluente secundario, extracto de suelo, agua superficial o lodos activados	$10^5-10^8$ (UFC/l)	10-20 (mg COD/l)	Prueba respirométrica en recipientes cerrados con seguimiento del carbono inorgánico producido en la fase líquida o gaseosa

Obtenidos a partir de 10 muestras naturales diferentes  
 COD: Carbono orgánico disuelto  
 DBO: Demanda bioquímica de oxígeno

Las pruebas de biodegradabilidad inmediata demandan una disminución del 70% al monitorear el COD, y del 60% de la demanda teórica de oxígeno (DTO) o de la producción teórica de CO<sub>2</sub> (ThCO<sub>2</sub>) en un periodo de 28 días. Sin embargo, para un resultado positivo los niveles límites de biodegradación deben además alcanzarse en los diez días posteriores al final de la fase de latencia ( $t_L$ ), la cual se define arbitrariamente como el tiempo necesario para alcanzar una biodegradación del 10%. A este criterio se le conoce como ‘la ventana de los 10 días’. El nivel máximo de biodegradación presentado al cabo de 28 días, la duración de la fase de latencia ( $t_L$ ) y el tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ), definido como el tiempo

transcurrido para obtener una biodegradación de 50%, se reportan como resultado de las pruebas. En la Figura 2.2 se representa la obtención de estos parámetros.



**Figura 2.2** Representación esquemática de un proceso de biodegradación  
(Vázquez-Rodríguez y Beltrán-Hernández, 2004)

### 2.2.2 Pruebas de biodegradabilidad intrínseca

Las pruebas de biodegradabilidad intrínseca se desarrollan a partir de un resultado negativo en las pruebas de biodegradabilidad inmediata. En las primeras se emplean condiciones experimentales más favorables a la degradación, tales como una elevada concentración del inóculo y una mayor duración del ensayo, principalmente. Para evaluar la biodegradabilidad, se permite la previa adaptación del inóculo al compuesto de prueba y la adición de una segunda fuente de carbono.

La OCDE ha normalizado tres pruebas de biodegradabilidad intrínseca en medio aerobio, a saber, los ensayos SCAS (*Semi Continuous Activated Sludge*), Zahn-Wellens y MITI II (Tabla 2.4). La primera prueba emplea un inóculo de lodos activados que se pone en contacto

durante 23 horas con la sustancia de estudio (20 mg COD/l) y un efluente doméstico, el cual funciona como inóculo y a la vez como fuente alterna de carbono. Transcurrido este tiempo, se analiza el sobrenadante en términos de concentración final del COD. El sobrenadante se reemplaza por un volumen equivalente de efluente doméstico y se adiciona nuevamente la sustancia de prueba para reiniciar el ciclo. La prueba Zahn-Wellens opera de modo discontinuo y se monitorea midiendo la pérdida de COD; por otra parte, utiliza altas concentraciones de la molécula en estudio (50-400 mg COD/l), arriesgando así la viabilidad celular. Finalmente, la prueba MITI II permite determinar el comportamiento ambiental de sustancias insolubles en agua con un protocolo respirométrico sumamente complejo, el cual requiere la preparación del inóculo mediante la mezcla de 10 muestras naturales (suelo, agua superficial, lodos activados) y su posterior precultivo con peptona y glucosa durante al menos 30 días (OCDE, 1992).

**Tabla 2.4** Condiciones experimentales de las pruebas de biodegradabilidad intrínseca de la OCDE (1992)

Prueba	Fuente del inóculo	Inóculo (g SST/l)	Compuesto de prueba (mg/l)	Descripción
302 A	Lodos activados y aguas residuales urbanas	1-4	20 (mg COD/l)	Prueba semicontinua con seguimiento del COD
302 B	Lodos activados lavados	0.2-1	50-400 (mg COD/l)	Prueba discontinua con seguimiento de COD
302 C	Lodos <sup>a</sup> precultivados con peptona y glucosa	0.1	30	Prueba respirométrica en un medidor de DBO
302 D <sup>b</sup>	Suelo y lodos activados	0.05 <sup>c</sup>	20 (mg COD/l)	Prueba en recipientes cerrados con seguimiento del C inorgánico producido

<sup>a</sup>Obtenidos a partir de 10 muestras naturales diferentes

<sup>b</sup>Prueba en proceso de normalización (OCDE, 2001a)

<sup>c</sup>Valor estimado

La prueba CONCAWE (302 D, en proceso de normalización) está diseñada para evaluar la biodegradabilidad intrínseca de compuestos derivados del petróleo, de sustancias volátiles y poco solubles. Este ensayo utiliza la misma metodología que la prueba inmediata 310, a

excepción del inóculo, el cual consiste en una población microbiana mixta previamente adaptada a la sustancia de prueba, y de un periodo de incubación de 8 semanas (OCDE, 2001a).

### 2.2.3 Pruebas de simulación

Si las pruebas de biodegradabilidad intrínseca arrojan resultados negativos, las pruebas de simulación tienen la finalidad de estudiar el comportamiento de estas sustancias en sistemas de tratamiento o en medios naturales relevantes. Si el resultado de la prueba de simulación es negativo, se presume que la sustancia persiste en el medio ambiente y que puede considerarse sujeta a restricciones en cuanto a su esquema de producción o comercialización, e incluso puede exigirse la búsqueda de compuestos sustitutos (Vázquez-Rodríguez y Beltrán Hernández, 2004).

El ensayo 303 A, que simula una planta de tratamiento de aguas residuales mediante lodos activados, es la prueba de simulación más utilizada. Siguiendo el protocolo establecido, los lodos activados, el agua sintética a base de peptona y la sustancia de prueba están contenidos en un reactor con un tiempo de retención de lodos de 6 días, acoplado a un decantador que separa el agua tratada. Para obtener resultados confiables, los ensayos se llevan a cabo simultáneamente a pruebas testigo que se realizan en ausencia de la molécula de estudio. Sin embargo, mediante estas pruebas se obtienen cinéticas y mecanismos de biodegradación diferentes a los que realmente pueden existir; esto se debe al empleo de concentraciones muy elevadas con respecto a las que se pueden encontrar en la mayoría de las plantas de tratamiento. La OCDE sugiere una variante a esta prueba, en la cual se simula un sistema de tratamiento de aguas residuales por biomasa fija (prueba 303 B). Así mismo, se han normalizado pruebas que simulan suelos, aguas superficiales y marinas, digestores anaerobios y sedimentos acuáticos (Tabla 2.2).

### **2.2.3.1 Pruebas de biodegradabilidad en medio sedimentario**

Los sedimentos están formados por capas de materia finamente dividida, que cubren el fondo de ríos, lagos, bahías, estuarios y océanos. Por lo general, se componen de partículas minerales de diferentes tamaños, como arcillas, limos y arena, mezcladas con materia orgánica en muy diversas proporciones (Manahan, 1994). Dado que son el destino final de un elevado número de sustancias químicas, en general de aquéllas que son hidrófobas y que se adsorben fácilmente a la materia particulada, se han normalizado pruebas de biodegradabilidad que simulan dichos ecosistemas.

La prueba OCDE 309 (OCDE, 2004), diseñada para evaluar la biodegradabilidad aerobia de compuestos a bajas concentraciones ( $\leq 100 \mu\text{g/l}$ ) en aguas superficiales, es un ensayo en matraz agitado que contempla la adición de sedimento (1 g/l) para simular la interfase sedimento/agua. La biodegradación se mide mediante el monitoreo de la molécula de prueba marcada con  $^{14}\text{C}$  o del  $^{14}\text{CO}_2$  producido, o utilizando técnicas analíticas lo suficientemente sensibles, durante un máximo de 60 días. En función del medio que se pretenda estudiar, el sedimento puede caracterizarse por un elevado contenido en C orgánico (2.5-7.5%) y una textura fina (contenido de arcillas  $\geq 50\%$ ), o bien por un contenido en C orgánico reducido (0.5-2.5%) y una textura gruesa (contenido de arcillas  $\leq 50\%$ ) (Vázquez-Rodríguez y Beltrán Hernández, 2004).

La prueba ISO 14592-1 propone un método para determinar la biodegradabilidad aerobia de compuestos orgánicos a bajas concentraciones ( $\leq 100 \mu\text{g/l}$ ). El ensayo consiste en una prueba *batch* en matraces agitados, a los cuales se añade agua superficial libre de partículas gruesas, o bien, una suspensión de agua superficial con sedimento (0.1-1 g/l en peso seco). Los matraces se mantienen bajo agitación constante y en la oscuridad, a una temperatura de 20-25°C para simular una interfase de sedimento/agua. La prueba se monitorea mediante la medición de la molécula de prueba marcada con  $^{14}\text{C}$  o del  $^{14}\text{CO}_2$  producido, o utilizando técnicas analíticas lo suficientemente sensibles. Bajo estas condiciones, se estiman constantes cinéticas de biodegradación de primer orden (ISO, 2002).

## 2.3 EL MEDIO SEDIMENTARIO

Como ya se mencionó, los sedimentos son el receptáculo final de una gran variedad de contaminantes presentes en los cuerpos acuáticos. Esto es particularmente importante cuando se trata de la transferencia de especies químicas desde los sedimentos hasta los organismos que pasan una parte importante de su ciclo vital en contacto con ellos, como camarones, cangrejos, moluscos bivalvos, entre otros, que además constituyen la base de algunas cadenas tróficas. Durante mucho tiempo se pensó que la transferencia de contaminantes desde los sedimentos hasta los organismos incluía por lo general una etapa de disolución de los mismos en el medio acuático circundante. Sin embargo, actualmente se sabe que la transferencia ocurre, en gran medida, directamente desde los sedimentos hasta los organismos. Tal es el caso de ciertos contaminantes escasamente solubles, como los pesticidas organohalogenados (Manahan, 1994).

### 2.3.1 Principales características de los sedimentos

La composición y naturaleza del depósito sedimentario están relacionadas con la constitución petrográfica de las cuencas y la estructura de la vegetación que lo cubre. Estos depósitos son de origen *alóctono* cuando provienen de la erosión de la cuenca por agentes dinámicos externos, tales como el viento o el agua, o de origen *autóctono* cuando se constituyen a partir de la precipitación de compuestos minerales (carbonatos) y orgánicos (fragmentos vegetales acuáticos). La ocupación humana de las cuencas puede influenciar esta composición natural. Un sedimento puede describirse por su composición y su estructura, como se describe a continuación (Bonnet, 2000).

#### 2.3.1.1 Composición

Los sedimentos son una matriz relativamente heterogénea, constituida por agua, materiales orgánicos e inorgánicos y por compuestos antropogénicos (Power y Chapman, 1992). Los sedimentos se componen en un 80% de Si, Al, K, Na y Mg, mientras que el 20% restante se

encuentra constituido por compuestos carbonatados ( $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{MgCO}_3$ ), nutrientes (carbono orgánico, N, P) y elementos móviles (Mn, Fe, S). Los metales traza (Hg, Cd, Pb, Zn, Cu, Ni, Ag) representan menos de 0.1% de los elementos presentes en los sedimentos (Bonnet, 2000).

**Tabla 2.5** Principales minerales que componen los sedimentos de agua dulce (Bonnet, 2000)

Minerales	Denominación	Fórmula química
Silicatos	Cuarzo (sílice)	$\text{SiO}_2$
	Mica	$\text{K}(\text{Mg}, \text{Fe}, \text{Al})_3 \text{AlSi}_3\text{O}_{10}(\text{OH})_2$
	Feldespato	$(\text{Na}, \text{Ca}, \text{K})\text{AlSi}_3\text{O}_8$
	Amfibolo	$(\text{Ca}, \text{Mg}, \text{Fe}, \text{Al})_3\text{Si}_4\text{O}_{11}(\text{OH})$
	Piroxeno	$(\text{Ca}, \text{Mg}, \text{Fe})_2\text{Si}_2\text{O}_6$
Arcillas	Illita	$\text{KMgAl}_2\text{Si}_3\text{O}_{10}(\text{OH})_2$
	Montmorillonita	$\text{XMgAlSiO}_{10}(\text{OH})_2$
	Clorita	$\text{Mg}_3\text{Al}_2\text{Si}_3\text{O}_{10}(\text{OH})_8$
	Caolinita	$\text{Al}_3\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$
	Calcita	$\text{CaCO}_3$
Carbonatos	Dolomita	$\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$
	Siderita	$\text{FeCO}_3$
	Goethita	$\text{FeOOH}$
	Magnetita	$\text{Fe}_3\text{O}_4$
	Apatita	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH}, \text{F})$
	Vivianita	$\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$
	Pirita	$\text{FeS}_2$

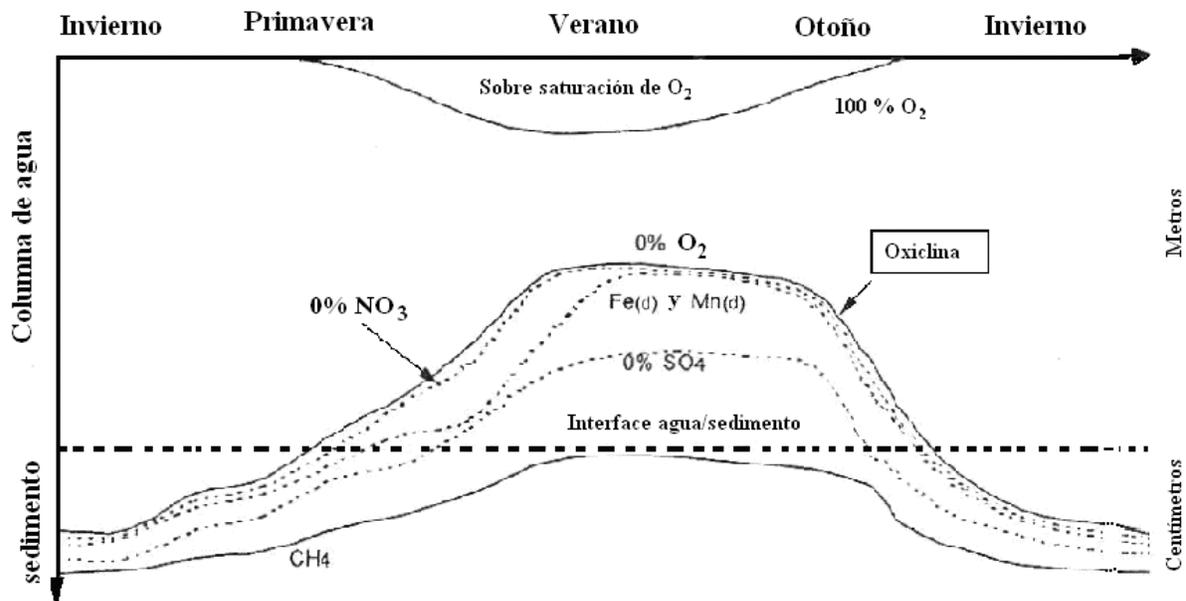
En función de su contenido de arena, el *agua intersticial* representa entre 20 y 90% del volumen de los sedimentos superficiales; más la textura del sedimento es fina, y el contenido de agua es más importante. La *materia inorgánica* está formada por compuestos minerales, tales como arcillas, carbonatos y silicatos (Tabla 2.5). El tamaño de estas partículas oscila entre diámetros menores a 0.1  $\mu\text{m}$  y varios mm. Estos compuestos están por lo general recubiertos de sustancias orgánicas y de ortohidróxidos de hierro y manganeso. La *materia orgánica* es un componente esencial de los sedimentos, en virtud de su participación en la

adsorción de los contaminantes y en el control de su biodisponibilidad (Kukkonen y Landrum, 1996). La materia orgánica natural se clasifica, según su tamaño, en carbono orgánico particulado (COP), coloidal (COC) y disuelto (COD). Se trata de material macromolecular polimerizado y heterogéneo (en tamaño y en peso), constituido por centenas de moléculas diferentes (proteínas, polisacáridos, lípidos, ácidos húmicos y fúlvicos). Este material se caracteriza por poseer sitios hidrófilos e hidrófobos que le permiten adsorberse a la superficie de las partículas minerales y complejar, en las fases acuosa y particulada, contaminantes orgánicos hidrófobos, metales en forma iónica y moléculas no ionizadas (Bonnet, 2000).

### 2.3.1.2 Estructura

El análisis granulométrico o de textura permite describir el sedimento a partir de diferentes fracciones minerales agrupadas en clases: las arcillas de tamaño inferior a 2  $\mu\text{m}$ , el limo de 2 a 50  $\mu\text{m}$  y la arena de 50  $\mu\text{m}$  a 2 mm.

Un sedimento también puede caracterizarse por su estratificación vertical, la cual es función de la concentración de oxígeno. La estructura de esta zona estratificada puede variar en función de la estación, como lo muestra la Figura 2.3. El oxígeno juega un papel importante, tanto para los procesos biológicos como para numerosas reacciones químicas. Regula, a nivel de la *oxiclina*, la solubilidad, y por ende la movilidad, de numerosos elementos, tales como el hierro y el manganeso (Bonnet, 2000).



**Figura 2.3** Curvas de isoconcentración del oxígeno disuelto (% de saturación) en función de un ciclo anual (Bonnet, 2000)

### 2.3.2 Contaminantes orgánicos

La gama de productos orgánicos sintetizados por el hombre es muy amplia (Tabla 2.6). Los compuestos orgánicos están por lo general asociados a las partículas según la composición de sus grupos funcionales, su tamaño, su forma y, en su caso, su carga eléctrica. Para evaluar la repartición de estos compuestos entre el agua y las partículas se han propuesto *coeficientes de repartición*.

El coeficiente de repartición octanol-agua ( $K_{ow}$ ) describe la lipofilia de un compuesto; su valor disminuye cuando la solubilidad acuosa del producto aumenta. Así, la adsorción de los compuestos orgánicos sobre la materia orgánica es más importante si  $K_{ow}$  aumenta. El  $K_p$  es el coeficiente de repartición de los productos orgánicos entre el agua y las partículas. El  $K_p$  de un compuesto es superior si su polaridad es débil. Los compuestos orgánicos no polares se enlazan principalmente con la materia orgánica, por lo que se ha propuesto un coeficiente de repartición ( $K_{oc}$ ) normalizado por el contenido de carbono orgánico (CO; Bonnet, 2000).

**Tabla 2.6** Principales compuestos orgánicos presentes en sedimentos (Bonnet, 2000)**Hidrocarburos alifáticos**

Grupo de moléculas lineales o ramificadas de cadena larga. Son relativamente volátiles y se encuentran en los sedimentos a bajas concentraciones.

**Hidrocarburos aromáticos monocíclicos**

El benceno, el tolueno y algunos de sus derivados son moderadamente volátiles y solubles en agua. No se encuentran a altas concentraciones en los sedimentos. Por el contrario, ciertos derivados clorados o nitrogenados (diclorobenceno, hexaclorobenceno, dinitrotolueno) pueden encontrarse a altas concentraciones en los sedimentos cercanos a zonas industriales y plataformas petroleras.

**Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP)**

Grupo de hidrocarburos constituidos por un número variable de ciclos bencénicos (naftaleno, coroneno). Algunos compuestos aromáticos no sustituidos, como el benzo[a]pireno, fluorantreno, pireno y antraceno están presentes en los sedimentos cercanos a zonas industriales y plataformas petroleras.

**Pesticidas organoclorados, bifenilos policlorados (BPC)**

Compuestos antropogénicos obtenidos por cloración de diversos hidrocarburos insaturados (ciclopentadienos clorados, dicloroanilina, lindano, DDT). Los ciclopentadienos clorados más comunes son el dieldrin, clordano, aldrin, heptacloro, endosulfán. Los BPC son mezclas de bifenilos con diversos grados de cloración (4 a 8 cloros/molécula). El tiempo de vida media de estos agentes es muy grande (frecuentemente > 10 años) y su biodegradabilidad es casi nula (a excepción del lindano). Incluso los compuestos cuya producción se ha detenido (como el DDT) representan un problema en los sedimentos. Aunque sus niveles ambientales disminuyen desde hace varios años, los BPC se siguen utilizando en la industria eléctrica y de plásticos.

**Pesticidas organofosforados**

Sustancias orgánicas antropogénicas neurotóxicas, por lo general derivadas del ácido ortofosfórico (paratión, malatión).

**Carbamatos**

Pesticidas derivados del ácido carbámico (HO-CO-NH<sub>2</sub>); se incluyen insecticidas neurotóxicos como el carbaryl y fungicidas (ferbame).

**Piretroides**

Insecticidas antropogénicos con un núcleo ciclopropano en su estructura y estabilizados por la adición de radicales halogenados (deltametrina, ciflutrina). Son muy tóxicos para peces e invertebrados de sangre fría.

**Fenoles**

Compuestos aromáticos hidroxilados derivados del benceno o de sus homólogos superiores como el naftaleno. El penta-, el tetra- y el triclorofenol están presentes en algunos sedimentos contaminados.

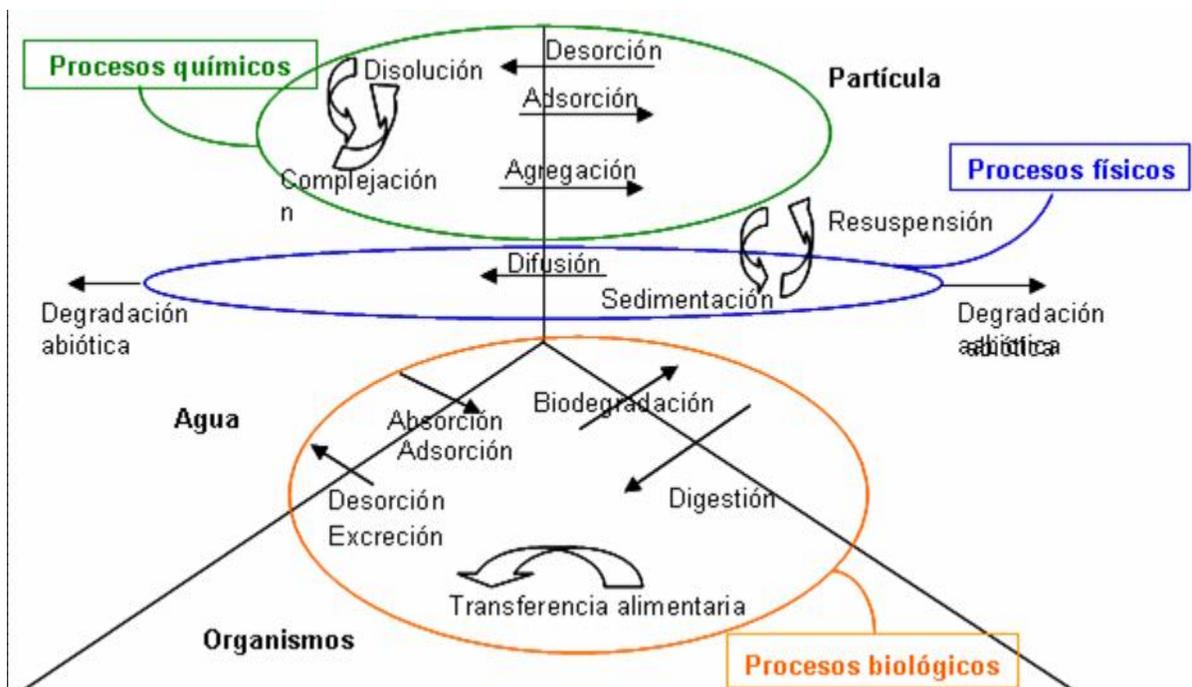
**Dibenzo-*p*-dioxinas policloradas**

Compuestos orgánicos producidos durante la combustión incompleta de sustancias orgánicas sintéticas. La incineración de los aromáticos clorados es una fuente de dioxinas y dibenzofuranos que se acumulan en los sedimentos.

Las moléculas orgánicas tienen efectos muy variados. Pueden ser narcóticas, genotóxicas (hidrocarburos aromáticos policíclicos), neurotóxicas (insecticidas clorados), inhibidoras del crecimiento (herbicidas), etc. Las formas no ionizadas de las moléculas orgánicas son generalmente más tóxicas que las formas ionizadas, debido a que penetran más fácilmente las membranas celulares por transporte pasivo a través de la bicapa lipídica (Howe *et al.*, 1994).

### 2.3.3 Repartición de los contaminantes en los sedimentos

Los sedimentos son matrices complejas que poseen múltiples posibilidades de asociación con los contaminantes. La repartición de los contaminantes en los diferentes componentes de los sedimentos (partículas, agua u organismos) es controlada por procesos físicos, químicos y biológicos (Figura 2.4).



**Figura 2.4** Principales procesos que controlan el ciclo de los contaminantes en el medio acuático (Bonnet, 2000)

En el compartimiento acuoso, los contaminantes pueden estar presentes en forma disuelta o complejada. Pueden transferirse a la fase sólida luego de la agregación de materiales disueltos o por adsorción sobre partículas. En las partículas, los procesos de resuspensión-sedimentación pueden modificar la asociación de los contaminantes con éstas. Los contaminantes asociados a las partículas pueden regresar a la fase acuosa por efecto de procesos físicos (difusión) o químicos (desorción).

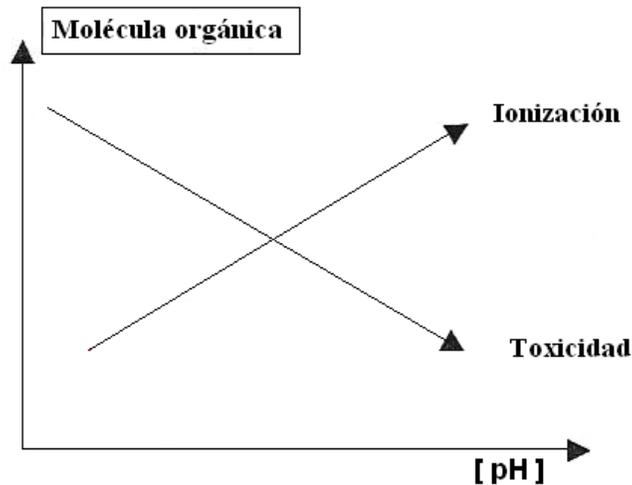
Los organismos vivos modifican las características físico-químicas del medio y acumulan por adsorción contaminantes a partir de las fases líquida y sólida. Posteriormente, los contaminantes pueden ser transferidos a la cadena alimenticia (Bonnet, 2000).

### **2.3.4 Factores de control de la repartición de los contaminantes**

Como se ha descrito, por efecto de procesos físicos, químicos y biológicos, los contaminantes se reparten de diferentes formas (disuelta, complejada, adsorbida, entre otras) entre los principales componentes de los sedimentos (fases acuosa, particulada y biótica). Entre los factores que controlan dicha repartición se encuentran ciertos parámetros fisicoquímicos (pH, potencial redox, capacidad de intercambio catiónico, salinidad) y los constituyentes de los sedimentos, tales como las partículas inorgánicas, la materia orgánica y los sulfuros, entre otros (Bonnet, 2000).

#### **2.3.4.1 pH**

En los sedimentos, el pH se encuentra controlado por la actividad biológica y depende de la capacidad tampón del sistema, en particular del equilibrio  $\text{CO}_3^{2-}/\text{HCO}_3^-$ . La reducción de los sulfatos ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) en sulfuros ( $\text{S}_2^-$ ) conlleva un aumento en el pH, mientras que la desnitrificación (reducción de los nitratos en  $\text{N}_2$ ; § 2.3.5.1) resulta en una disminución. El pH controla los equilibrios entre las formas no ionizadas y las ionizadas de las moléculas orgánicas (Figura 2.5).

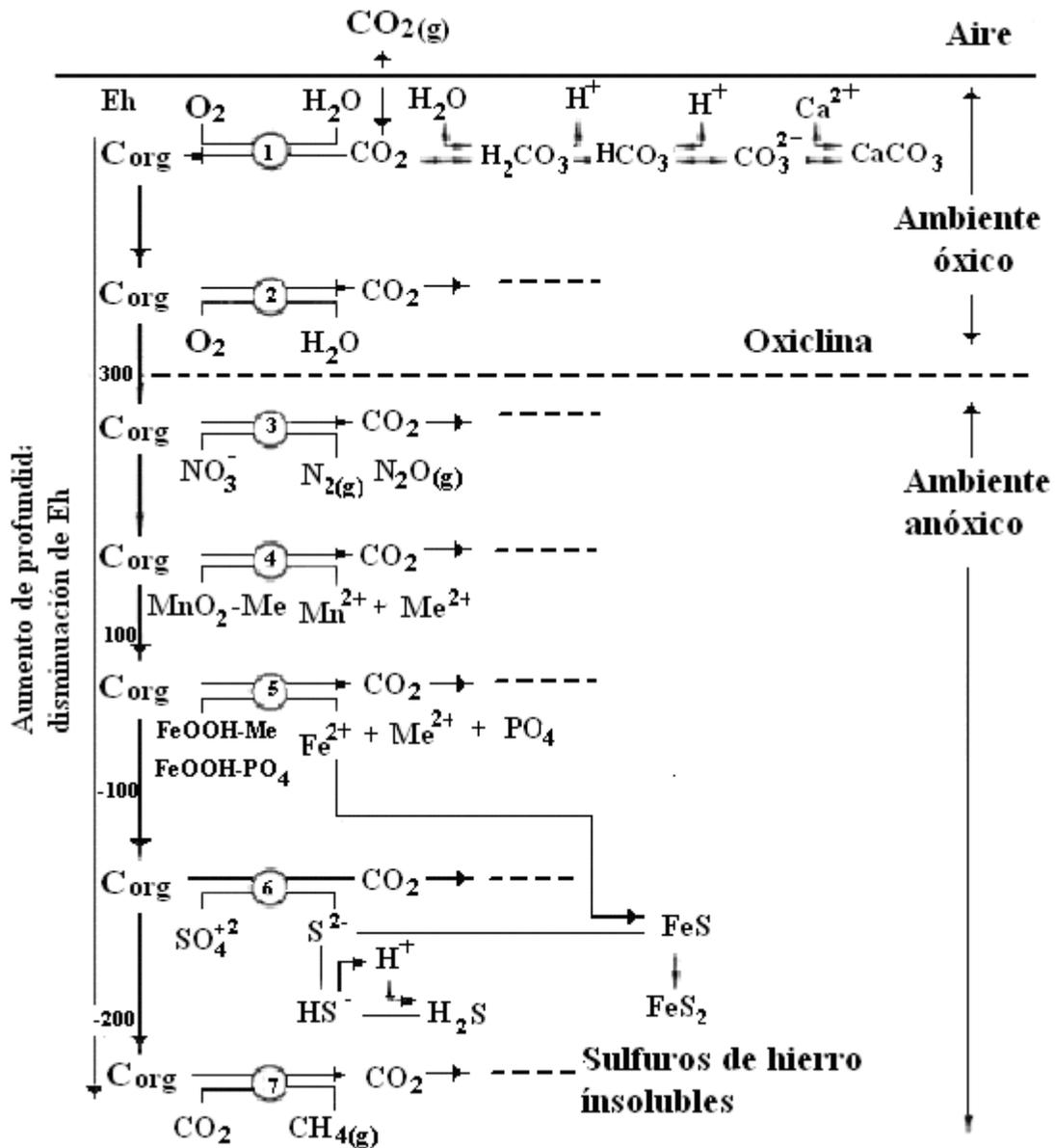


**Figura 2.5** Comportamiento de la toxicidad de las moléculas orgánicas en función del pH (Howe *et al.*, 1994)

En condiciones alcalinas, la proporción de la forma ionizada (menos tóxica) de nitrofenoles aumenta y los organofosfatos son por lo general hidrolizados en subproductos menos tóxicos que la molécula original. Sin embargo, el pH afecta de modo limitado la estructura de las moléculas que poseen pocos grupos polares (Bonnet, 2000).

#### 2.3.4.2 Potencial redox

El potencial redox (Eh, en mV) mide la aptitud a la oxidación o a la reducción de una solución y permite determinar las posibilidades de precipitación o solubilización de compuestos minerales presentes en los sedimentos. La Figura 2.6 muestra los principales ciclos biogeoquímicos en función del potencial redox. La degradación bacteriana de la materia orgánica implica una reducción del potencial redox y un aumento en las condiciones reductoras del sedimento. Las condiciones redox tienen una influencia negativa en la solubilidad de metales como el hierro, el manganeso o el cromo (Bonnet, 2000).



**Figura 2.6** Hipótesis simplificadas de los principales ciclos biogeoquímicos en los sistemas sedimentarios de agua dulce en función del potencial redox (Eh en mV) (Bonnet, 2000)

Otros metales se ven afectados indirectamente en su movilidad por la disponibilidad de elementos complejantes, tales como los sulfuros o los hidróxidos de hierro y de manganeso. En efecto, en condiciones reductoras, el exceso de sulfuros limita la movilidad de los metales, los cuales coprecipitan. Cuando las condiciones se vuelven oxidantes, los sulfuros se oxidan y los metales catiónicos se liberan a la fase acuosa (Bonnet, 2000).

#### 2.3.4.3 Capacidad de intercambio catiónico y superficie específica

Una de las características más importantes de los sedimentos es su habilidad para intercambiar cationes con el medio acuático que los rodea. La *capacidad de intercambio catiónico* (CIC) mide la capacidad de un sólido, tal como un sedimento, para absorber cationes, mientras que los *cationes intercambiables* (CI) se refieren a la cantidad de iones específicos unidos a una cierta cantidad de sedimento; ambos parámetros se expresan por lo general como cmol/Kg de sedimento.

La reactividad de las partículas es mayor si la capacidad de intercambio catiónico (CIC) y el área específica ( $m^2/g$ ) son importantes. La CIC de la fracción sólida es función de la importancia y de la distribución de cargas en su estructura, de los cationes adsorbidos (generalmente sodio, potasio o calcio) y de la naturaleza de los cationes de reemplazo. La superficie específica es inversamente proporcional al diámetro de las partículas (Bonnet, 2000).

#### 2.3.4.4 Dureza y salinidad

La dureza puede influenciar la disponibilidad de los contaminantes, lo cual puede deberse a un aumento en la competición entre el  $Ca^{2+}$  y los metales por los sitios de intercambio. En cuanto a la salinidad, ésta puede ser un factor particularmente crítico en la repartición de ciertos contaminantes entre las fases acuosa y sólida; por ejemplo, ciertos metales disueltos (Cd, Zn) pueden complejarse con el ion  $Cl^-$  y precipitar (Bonnet, 2000).

#### 2.3.4.5 Fracción mineral

Las partículas inorgánicas no intervienen de modo significativo en la repartición de los contaminantes, a menos que el contenido en materia orgánica de los sedimentos sea inferior a 0.2%. A valores superiores, es dicha fracción la que controla la repartición de los contaminantes orgánicos (Bonnet, 2000).

Los problemas asociados a la contaminación química suelen localizarse en las zonas de depósito en las que los sedimentos son finos. Por sus características (estructura, composición, CIC, superficie específica), la fracción limo-arcillosa de los sedimentos es más reactiva que el material mineral grueso, ya que puede formar complejos con los compuestos húmicos y es donde más ocurren fenómenos de adsorción y desorción de contaminantes (cationes orgánicos, moléculas orgánicas polares y iones metálicos). Por ejemplo, los bifenilos policlorados suelen estar asociados a la fracción arcillosa (Bonnet, 2000).

### **2.3.5 Importancia de los procesos anóxicos en el medio sedimentario**

En el medio acuático, los sedimentos suelen encontrarse contaminados con compuestos orgánicos de diversa índole, debido a que reciben descargas de aguas residuales domésticas o industriales, incluso sin que hayan sido tratadas. El metabolismo microbiano en ausencia de oxígeno tiene un importante papel en la eliminación de tales sustancias, ya que tales condiciones son frecuentes en el medio sedimentario.

Los microorganismos anaerobios oxidan compuestos orgánicos a dióxido de carbono, usando aceptores de electrones tales como nitratos, sulfatos u óxidos de hierro, en lugar de oxígeno. Así, el nivel de degradación natural de los hidrocarburos contaminantes en zonas anóxicas es mayor de lo que anteriormente se pensaba. Además, algunos compuestos xenobióticos sólo son biodegradados en anaerobiosis; es el caso del tetracloroetileno, los bifenilos policlorados y los compuestos aromáticos nitrosustituidos (Zhang y Bonnet, 2005). Por ejemplo, el benceno, uno de los contaminantes de mayor preocupación ambiental debido a que es soluble en agua, tóxico y carcinógeno, puede ser degradado en anaerobiosis, al igual que otros hidrocarburos.

Cabe mencionar que el incremento moderado de sulfatos o nitratos en el medio puede acelerar el índice de biodegradación del contaminante, como sucede cuando se agrega oxígeno a la sub-superficie para optimizar la actividad de microorganismos aerobios. Sin embargo, esta práctica es técnicamente difícil y muy costosa, puesto que el oxígeno es poco soluble y reacciona fácilmente con ciertos componentes del agua subterránea, tales como el

hierro. Estas limitaciones no intervienen en medios anóxicos, donde los aceptores de electrones como nitratos o sulfatos son altamente solubles y no son consumidos mediante procesos abióticos (Anderson y Lovley, 2000).

Los microorganismos aerobios no degradan contaminantes clorados tales como el percloroetano (PCE) y tricloroetano (TCE). En un acuífero poco profundo, estos solventes persisten a menos que algunos contaminantes, tales como el petróleo, propicien condiciones anóxicas. Algunos microorganismos anaerobios pueden degradar PCE y TCE adicionando compuestos orgánicos a la sub-superficie para que sean utilizados como fuente de carbono y de energía. Bajo condiciones ideales, el proceso de reducción remueve átomos de cloro de los contaminantes orgánicos, produciendo etileno como producto final (Lovley, 2001).

La contaminación por nitratos, como resultado del uso de fertilizantes o de la introducción de basura dentro de la sub-superficie acuática, puede tratarse simultáneamente a la ocasionada por compuestos orgánicos. Los microorganismos encargados de la desnitrificación pueden oxidar la materia orgánica, reduciendo el nitrato a nitrógeno molecular (Lovley, 2001).

### **2.3.5.1 La desnitrificación en el medio sedimentario**

En ausencia de oxígeno, los compuestos orgánicos pueden ser metabolizados por diversas comunidades microbianas usando aceptores alternos de electrones. En términos de respiración microbiana y flujo de carbono en ambientes anóxicos, los aceptores de electrones más importantes son los nitratos, sulfatos, hierro III, manganeso IV y carbonato, que dan lugar al proceso de desnitrificación, sulfurogénesis, reducción del hierro, reducción del manganeso y metanogénesis, respectivamente. En presencia de las altas concentraciones de sulfatos encontradas en agua de mar (20-30 mM), éstos constituyen uno de los aceptores de electrones predominantes, afectando procesos diagenéticos en estuarios y sedimentos marinos. La reducción de hierro es importante en algunos sedimentos marinos, mientras que la desnitrificación puede ser significativa en regiones con altas concentraciones de nitratos procedentes de la descarga de aguas residuales o de la agricultura (Haggblom *et al.*, 1999).

Los microorganismos que son activos bajo diversas condiciones redox son fisiológica y filogenéticamente distintos. Por lo tanto, las actividades e interacciones de estas poblaciones necesitan ser consideradas al evaluar el destino de productos químicos tóxicos en el ambiente, y cuando se estén desarrollando tecnologías para la biorremediación (Haggbloom *et al.*, 1999).

La desnitrificación es particularmente importante para llevar a cabo el ciclo del nitrógeno. Esta porción de dicho ciclo representa una pérdida directa de nitrógeno fijado a la atmósfera, la reducción del nitrato a N<sub>2</sub>, ocurre anaeróbicamente, usando al anterior como aceptor de electrones (§ Anexo C). Su control *in situ* es limitado por las concentraciones de oxígeno disuelto, de iones nitrato y del carbono orgánico en el ambiente. La desnitrificación ocurre principalmente en los sedimentos de ambientes acuáticos, debido a que los sedimentos pueden tener concentraciones bajas de oxígeno disuelto y altas concentraciones de materia orgánica (Reacción 2.1). La desnitrificación es también de interés actual porque los óxidos nitrosos contribuyen a la destrucción de la capa de ozono (Esteves *et al.*, 2001).



Donde:

{CH<sub>2</sub>O} es una molécula orgánica donadora de electrones.

---

---

# PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

---

---

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

#### 3.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La determinación de la biodegradabilidad de las sustancias químicas es fundamental para conocer el riesgo que implica su dispersión en el medio ambiente.

La disponibilidad de oxígeno representa un factor importante en la determinación de la biodegradabilidad, puesto que las poblaciones microbianas responsables del ataque a las moléculas en medios aerobios difieren de las existentes en medios anaerobios. A su vez, en los medios anaerobios pueden encontrarse aceptores de electrones alternos, como nitratos, sulfatos o  $\text{Fe}^{3+}$  en concentraciones suficientes como para establecer condiciones anóxicas, en cuyo caso la biodegradabilidad de las moléculas también varía. Por tal motivo, este trabajo presenta un protocolo experimental que permite evaluar la biodegradabilidad de compuestos orgánicos en condiciones desnitrificantes. Este protocolo pretende simular las condiciones prevalecientes en un medio sedimentario con ion nitrato como aceptor de electrones, por lo que podría ser utilizado como una herramienta de predicción del comportamiento de las sustancias bajo tales condiciones.

#### 3.2 JUSTIFICACIÓN

Dado que los organismos reguladores exigen a los fabricantes cada vez más evidencias experimentales de que sus productos se transforman en estructuras inocuas cuando se liberan al medio ambiente, se han diseñado diversas pruebas de biodegradabilidad. Éstas permiten estimar en el laboratorio la factibilidad de la biodegradación en condiciones cercanas a las que caracterizan un medio natural determinado. En virtud de su creciente aplicación, es importante contar con un conjunto de pruebas razonablemente reproducibles y precisas, que permitan simular la amplia variedad de ecosistemas implicados, como son aguas marinas,

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

---

suelos, sedimentos, entre otros. Sin embargo, hasta el momento no se ha normalizado ningún ensayo de biodegradabilidad con aceptores externos de electrones distintos al oxígeno.

---

---

# OBJETIVOS

---

---

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GENERAL**

Diseñar un procedimiento de evaluación de la biodegradabilidad anóxica de compuestos orgánicos en medio líquido.

### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ❖ Establecer una metodología de evaluación de la biodegradabilidad anóxica de compuestos orgánicos en presencia de ion nitrato como aceptor de electrones.
- ❖ Caracterizar sedimentos lacustres para estudiar la factibilidad de su uso como inóculo.
- ❖ Seleccionar la fuente del inóculo a partir de pruebas de biodegradabilidad anóxica utilizando glucosa como molécula de referencia positiva.
- ❖ Evaluar la pertinencia de la prueba de biodegradabilidad anóxica con compuestos xenobióticos.

---

---

# MATERIALES Y MÉTODOS

---

---

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

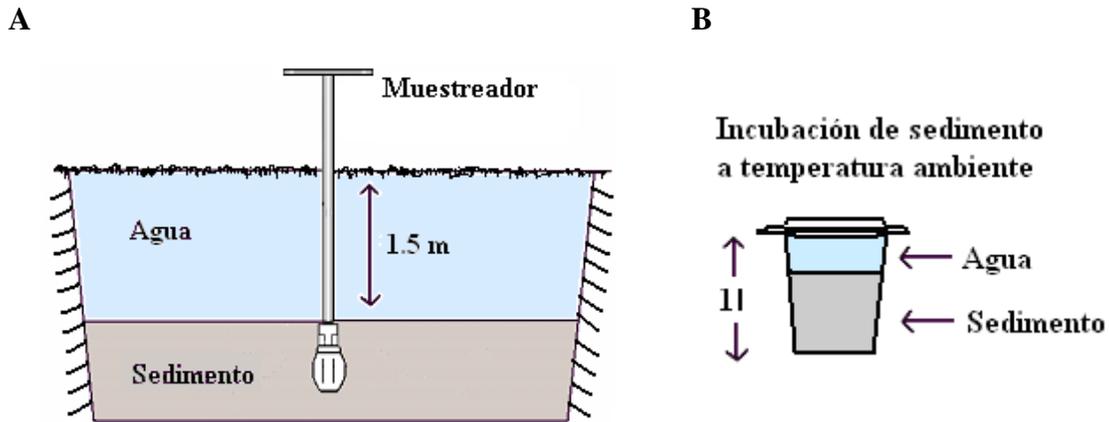
### 5.1 MATERIAL SEDIMENTARIO

Para esta investigación, se emplearon sedimentos de la laguna de Tecocomulco, Hgo. Ésta se localiza entre los municipios de Apan y Cuauhtepac, entre las coordenadas geográficas siguientes: latitud norte: 19°52'00'' y longitud oeste: 98°24'00'', sobre una altitud de 2,400 msnm, abarcando una superficie de 1653 ha. Esta masa hídrica es una extensión natural de agua estancada, proveniente principalmente de las precipitaciones pluviales que se registran en los alrededores y cuyos depósitos aluviales están formados por arenas, limos y arcillas finas, escasamente consolidadas. Actualmente la flora está representada por algunas especies de magüey, nopal, pasto y lirio acuático, mientras que la fauna está integrada por peces, anfibios y aves (Camargo, 2000).

Se llevaron a cabo muestreos en diferentes periodos (Tabla 5.1), utilizando un muestreador de suelos como el que se presenta en la Figura 5.1A. Éste se introdujo a una profundidad de 1.5 m del nivel del agua para extraer el sedimento y descartar el más externo (~ 5 cm; Figura 5.1A). Los sedimentos se colectaron en botes de plástico con capacidad de 1 l, se cubrieron con agua de la misma laguna y se cerraron con el fin de mantener condiciones anóxicas (Figura 5.1B). Posteriormente, se incubaron a temperatura ambiente durante 48 horas, con el fin de no modificar drásticamente sus condiciones naturales.

**Tabla 5.1** Fechas de los muestreos realizados

No. de muestra	Fecha
1	Septiembre, 2003
2	Junio, 2004
3	Febrero, 2005
4	Junio, 2005
5	Febrero, 2006
6	Abril, 2006



**Figura 5.1** Recolección (A) e incubación (B) del sedimento a temperatura ambiente

## 5.2 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE SEDIMENTOS

A menos que se especifique otra fuente, el análisis de sedimentos se llevó a cabo utilizando las técnicas para suelos descritas en la NOM-021-RECNAT-2000 (INE, 2002).

### 5.2.1 Análisis de textura

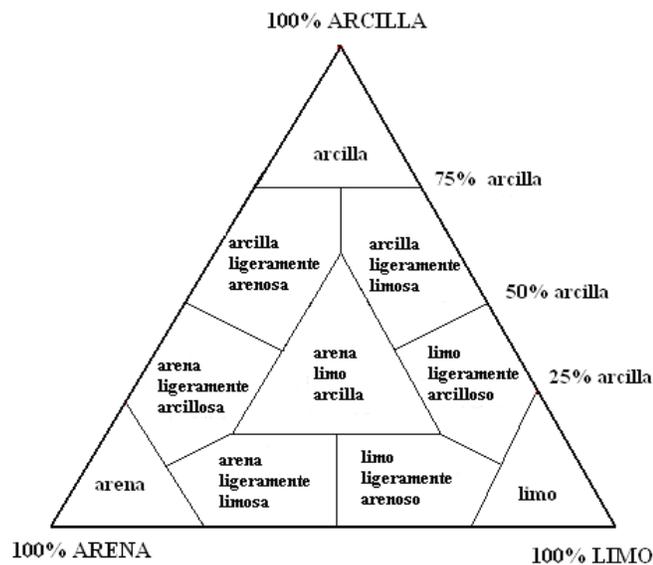
La determinación de la textura de sedimentos se llevó a cabo por el procedimiento de Bouyoucos, el cual emplea el hidrómetro del mismo nombre. En una batidora, se homogenizan 50 g de sedimento seco, 10 ml de solución defloculante (con 37 g/l de hexametáfosfato de sodio y 7.94 g/l de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) y un poco de agua destilada durante 10-15 minutos. Luego de aforarse a 1 l con agua en una probeta, la mezcla se agita durante un minuto. El hidrómetro se introduce lentamente, y al cabo de 40 segundos se toma la lectura correspondiente al nivel del agua ( $L_1$ ) y a la temperatura ( $T_1$ ). Después de 2 horas de reposo se toma la segunda lectura ( $L_2$  y  $T_2$ ). Los porcentajes de arcilla y de limo y arcilla se calculan mediante las Ecuaciones 5.1 y 5.2, respectivamente.

$$\% \text{ arcilla} = \frac{L_2 + (T_2 - 20) * 0.36}{50} * 100 \quad (5.1)$$

$$\% \text{ limo y arcilla} = \frac{L_1 + (T_1 - 20) * 0.36}{50} * 100 \quad (5.2)$$

El porcentaje de arena restante se calcula por diferencia con respecto al 100 %.

La textura del sedimento se determina por la ubicación de las tres fracciones en el diagrama de la Figura 5.2.



**Figura 5.2** Diagrama triangular de clasificación de sedimentos en función de su textura  
(Campy y Meybeck, 1995)

### 5.2.2 Determinación de pH

A 10 g de sedimento seco se adicionan 20 ml de agua destilada; la mezcla se agita a intervalos de 5 minutos. Transcurrida media hora, la suspensión se deja reposar durante 15 minutos, al término de los cuales se agita nuevamente y se introduce el electrodo de pH. El valor se registra en el momento en que la lectura se haya estabilizado

### 5.2.3 Análisis de iones nitrato

En una placa de agitación se homogenizan 10 g de sedimento seco y 100 ml de solución de KCl 2N durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo, la suspensión se deja reposar aproximadamente 5 minutos y se filtra. Luego de llevar a sequedad 10 ml del extracto en una cápsula de porcelana, se adicionan 2 ml de ácido fenildisulfónico, 20 ml de agua destilada y 7 ml de KOH 12N. La mezcla se afora a 100 ml, se agita suavemente y se lee la absorción óptica a 410 nm. La concentración de iones nitrato de la muestra se calcula a partir de una ecuación que relacione las absorbancias de las soluciones patrón a sus concentraciones de iones nitrato ( $< 6.18 \text{ mg NO}_3^-/\text{l}$ ) (Yúfera y Carrasco, 1973).

### 5.2.4 Análisis de iones nitrito

En un agitador magnético se homogenizan durante 15 minutos 10 g de sedimento seco y 100 ml de solución extractora de KCl 2N; luego de 5 minutos de reposo, se homogeniza nuevamente la mezcla y se filtra. Posteriormente, se toman 25 ml del extracto y se añaden 20 ml de agua destilada, 1 ml de ácido sulfanílico (8 g/l en  $\text{CH}_3\text{COOH}$  5N) y 1 ml de  $\alpha$ -naftilamina (5 g/l en  $\text{CH}_3\text{COOH}$  5N). La solución se afora a 50 ml, se homogeniza y se deja reposar 10 minutos. La absorbancia de la solución se mide a 520 nm en un lapso máximo de 15 minutos, ya que una lectura posterior origina una disminución en el resultado del análisis. La concentración de iones nitrito de la muestra se calcula a partir de una ecuación que relacione las absorbancias de los patrones (elaborados con  $\text{KNO}_2$ ) con su contenido en iones nitrito ( $< 1.7 \text{ mg NO}_2^-/\text{l}$ ) (Yúfera y Carrasco, 1973).

### 5.2.5 Análisis de carbono orgánico

A 0.5 g de sedimento seco se adicionan uniformemente 10 ml de una solución de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  1N y 20 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado. Al cabo de 30 minutos de reposo, se añaden 150 ml de agua destilada y 5 ml de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  concentrado. Finalmente, la mezcla se titula con una solución de sulfato ferroso 0.5N utilizando difenilamina como indicador. Se realiza todo el procedimiento utilizando un testigo, el cual no incluye la muestra de sedimento. El porcentaje de carbono inorgánico se calcula mediante la Ecuación 5.3.

$$\% \text{ carbono orgánico} = [(B-T)/g] * [N] * (0.039) \quad (5.3)$$

donde:

B = Volumen de sulfato ferroso gastado para valorar el testigo (ml)

T = Volumen de sulfato ferroso gastado para valorar la muestra (ml)

N = Normalidad del sulfato ferroso

g = Peso de la muestra empleada

0.039 = Factor de corrección (Ecuación 5.4)

$$0.039 = [12/4000 * 1/0.77 * 100] \quad (5.4)$$

Donde:

12 = Peso equivalente del carbono en meq

1/0.77 = Factor de corrección debido a que se supone que el método sólo oxida 77% del carbono

100 = Conversión a porcentaje

### 5.2.6 Análisis de carbono inorgánico

En un frasco de boca ancha se introducen dos frascos más pequeños, uno con 20 ml de NaOH 1N y el otro con 1 g de sedimento seco. Se cierra el frasco con una tapa provista de un septum, a través del cual se adicionan 5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado al frasco con sedimento. Transcurridas 24 horas se titula el NaOH, primero con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N y luego con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.01N. Se realiza todo el procedimiento utilizando un blanco, el cual no incluye la muestra. El porcentaje de carbono inorgánico se calcula mediante la Ecuación 5.5.

$$\% \text{ carbono inorgánico} = \frac{(M - B) * N * 4 * 12 * 100}{\text{Peso muestra}} \quad (5.5)$$

Donde:

B = Volumen del ácido sulfúrico gastado al finalizar la valoración del blanco (ml)

M= Volumen del ácido sulfúrico gastado al finalizar la valoración de la muestra (ml)

N = Normalidad del ácido sulfúrico

4 = Factor de corrección (se tituló una alícuota de 5 ml de un total de 20 ml)

12 = Peso equivalente del carbono en meq

100 = Conversión a porcentaje

### 5.2.7 Análisis de fósforo

En un agitador magnético se homogenizan durante 30 minutos 2.5 g de sedimento seco y 50 ml de solución extractora de  $\text{NaHCO}_3$  0.5M. Luego de filtrarse se toman 10 ml de esta solución y se agregan 5 ml de solución reductora, la cual se prepara disolviendo 0.50 g de ácido ascórbico en 100 ml de molibdato de amonio (20 g de molibdato de amonio disueltos en 300 ml de agua; posteriormente se adicionan 450 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  14N y 100 ml de tartrato de antimonio y potasio 0.5% m/v para luego aforar a 1 l con agua destilada). La mezcla se agita, se afora y luego de 30 minutos de reposo se lee la absorbancia a 882 nm. La concentración de fósforo de la muestra se calcula a partir de una ecuación que relacione la absorbancia de la soluciones patrón respecto a su concentración de fósforo ( $< 1.0$  mg P/l).

### 5.2.8 Determinación del contenido de humedad

Esta determinación consiste en colocar cápsulas de porcelana a peso constante en una estufa durante 8 h como mínimo, a una temperatura de 105 °C. Posteriormente, se registra el peso de las cápsulas ( $P_c$ ) previo enfriamiento de las mismas en un desecador. Luego de colocar en las cápsulas aproximadamente 10 g de sedimento húmedo, se pesan nuevamente ( $P_{sh}$ ) y se colocan en la estufa hasta completa sequedad a la misma temperatura. Al término de este procedimiento se pesa la cápsula con sedimento seco ( $P_{ss}$ ). La determinación del contenido de humedad se realiza por la diferencia en peso entre la masa del sedimento húmedo y la masa del sedimento seco (Ecuación 5.6).

$$g = (P_{sh} - P_c) - (P_{ss} - P_c) \quad (5.6)$$

### 5.3 PRUEBAS DE BIODEGRADABILIDAD ANÓXICA

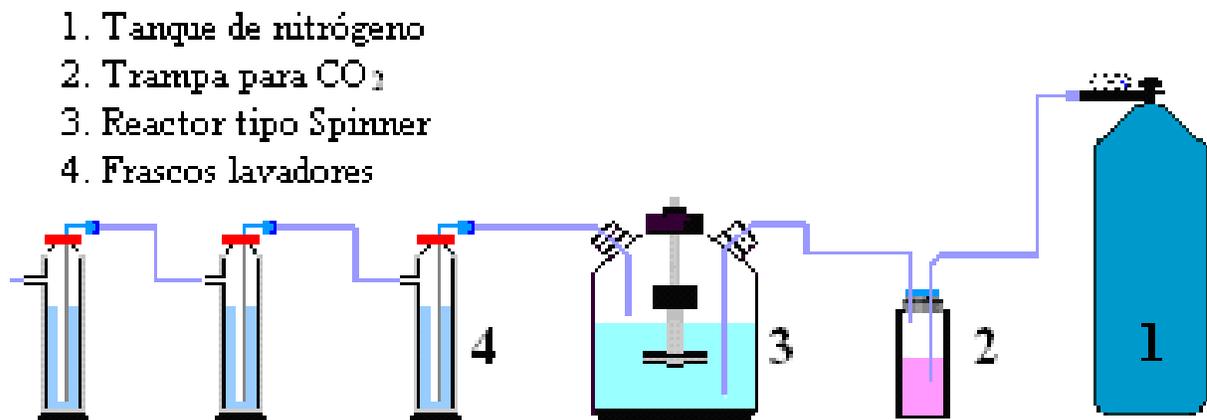
Las pruebas se realizan con base en el método de Sturm, el cual consiste en un ensayo aerobio discontinuo en el que la mineralización de la sustancia se monitorea por medio de la medición del CO<sub>2</sub> producido (OCDE, 1992). La prueba anóxica contempla la adición del compuesto de estudio (30 mg C/l) como única fuente de carbono y energía. Como medio de cultivo, se utiliza un medio anaerobio (Madsen *et al.*, 1995), cuya composición se enriquece con KNO<sub>3</sub> (252 mg/l; Tabla 5.2).

**Tabla 5.2** Composición del medio de cultivo anóxico (mg/l)

<b>Buffer de fosfatos</b>	270	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	840	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
<b>Sales minerales</b>	530	NH <sub>4</sub> Cl
	100	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O
	75	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O
<b>Metales traza</b>	1.0	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O
	0.5	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O
		MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O
	0.05	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
		Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>
		NiCl <sub>2</sub>
		ZnCl <sub>2</sub>
0.04	CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	
0.01	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	
<b>Aceptor de electrones</b>	252	KNO <sub>3</sub>

### 5.3.1 Dispositivo experimental

El dispositivo experimental consiste en un reactor de policarbonato de tipo Spinner con un volumen útil de 1 l, a cuya tapa se adapta un imán que permite agitar magnéticamente el contenido. En el reactor de prueba se deposita la molécula de estudio en una cantidad conocida (30 mg C/l), así como el medio de cultivo y un inóculo bacteriano. Para garantizar un medio anóxico, el reactor se alimenta continuamente con  $N_2$ , del cual se remueven eventuales trazas de  $CO_2$  mediante su paso por una trampa que contiene KOH 5N (Figura 5.3). A la salida de gases de este reactor se conecta una serie de frascos lavadores de vidrio que contienen 100 ml de  $Ba(OH)_2$  0.0125M previamente estandarizado, con la finalidad de capturar el  $CO_2$  producido. Por cada prueba de biodegradabilidad se corre en paralelo un reactor testigo, o de respiración endógena, al cual no se añade el compuesto orgánico de estudio.



**Figura 5.3** Dispositivo experimental de las pruebas de biodegradabilidad anóxica

### 5.3.2 Medición del $CO_2$ producido

Durante los ensayos de biodegradabilidad anóxica, luego de observar la aparición de un precipitado en los frascos lavadores, se desconecta el primero de la serie y se recorren los demás frascos colocando uno con nueva solución de  $Ba(OH)_2$ . La solución de cada frasco que se retira se filtra y se titula con HCl 0.05M (previamente estandarizado con  $Na_2CO_3$ ) en presencia de fenolftaleína. El porcentaje de biodegradación se calcula corrigiendo la cantidad de  $CO_2$

capturado en el reactor de prueba con el que se captura en el testigo de respiración endógena, y relacionándola con la cantidad inicial de carbono introducido en el ensayo.

La cantidad de C mineralizado se calcula de acuerdo a las siguientes expresiones:

$$C = [(N_B * V_0 / N_A) - X * (V_t / V_s)] * N_A * f \quad (5.7)$$

$$C = [50 * N_B - X * (V_t / V_s)] \quad (5.8)$$

Donde:

C = Carbono expresado como CO<sub>2</sub> (mmol)

N<sub>B</sub> = Normalidad de Ba(OH)<sub>2</sub>

V<sub>0</sub> = Volumen original de la solución de Ba(OH)<sub>2</sub> (100 ml)

V<sub>s</sub> = Volumen de la solución de Ba(OH)<sub>2</sub> (40 ml)

V<sub>t</sub> = Volumen de la solución de Ba(OH)<sub>2</sub> antes de la titulación

N<sub>A</sub> = Normalidad de la solución de HCl

X = Volumen de la solución de HCl usado para la titulación (ml)

f = basicidad regresiva del ácido carbónico (0.5)

## 5.4 PRUEBAS DE BIODEGRADABILIDAD AEROBIA

Se llevaron a cabo pruebas de biodegradabilidad aerobia según dos métodos distintos, a saber OCDE 301 A y F, los cuales monitorean la disminución del carbono orgánico disuelto y el consumo de oxígeno, respectivamente (OCDE, 1992).

### 5.4.1 Método OCDE 301 A

Para esta prueba se emplearon matraces Erlenmeyer con capacidad de 500 ml, en los cuales se colocaron 250 ml de medio de cultivo (Tabla 5.3), el inóculo bacteriano (extracto de sedimento lacustre o inóculo comercial) y la molécula orgánica (30 mg C/l). Los matraces se incubaron a una temperatura de 25°C y bajo agitación constante. La prueba se realiza en paralelo a un

ensayo testigo en el que no se incluye la molécula de estudio. Originalmente, esta prueba contempla la determinación de la concentración de COD (OCDE, 1992); sin embargo, a falta del equipo necesario, la biodegradabilidad se determinó analizando colorimétricamente la concentración de fenol, la molécula de estudio (§ 5.7.1). El monitoreo de la prueba se realizó tomando muestras periódicas de 10 ml a los matraces testigo y ensayo.

**Tabla 5.3** Composición del medio de cultivo aerobio (mg/l)

<b>Buffer de fosfatos</b>	85	$\text{KH}_2\text{PO}_4$
	217.5	$\text{K}_2\text{HPO}_4$
<b>Sales minerales</b>	5	$\text{NH}_4\text{Cl}$
	503	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
	18.2	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
	22.5	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
<b>Metales traza</b>	0.25	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

#### 5.4.2 Método OCDE 301 F

Para estas pruebas, se utilizó el sistema OxiTop (WTW Measurement Systems, Alemania), el cual registra la DBO de modo automático durante 5 días. Dicho sistema utiliza botellas cerradas, en las que la despresurización provocada por el consumo de oxígeno relacionado a la biodegradación de la materia orgánica es registrada por sensores electrónicos piezorresistivos. El inóculo de estas pruebas se preparó como se indica en la sección 5.5.3, mientras que el medio de cultivo es el que se describe en la Tabla 5.3 (OCDE, 1992). La sustancia de prueba se añade a razón de 50-100 mg DTO/l. La DTO (demanda teórica de oxígeno) corresponde a la cantidad de oxígeno necesaria para la oxidación total de la molécula a  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ . Para cada prueba se corre un testigo de respiración endógena, al cual no se añade la sustancia de prueba. Los valores de DBO se obtienen al multiplicar las lecturas diarias, corregidas con las del testigo endógeno, por un factor que depende del volumen del ensayo.

## 5.5 INÓCULOS MICROBIANOS

Con la finalidad de seleccionar el inóculo más adecuado para las pruebas anóxicas, se estudiaron tres consorcios microbianos: sedimentos lacustres, extractos de sedimento y un inóculo comercial.

### 5.5.1 Sedimentos lacustres

Los sedimentos lacustres se obtuvieron según lo descrito en la sección 5.1. Luego de la incubación de cada sedimento, se eliminó el agua sobrenadante y la mayor cantidad posible de materia vegetal, y se analizó el contenido de humedad. Con base en lo anterior, se determinó la cantidad de sedimento húmedo que se debe añadir a la prueba, para que pueda introducirse 1 g de sedimento seco por cada litro de medio de cultivo.

### 5.5.2 Extractos de sedimento

Una manera más viable de emplear el material sedimentario como inóculo fue preparando extractos de sedimento, con la finalidad de introducir al ensayo una menor cantidad de materia orgánica. Para ello, luego de eliminar el agua sobrenadante, se prepara una solución salina isotónica de NaCl al 0.7% m/v, la cual se adiciona a una cierta cantidad de sedimento húmedo. El sedimento se introduce a razón de 1 g de sedimento seco por cada 50 ml de solución salina, previa determinación de su contenido de humedad (§ 5.2.8). Las muestras se agitan durante 30 minutos, al término de los cuales se mantienen en reposo durante igual lapso de tiempo. Posteriormente, se recupera el extracto. La relación de inoculación empleada es de 1% v/v.

### 5.5.3 Inóculo comercial

Para emplear un inóculo comercial de calidad estándar en las pruebas de biodegradabilidad, se utilizaron cápsulas de lodos activados deshidratados (Polyseed®, Interlab, Texas, E.U.A) comúnmente empleadas en pruebas de demanda bioquímica de oxígeno (DBO). La suspensión se preparó adicionando una cápsula a 500 ml de medio de cultivo. La mezcla se agita durante 1

hora, tras la cual se deja reposar 30 minutos para posteriormente sustraer el sobrenadante y emplearlo como inóculo.

## 5.6 ANÁLISIS DE LA VIABILIDAD CELULAR

El método utilizado se basa en el descrito por Fung *et al.* (1976). Se preparan diluciones decimales seriadas mediante la adición sucesiva de 1 ml de extracto de sedimento o de suspensión de inóculo comercial a 9 ml de solución salina isotónica (NaCl 0.7% m/v). Para cada dilución se colocan equidistantemente 5 gotas de 20  $\mu$ l en una placa de Petri con medio de cultivo no selectivo previamente solidificado. El medio de cultivo contiene peptona de caseína, extracto de carne y dextrosa (24 g/l; Bioxon, México). Las placas se incuban a 30°C, y el número de colonias (N) en cada gota se determina al cabo de 24 y 48 horas de incubación. La densidad de unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml) se calcula según la expresión siguiente:

$$\text{Viabilidad [UFC/ml]} = 50 * N * 10^D \quad (5.9)$$

Donde:

D = la dilución correspondiente

## 5.7 ANÁLISIS DE MOLÉCULAS XENOBIÓTICAS

### 5.7.1 Medición colorimétrica de fenol

El método utilizado es el descrito por Woolard e Irvine (1995). A 2 ml de muestra se adicionan 0.2 ml de solución de  $K_3Fe(CN)_6$  al 5% (m/v) en glicina 0.1M. Se agita y se deja reaccionar durante 5 minutos. Al cabo de este tiempo, se agregan 2 ml de solución de 4-aminoantipirina al 0.25% (m/v) disuelta en solución tampón de glicina (preparada por disolución de 5.58 g de hidrocloreuro de glicina y de 3.75 g de glicina en 0.91 l de agua destilada, ajustando el pH a 9.7 con una solución de NaOH 6N para un volumen final de 1 l). La mezcla se agita y se deja

reaccionar durante 20 minutos. La absorbancia a 506 nm se mide en un lapso máximo de 30 minutos, ya que una lectura posterior a este tiempo provoca una disminución en la respuesta del análisis. La concentración de fenol de la muestra se obtiene por comparación con una curva de calibración (0-25 mg/l).

---

---

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

---

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DE LOS SEDIMENTOS DE LA LAGUNA DE TECOCOMULCO, HGO.

El análisis fisicoquímico de los sedimentos lacustres permitió conocer ciertos parámetros pertinentes, tales como textura, pH y las concentraciones de nitratos, nitritos, fósforo y carbono orgánico e inorgánico. Estos resultados, correspondientes a la media aritmética obtenida a partir de análisis realizados por triplicado, se muestran en la Tabla 6.1.

En primer término, se encontró que las características de los sedimentos difieren grandemente en muestras independientes, como lo demuestran los coeficientes de variación (CV). Painter (1995) hace referencia a la gran heterogeneidad que es frecuente en la calidad de los sedimentos, y advierte acerca del efecto que ésta puede tener en los resultados de las pruebas de biodegradabilidad. No obstante, esta variabilidad es también típica de muestras de lodos activados, que constituyen la fuente de inóculo más frecuente de las pruebas de biodegradabilidad (Vázquez-Rodríguez *et al.*, 2003).

Respecto a la textura, se encontró que el porcentaje predominante corresponde a la fracción arcillosa, seguida de arena y limo, respectivamente. En la Figura 6.1 se muestra el porcentaje promedio de cada fracción, calculado a partir de todos los muestreos. Si se considera este porcentaje promedio, y según la Figura 5.2, los sedimentos estudiados pueden clasificarse como arcilla ligeramente arenosa. Estos resultados concuerdan con los de Huízar-Álvarez *et al.* (2001), quienes reportan que el estrato más superficial de la cuenca de la laguna de Tecocomulco es arcilloso y tiene alrededor de 20 m de profundidad.

Según la norma OCDE 308 (OCDE, 2002), un sedimento se clasifica por su textura y contenido de carbono orgánico. De tal suerte que, para llevar a cabo esta prueba, deben utilizarse, por una parte, un sedimento con una textura “fina” y un alto contenido de carbono

orgánico (2.5-7.5%) y, por la otra, un sedimento con textura “gruesa” y bajo contenido de carbono orgánico (0.5-2.5%). La textura “fina” se define por un contenido de arcilla y limo superior al 50%, mientras que una textura “gruesa” se caracteriza por un contenido de estas fracciones inferior al 50%. La diferencia en la suma de estas fracciones en ambos sedimentos deberá ser de al menos 20%.

Así, el contenido promedio de arcillas medido durante los distintos muestreos (52.7%) permite prever una presencia significativa de materia orgánica. Sin embargo, se cuantificó un promedio de 0.96% de carbono orgánico. Este valor es reducido, si se considera lo estipulado por la norma OCDE 308 (2002) y lo medido por Bonnet (2000; 0.45-7.40%), Esteves *et al.* (2001; 1.0 - 6.9%) y Kalsch *et al.* (1999; 0.22-1.84%) en muestras sedimentarias con diferentes texturas. Considerando el contenido de arcillas y de C orgánico, los sedimentos analizados no pueden ser considerados de textura “gruesa” ni “fina”, y no habrían podido ser utilizados como inóculo de la prueba OCDE 308.

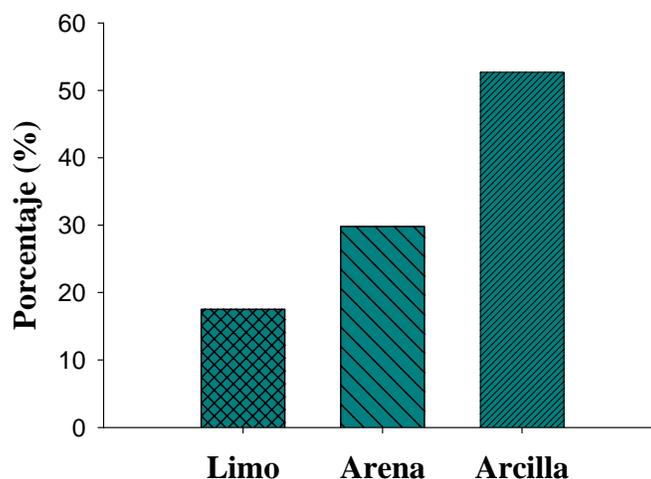
Se estimó que el carbono inorgánico constituye, en promedio, 0.39% de la masa de los sedimentos. Para este parámetro se han reportado valores comprendidos entre 0.3 y 8.9% (Bonnet, 2000). Aunque el contenido de C inorgánico se encuentra dentro de este rango, es posible atribuir su bajo valor a las técnicas utilizadas en los trabajos anteriormente mencionados, las cuales manejan un medidor de COT.

Cabe mencionar que, aunque los contenidos de carbono orgánico e inorgánico son inferiores con respecto a lo mencionado por otros autores, pueden alterar considerablemente los resultados de las pruebas de biodegradabilidad, puesto que generan CO<sub>2</sub> adicional al producido por la molécula de estudio. Por tal motivo, el uso de sedimentos enteros como inóculo de las pruebas de biodegradabilidad podría no ser recomendable.

**Tabla 6.1** Caracterización fisicoquímica de los sedimentos muestreados durante la investigación

Parámetro	Muestras						Media	Desviación estándar	CV (%)
	1	2	3	4	5	6			
% Arcilla	54.2	44	50.9	58.9	58.1	49.8	52.7	5.6	10.6
% Limo	20.7	8	33.3	3.3	17.3	22.6	17.5	10.8	61.3
% Arena	25.1	48	15.8	37.8	24.6	27.6	29.8	11.4	38.1
% C orgánico	0.97*	1.02*	0.99*	0.94	0.96*	0.92*	0.96	0.035	3.6
% C inorgánico	0.24*	0.26*	0.41*	0.39	0.46*	0.56*	0.39	0.12	31.3
NO <sub>2</sub> - [mg/kg]	0.12	0.24	20.65	1.6	31.65	2.07	9.39	13.46	143.4
NO <sub>3</sub> - [mg/kg]	18.13	25	339.7	13.1	148.14	130.4	112.41	126.22	112.3
P [mg/g]	7.4*	7.3	9.76	22.5	1.98	0.87	8.30	7.76	93.4
pH	7.4	6.2	7.1	8.4	7.2	7.3	7.3	0.7	9.7
Densidad	1.12	1.15*	1.19*	1.4*	1.2*	1.13*	1.20	0.10	8.7

\* Dato calculado a partir de dos réplicas



**Figura 6.1** Porcentaje total de las fracciones que integran el sedimento

Por otra parte, la concentración de nitratos sí se encuentra en el mismo orden de magnitud que lo descrito en la bibliografía. El promedio encontrado en este estudio es 112.41 mg/g de sedimento seco, equivalente a 1.81  $\mu\text{mol/g}$  de sedimento seco, mientras que Esteves *et al.* (2001) calcularon valores comprendidos entre 0.8 y 1.1  $\mu\text{mol/g}$  en sedimentos provenientes del Lago Batata, en el Amazonas, e impactados por diversas actividades antropogénicas. A partir del análisis de nitratos, sulfatos, elementos traza y coliformes del agua subterránea del área de Tecocomulco, Huízar-Álvarez *et al.* (2001) concluyen que en este sitio existen problemas de contaminación asociada con aportes superficiales, tales como la descarga de aguas residuales, la influencia de fosas sépticas y fertilizantes químicos.

Tanto nuestros datos como los de Huízar-Álvarez *et al.* (2001) sugieren que, en el medio sedimentario estudiado, la desnitrificación puede ser un mecanismo importante de eliminación de materia orgánica, ya que la concentración de nitratos (junto con la de oxígeno y de materia orgánica) son los factores que la limitan *in situ* (Esteves *et al.*, 2001).

En lo que respecta a los valores de pH, estos también pueden compararse con lo que reportan Kalsch *et al.* (1999), a saber un rango de 7.2-7.6. Sin embargo, los valores de fósforo obtenidos no pudieron ser comparados con ningún autor, puesto que nuestros datos corresponden a concentraciones de fósforo y no de fosfatos, como lo reportan otros investigadores. Aún así, los

resultados obtenidos para este parámetro permiten confirmar la variabilidad de las características presentadas por muestras distintas de sedimentos lacustres.

## 6.2 VALIDACIÓN DEL DISPOSITIVO EXPERIMENTAL

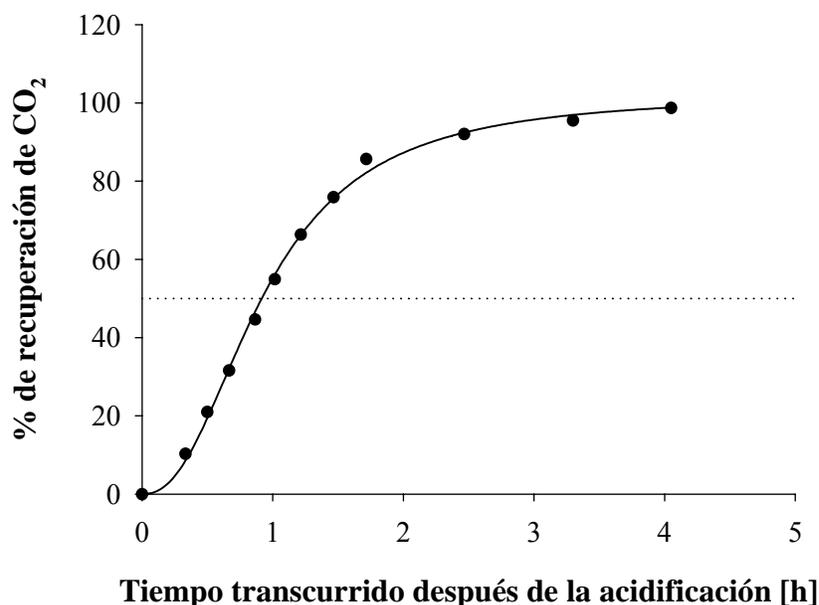
La prueba de biodegradabilidad anóxica que se propone en este trabajo se basa en el método de Sturm, el cual requiere una captura eficaz del CO<sub>2</sub> producido. En su revisión bibliográfica, Painter (1995) enumera los inconvenientes de este método, entre los que destaca la acumulación de carbono inorgánico en el medio de cultivo. Esta acumulación es consecuencia de la biodegradación de la sustancia de prueba, la cual en medio básico produce bicarbonatos; sin embargo, al no traducirse en CO<sub>2</sub> capturado en las trampas respectivas, la mineralización de la sustancia puede subestimarse.

Por tal motivo, el propósito de este experimento fue tener la certeza de que en el dispositivo empleado (§ 5.3.1) no se presentaran fugas o la acumulación de carbono inorgánico que falsearan los resultados de las pruebas. Para ello, se realizó un ensayo de captura de CO<sub>2</sub> introduciendo NaHCO<sub>3</sub> al reactor, a razón de 525 mg/l. El desplazamiento hacia la izquierda del equilibrio mostrado en la Ecuación 6.1 (pK<sub>a</sub> = 6.35) se completa a valores de pH inferiores a 4.3, razón por la cual se añaden al medio 2 ml de HCl concentrado. Esta reducción del pH (< 2) permite un desprendimiento teórico de 275 mg de CO<sub>2</sub>.



La evolución del porcentaje de CO<sub>2</sub> recuperado en función del tiempo transcurrido después de la adición del HCl concentrado se puede apreciar en la Figura 6.2. Al cabo de 4 h la recuperación de CO<sub>2</sub> alcanzó un 98.7%, lo cual puede considerarse satisfactorio. En efecto, Calmon *et al.* (2000) refieren una recuperación del 97 ± 3% en un sistema automatizado para la medición de la biodegradabilidad de polímeros, esto después de transcurridas 5 h a partir de la acidificación del medio. Así mismo, Larson *et al.* (1996) reportan una recuperación superior al

98% en su sistema, también utilizando  $\text{NaHCO}_3$ ; no obstante, este porcentaje se alcanza al cabo de 24 h.



**Figura 6.2** Cinética de captura de  $\text{CO}_2$ . Los puntos representan los datos experimentales; la línea continua, el ajuste del modelo logístico, y la discontinua, un nivel de 50% de recuperación de  $\text{CO}_2$

Larson *et al.* (1996) pusieron en marcha la prueba de Sturm utilizando un sistema regulador de corriente de aire y otro de agitación, así como un dispositivo de prueba con un inóculo de lodos activados en un medio de sales minerales y la sustancia de estudio. El aire fue conducido primero a través de trampas con  $\text{NaOH}$  5N y luego de otras conteniendo  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  para eliminar el  $\text{CO}_2$ . El  $\text{CO}_2$  producido por biodegradación fue capturado en frascos de cristal con 100 ml de  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  0.024N conectados en serie con la línea de aire de la salida del frasco de prueba, y posteriormente medido por titulación del  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  con  $\text{HCl}$  0.05N. También se cuantificó el carbono inorgánico disuelto (CID), con lo que pudo comprobarse que las fases de retraso del  $\text{CO}_2$  y la acumulación del CID en la solución no tienen un impacto significativo en las mediciones de  $\text{CO}_2$  durante las cinéticas de biodegradación. Este experimento ha permitido desarrollar una base de datos considerable, que apoya la exactitud y la confiabilidad de la información cinética generada por el método de Sturm.

Larson *et al.* (1996) encontraron que la producción de CO<sub>2</sub> podía ajustarse a un modelo cinético de primer orden con una fase de latencia (Ecuación 6.2):

$$y = a(1 - e^{-k_1(t-c)}) \quad (6.2)$$

donde:

y = % de recuperación de CO<sub>2</sub>

t = tiempo [d]

a = asíntota de la curva (% CO<sub>2</sub>)

k<sub>1</sub> = constante de velocidad [d]

c = tiempo de latencia observado antes que ocurra la producción de CO<sub>2</sub> [d]

Cuando la Ecuación 6.2 se ajustó a los datos experimentales, Larson *et al.* (1996) encontraron que el tiempo de vida media (t<sub>1/2</sub>), es decir, el tiempo necesario para recuperar el 50% del desprendimiento teórico de CO<sub>2</sub>, es de 5 h. Los autores consideraron que el t<sub>1/2</sub> obtenido reflejaba la ausencia de limitaciones de transferencia de masa, puesto que en una prueba de biodegradabilidad generalmente se presentan velocidades de producción de CO<sub>2</sub> mayores.

Para nuestros experimentos, se encontró que una ecuación logística con tres parámetros describe más adecuadamente la cinética del desprendimiento de CO<sub>2</sub> (Ecuación 6.3):

$$y = \frac{a}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^b} \quad (6.3)$$

El modelo se ajustó a los datos experimentales utilizando el programa SigmaPlot 9.0 (Systat Software Inc., E.U.A.). Los valores encontrados fueron los siguientes:

a = 102.088

b = -2.3217

x<sub>0</sub> = 0.9331

La simulación del modelo se muestra con una línea continua en la Figura 6.2, donde puede observarse un ajuste adecuado a los datos experimentales ( $r^2 = 0.9995$ ). Con el modelo se calculó un  $t_{1/2}$  de 0.9176 h, con lo que puede decirse que en nuestro sistema de medición tampoco se presentan limitaciones de transferencia de masa.

Nosotros podemos concluir que el sistema es confiable para ser usado en los ensayos de biodegradabilidad anóxica. Sin embargo, es importante mantener el dispositivo experimental totalmente cerrado y prevenir las fugas, así como una agitación constante. Por otra parte, es indispensable respetar un lapso de 4 h después de la acidificación del medio, para que la totalidad del  $\text{CO}_2$  producido pueda ser tomado en cuenta.

### 6.3 SELECCIÓN DEL INÓCULO MICROBIANO

La elección del inóculo microbiano que debe utilizarse en una prueba de biodegradabilidad es un punto clave en el diseño de la misma, debido a que ésta es la variable que más afecta la reproducibilidad del método (Vázquez-Rodríguez y Beltrán-Hernández, 2004). Así, en este trabajo se estudiaron dos posibles fuentes, a saber material sedimentario y un inóculo comercial. Este último se consideró debido a los problemas de reproducibilidad que se presentan cuando se usan inóculos de origen natural, como lodos activados, suelos, aguas superficiales y marinas, entre otros. Por ejemplo, Kool (1984) reportó diferencias en los resultados arrojados por la prueba OCDE 301 E al probar la biodegradabilidad del 4-nitrofenol. Esta molécula fue completamente degradada por un inóculo obtenido a partir de agua residual doméstica; sin embargo, cuando se introdujo sedimento de río no se observó biodegradación alguna durante los 28 días de la prueba, mientras que la inoculación con suelo produjo una biodegradación de 60% durante el mismo lapso. Incluso cuando se utiliza la misma fuente de inóculo se presentan discrepancias, ya que Van Ginkel *et al.* (1995) reportaron que el sulfonato de dodecibenceno pudo alcanzar el nivel de biodegradación requerido por la prueba OCDE 301 D cuando se utilizó un lodo activado proveniente de una planta de tratamiento, y no cuando el lodo se muestreó en otra planta.

Por otra parte, Tabka *et al.* (1993) reportan que el uso de un inóculo comercial (Actizym<sup>®</sup>, Europactizym, Suiza) permite obtener densidades microbianas más heterogéneas, así como una buena reproducibilidad cuando se prueba la biodegradabilidad de moléculas xenobióticas con el método Zahn-Wellens.

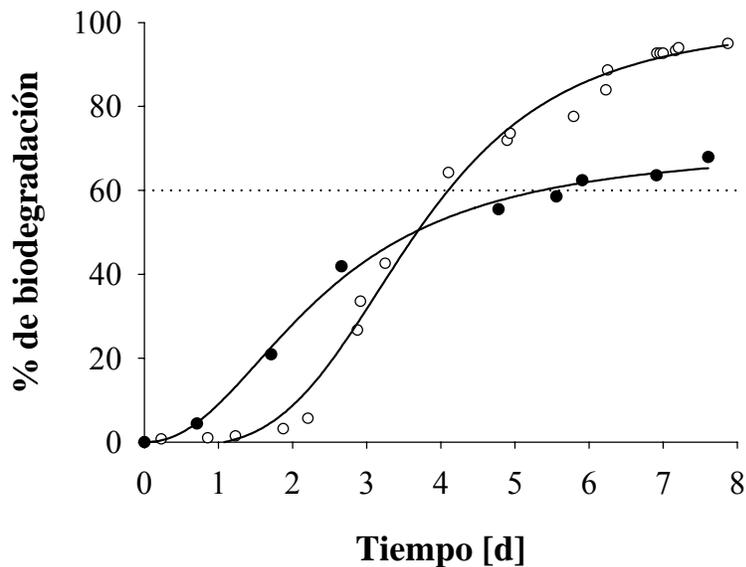
Por tal motivo, se evaluó el desempeño de un inóculo comercial, que consiste en cápsulas deshidratadas de lodos activados utilizadas para inocular pruebas aerobias de DBO. Con las cápsulas se preparó una suspensión según el procedimiento descrito en la sección 5.5.3. El objetivo principal de los experimentos consistió en saber si un inóculo de naturaleza eminentemente aerobia podía degradar materia orgánica en condiciones desnitrificantes. Posteriormente, se llevaron a cabo pruebas con material sedimentario entero o con un extracto del mismo. Cabe mencionar que con estos inóculos se respetaron los requisitos que la OCDE impone para que puedan ser utilizados en pruebas de biodegradabilidad inmediata: i) que sean de origen natural; ii) que su densidad celular sea inferior a  $10^6$ /ml, y finalmente iii) que no hayan sido expuestos a la molécula de prueba. En todos los casos, la molécula de estudio fue glucosa, la cual es una molécula de referencia positiva muy utilizada en condiciones aerobias (Painter, 1995).

### **6.3.1 Pruebas de biodegradabilidad con un inóculo comercial (Polyseed<sup>®</sup>)**

Se llevaron a cabo dos pruebas de biodegradación de glucosa en condiciones anóxicas utilizando 100 y 10 ml de suspensión Polyseed<sup>®</sup> como inóculo, lo que equivale a razones de inoculación de 10 y 1% v/v, respectivamente. Previamente a su inoculación, se analizó la viabilidad celular de la suspensión Polyseed<sup>®</sup> en condiciones aerobias (§ 5.6). Se observó un contenido de células cultivables de  $1.41 \cdot 10^6 \pm 2.86 \cdot 10^5$  UFC/ml ( $n = 10$ ; CV = 20.3%), el cual es semejante al mostrado por sobrenadantes de lodos activados (Vázquez-Rodríguez *et al.*, 2003).

Los resultados de ambas pruebas se muestran en la Figura 6.3. Aunque mostró una velocidad de degradación mayor, el ensayo inoculado al 10% arrojó un nivel de biodegradación de

67.9%, mientras que el ensayo inoculado al 1% alcanzó un nivel superior, de 98.0%. Lo anterior se debe a que un ensayo respirométrico inoculado con altas concentraciones de biomasa proporciona elevados valores de CO<sub>2</sub> capturado en el reactor testigo, lo cual falsea los datos de biodegradación de la molécula de estudio. De hecho, Struijs *et al.* (1997) advierten acerca del riesgo de utilizar niveles de inoculación que conduzcan a una respiración endógena superior al 10% del CO<sub>2</sub> producido por biodegradación.



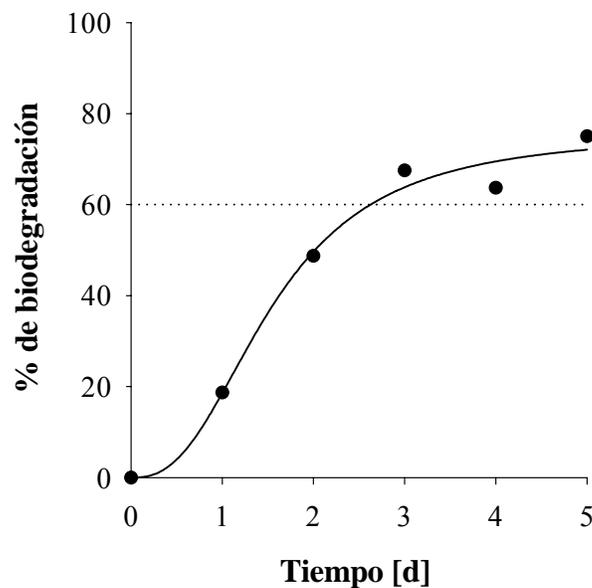
**Figura 6.3** Cinéticas de biodegradación anóxica de glucosa con suspensión de Polyseed<sup>®</sup> a (●) 10% v/v y (○) 1% v/v como niveles de inoculación

Se ha reportado que la concentración inicial del inóculo define la cinética de biodegradación, el grado de mineralización de la sustancia y, por ende, la obtención de un resultado positivo en las pruebas de biodegradabilidad. Por lo general, se considera que el uso de mayores densidades celulares conduce a niveles de biodegradación superiores, ya que tanto la cantidad de carbono asimilado por la biomasa como la producción de metabolitos se reducen (Vázquez-Rodríguez *et al.*, 1999). Sin embargo, en nuestros experimentos esto no se aplica, debido principalmente a la elevada producción de CO<sub>2</sub> que se constató en el testigo de respiración endógena del ensayo inoculado a 10%.

Por lo anteriormente expuesto, se seleccionó un nivel de inoculación del 1% v/v para los ensayos posteriores. Este nivel de inoculación también es aconsejado por la norma europea ECN (2002) para la determinación de la biodegradabilidad de materiales de embalaje en medio acuoso utilizando sobrenadante de lodos activados como inóculo.

Las cinéticas de biodegradación mostradas en la Figura 6.3 se ajustaron a un modelo cinético con la forma de la Ecuación 6.3. Para el ensayo inoculado al 10%, se calculó un tiempo de latencia de 1.07 d, y un tiempo de vida media de 3.65 d. Para el ensayo inoculado al 1%, estos valores corresponden a 2.08 y 3.69 d, respectivamente. Si, como en las pruebas de biodegradabilidad inmediata aerobias, se estipula que el nivel mínimo de biodegradación a alcanzar es el 60% (OCDE, 1992), en ambos casos la glucosa puede considerarse fácilmente biodegradable en un medio sedimentario desnitrificante.

En condiciones aerobias, la glucosa se biodegradó en un 75% al cabo de 5 días, según el procedimiento descrito en la sección 5.4.2, para una relación de inoculación de 1% v/v con suspensión de Polyseed<sup>®</sup>. La cinética obtenida se muestra en la Figura 6.4, la cual se ajustó a un modelo cinético con la forma de la Ecuación 6.3.

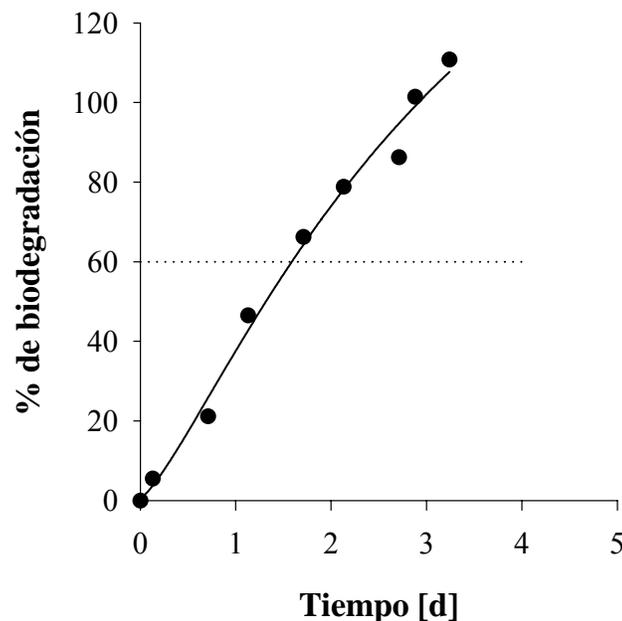


**Figura 6.4** Cinética de biodegradación aerobia de glucosa con suspensión de Polyseed<sup>®</sup> a 1% v/v como inóculo

Con ayuda del modelo se calcularon los tiempos de latencia y de vida media de la glucosa, que correspondieron a 0.74 y 2.01 d, respectivamente. Como indican estos valores, incluso para una molécula fácilmente biodegradable como la glucosa pueden observarse cinéticas de biodegradación más lentas en condiciones desnitrificantes que en medios aerobios.

### 6.3.2 Prueba de biodegradabilidad con un sedimento entero

El objetivo de este experimento fue evaluar la posibilidad de inocular las pruebas de biodegradabilidad anóxica con sedimento entero. Por tal motivo, se llevó a cabo la prueba utilizando glucosa como molécula fácilmente biodegradable, según lo descrito en la sección 6.3.1. Debido a que las pruebas de simulación de la OCDE se llevan a cabo en columnas y la cantidad de sedimento a añadir se fija en cm de espesor, se tomó como base la prueba ISO 14592, la cual señala un rango de concentración de sólidos de 0.1-1 g/l (ISO, 2002). Consecuentemente, se empleó un nivel de inoculación de 1 g/l. Los resultados se muestran en la Figura 6.5.



**Figura 6.5** Cinética de biodegradación anóxica de glucosa con sedimento lacustre entero como inóculo

La inoculación de la prueba con 1 g de sedimento entero introdujo a la prueba una elevada concentración de carbono orgánico, que afectó los resultados y produjo un nivel de biodegradación superior al 100%. Cabe señalar que en las pruebas respirométricas es imposible obtener 100% de biodegradación, puesto que una parte del carbono proporcionado por la sustancia de prueba es utilizado para la síntesis de nueva biomasa y de metabolitos (Vázquez-Rodríguez *et al.*, 1999). Así mismo, es posible observar que la cinética es más rápida, debido posiblemente a la alta concentración del inóculo, y que la forma de la curva es muy distinta a la forma sigmoideal que caracteriza a los procesos que ocurren durante las pruebas de biodegradabilidad. El ajuste de los datos a un modelo logístico de cuatro parámetros permitió estimar en 0.32 y 1.32 d los tiempos de latencia y de vida media, respectivamente.

Se ha encontrado que la adición de una sustancia fácilmente biodegradable estimula la degradación de la materia orgánica nativa del suelo, lo que se conoce con el nombre de imprimación (Vázquez-Rodríguez y Beltrán-Hernández, 2004). Este fenómeno bien pudo haberse producido en el sedimento utilizado como inóculo. En virtud de lo anterior, se descartó el empleo de sedimento entero en la prueba de biodegradabilidad anóxica.

### **6.3.3 Prueba de biodegradabilidad con un extracto de sedimento**

En este experimento, el inóculo se preparó según la descripción proporcionada en el apartado 5.5.2. Se determinó la viabilidad celular de los extractos preparados a partir de distintos muestreos de material sedimentario, y se encontraron valores promedio de  $1.06 \cdot 10^3 \pm 2.25 \cdot 10^2$  UFC/ml ( $n = 6$ ; CV = 21.4%). Cabe destacar que el CV mostrado por la viabilidad de los extractos de sedimento es muy semejante al que presenta el inóculo comercial. La relativa homogeneidad de este parámetro contrasta con la variabilidad observada en las características de los sedimentos enteros (§ 6.1), lo cual apoya su uso como inóculo en la prueba de biodegradabilidad.

Por otra parte, se determinó el pH y las concentraciones de nitratos, nitritos y fósforo en dos extractos de sedimento, para conocer si éste aporta nutrientes adicionales a los proporcionados en el medio de cultivo. En la Tabla 6.2 se muestran los resultados correspondientes a la media aritmética obtenida a partir de los análisis realizados por triplicado. Primeramente, podemos observar que el pH varió ligeramente entre las dos muestras analizadas; sin embargo, esto no debería implicar un desajuste del pH del medio de cultivo, puesto que se utilizó una razón reducida de inoculación (1% v/v). En lo que respecta a las concentraciones de nitratos y nitritos, los valores son iguales en ambas muestras, e indican que el inóculo aportará una mínima cantidad de estos iones a los ensayos de biodegradabilidad. Cabe mencionar que, aun cuando la concentración de nitratos es baja con respecto al sedimento entero, sugiere que pueden ser utilizados como aceptores externos de electrones, y que la desnitrificación puede ocurrir en el medio sedimentario estudiado. Muy posiblemente, y como sugieren Huízar-Álvarez *et al.* (2001), la presencia de nitratos en el lago se debe a las actividades agrícolas que se llevan a cabo en la zona. Por último, se detectó una concentración de fósforo, el cual participa como nutriente en las pruebas de biodegradabilidad, Sin embargo, aun cuando la concentración de éste fue mayor que la concentración de nitratos, es poco significativa debido al nivel de inoculación antes mencionado.

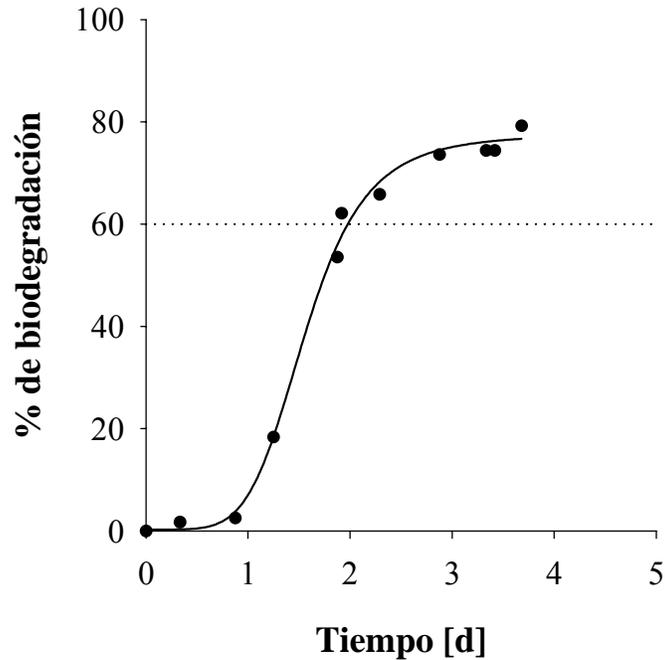
**Tabla 6.2** Caracterización fisicoquímica de los extractos de sedimento utilizados en las pruebas de biodegradación anóxica

Parámetro	Extractos de sedimento		Media	Desviación estándar	CV (%)
	1	2			
pH	7.7	7.4	7.6	0.2	2.6
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> [mg/l]	0.0003	0.0003	0.0003*	-	-
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> [mg/l]	0.003	0.003	0.003*	-	-
P [mg/l]	0.38	0.32	0.35	0.04	11.42

\*Dato calculado a partir de dos réplicas

Cuando se usó el extracto de sedimento como inóculo, la glucosa se degradó rápidamente en el medio anóxico, tal y como se observa en la Figura 6.6. De acuerdo a este resultado, se seleccionó el extracto de sedimento como el inóculo más adecuado para las pruebas de

biodegradabilidad anóxica, ya que además de ser más relevante que el inóculo comercial desde el punto de vista ambiental, parece presentar características más homogéneas en muestras distintas que los sedimentos enteros.



**Figura 6.6** Cinética de biodegradación anóxica de glucosa con extracto de sedimento lacustre como inóculo

**Tabla 6.3** Tiempos de latencia ( $t_L$ ) y de vida media ( $t_{1/2}$ ) de la biodegradación de glucosa estudiada con los distintos inóculos

Inóculo (nivel de inoculación)	$t_L$ [d]	$t_{1/2}$ [d]
<b>Biodegradación anóxica</b>		
Solución de Polyseed® (1% v/v)	2.08	3.69
Solución de Polyseed® (10% v/v)	1.07	3.66
Sedimento entero (1 g/l)	0.32	1.32
Extracto de sedimento (1% v/v)	1.09	1.75
<b>Biodegradación aerobia</b>		
Solución de Polyseed® (1% v/v)	0.74	2.01

El ajuste de la Ecuación 6.3 a los datos experimentales permitió estimar los tiempos de latencia y de vida media de la glucosa en la prueba desarrollada en las condiciones ya

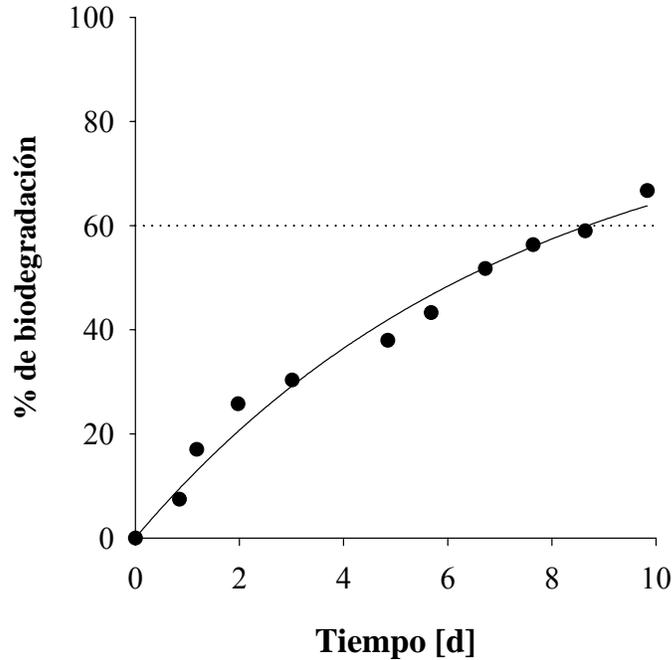
mencionadas. Estos tiempos equivalen a 1.09 y 1.75 d, respectivamente. En la Tabla 6.3 se presenta un resumen con los tiempos de biodegradación de la glucosa que se obtuvieron con los distintos inóculos.

## **6.4 PRUEBAS DE BIODEGRADABILIDAD DE MOLÉCULAS XENOBIÓTICAS**

Para evaluar la biodegradabilidad anóxica de moléculas xenobióticas, se eligieron moléculas fácilmente biodegradables en aerobiosis, como la anilina y el fenol. En los Anexos se describen algunos aspectos relacionados con el comportamiento ambiental de estos compuestos. Con estos experimentos se pretendió conocer si las pruebas anóxicas proporcionan información diferente a la que proporcionan las pruebas aerobias. Todas las pruebas anóxicas se inocularon con extractos de muestras sedimentarias.

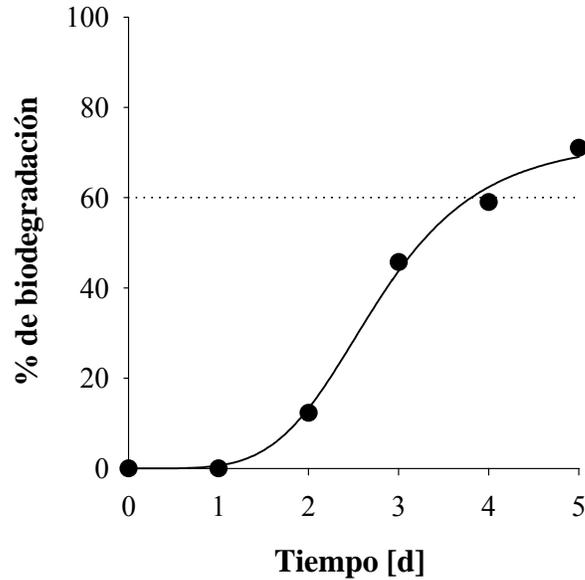
### **6.4.1 Anilina**

Los resultados de la prueba se muestran en la Figura 6.7. En ésta, se puede observar que la anilina también es fácilmente biodegradable en anoxia, ya que alcanza un nivel de biodegradación de 66.7% al cabo de sólo 10 días, con un  $t_L$  de 0.90 d y un  $t_{1/2}$  de 6.33 d. Estos parámetros se obtuvieron por ajuste de la Ecuación 6.3 a los datos experimentales. En diversas pruebas de biodegradabilidad aerobia, la anilina puede ser utilizada como molécula de referencia positiva, al igual que la glucosa o el acetato de sodio (Painter, 1995). Los resultados de este experimento muestran que, en condiciones desnitrificantes, la anilina también podría considerarse como molécula de referencia, puesto que se biodegrada rápidamente.



**Figura 6.7** Cinética de biodegradación anóxica de anilina con extracto de sedimento como inóculo

En pruebas de biodegradabilidad aerobias efectuadas según el método detallado en la sección 5.4.2, la anilina se degradó en un 71% al cabo de 5 días, para una relación de inoculación de 1% v/v con suspensión de Polyseed<sup>®</sup>. La cinética obtenida se muestra en la Figura 6.8, la cual se ajustó a un modelo cinético con la forma de la Ecuación 6.3. Según el modelo, los tiempos de latencia y de vida media equivalen a 1.85 y 3.24 d, respectivamente. La semejanza de estos valores con los que se obtienen en la prueba anóxica confirman que la anilina puede ser considerada una molécula de referencia positiva también en esta última.



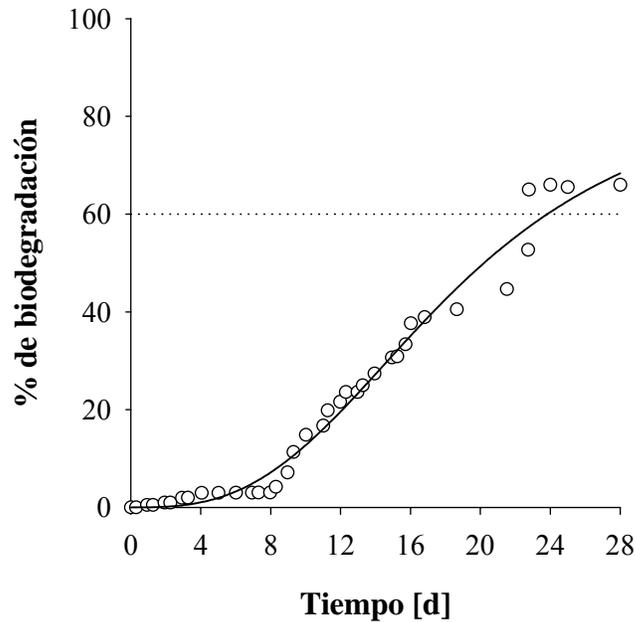
**Figura 6.8** Cinética de biodegradación aerobia de anilina con suspensión de Polyseed<sup>®</sup> a 1% v/v como inóculo

#### 6.4.2 Fenol

El fenol, por ser un compuesto de amplio uso industrial, se eligió como molécula xenobiótica de estudio. Debido a que es una molécula que puede cuantificarse de modo específico con facilidad, también se monitoreó su concentración durante el ensayo de biodegradabilidad de acuerdo al método descrito en la sección 5.7.1. En este caso lo que se mide es la *biodegradación primaria*, la cual se define como la pérdida de la identidad química del compuesto de prueba, sin que esto conduzca forzosamente a su mineralización en CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O (Vázquez-Rodríguez y Beltrán-Hernández, 2004).

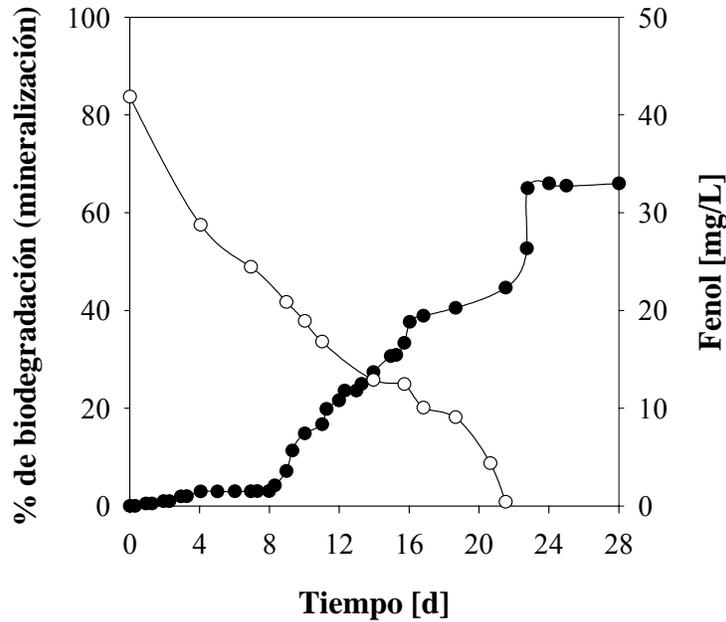
En la Figura 6.9 se presentan los resultados de la prueba de biodegradabilidad anóxica. Según se muestra, el fenol es menos fácilmente biodegradable que la anilina en condiciones desnitrificantes, puesto que en 28 días apenas se alcanzó el nivel mínimo de biodegradación que se consideró de referencia (60%). De hecho, este porcentaje de biodegradación se rebasó hasta el día 22 de la prueba.

Los datos de producción de  $\text{CO}_2$  se ajustaron a un modelo logístico con tres parámetros (Ecuación 6.3), con el cual se estimó el  $t_L$  en 9.08 d, y el  $t_{1/2}$  en 20.23 d.



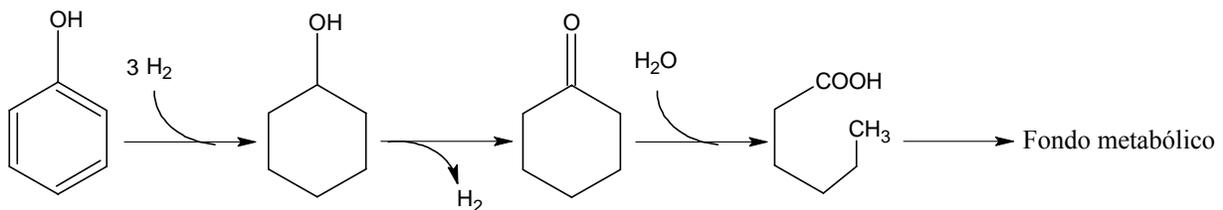
**Figura 6.9** Cinética de biodegradación anóxica de fenol con extracto de sedimento como inóculo

En la Figura 6.10 se muestran tanto la evolución del  $\text{CO}_2$  producido (mineralización) como la de la concentración de fenol (biodegradación primaria). Si se analizan conjuntamente ambas curvas, pueden identificarse tres etapas que se sucedieron durante el ensayo. En la primera, que se presentó desde la inoculación hasta aproximadamente el día 8, hay desaparición de fenol pero escasa mineralización, lo que pone en evidencia que el fenol se transformó principalmente en un metabolito intermediario. En la segunda etapa, que puede detectarse hasta el día 22, podemos asumir que el resto del fenol se transforma, pero también que el metabolito se mineraliza, o al menos lo hace parcialmente, lo que explica la mayor cantidad de  $\text{CO}_2$  producido. Sin embargo, al final del ensayo una parte de ese metabolito u otro persiste, ya que no se produce más  $\text{CO}_2$ . Así, es posible que en un medio sedimentario, en el que no existe oxígeno disuelto pero sí nitratos, el fenol sólo se biodegrade parcialmente en sus intermediarios metabólicos, y que estos persistan en un cierto grado.



**Figura 6.10** Biodegradación anóxica de fenol con extracto de sedimento como inóculo. Seguimiento de (●) la producción de CO<sub>2</sub> (mineralización) y (○) el consumo de fenol

Evans y Fuchs (1988) reportan que un cultivo enriquecido principalmente en *Pseudomonas* sp. y *Spirillum* sp. degradó fenol en condiciones anóxicas y en presencia de nitratos. El fenol se convirtió en CO<sub>2</sub> y material celular; no obstante, se detectaron metabolitos en el medio de cultivo, tales como *n*-caproato y acetato, a lo cual se corresponden los resultados de la prueba anóxica de biodegradabilidad. Según estos autores, el fenol se transformó primero en ciclohexanol, el cual se deshidrogenó luego a ciclohexanona; la fisión hidrolítica del anillo produjo entonces *n*-caproato. En la Figura 6.11 se muestra la secuencia de reacciones antes mencionada.

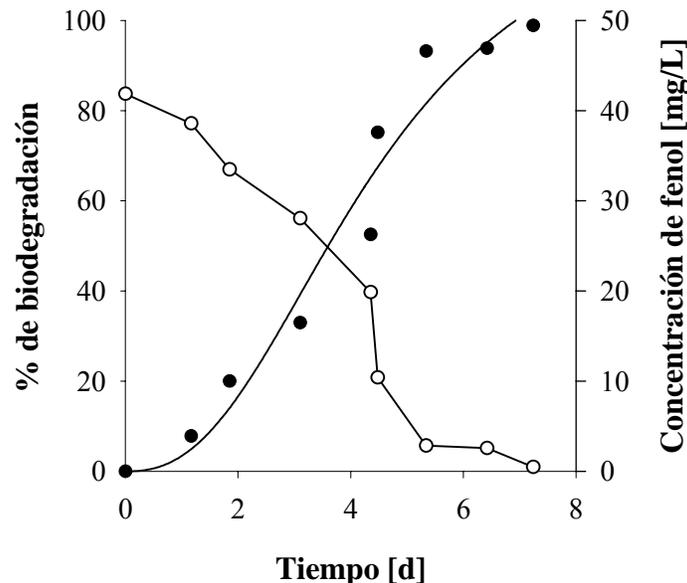


**Figura 6.11** Ruta metabólica de biodegradación anóxica de fenol (Evans y Fuchs, 1988)

Así mismo, para una gran variedad de xenobióticos, en condiciones anóxicas pueden presentarse rutas de biodegradación diferentes a las que ocurren en aerobiosis. Igualmente, es posible que haya compuestos que no presenten biodegradación significativa en medios aerobios y que en anoxia sí puedan ser degradados.

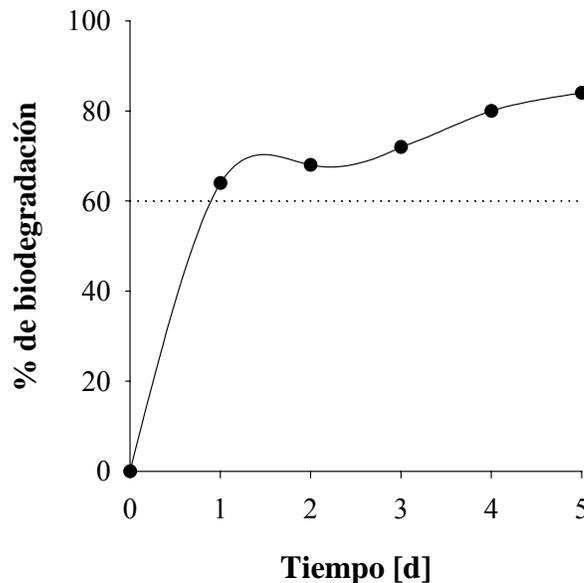
Para conocer mejor la biodegradabilidad de fenol, se realizaron dos pruebas aerobias según los métodos OCDE 301 A (§ 5.4.1) y 301 F (§ 5.4.2), utilizando extracto de sedimento y suspensión de Polyseed® como inóculo, respectivamente. Los resultados de ambas pruebas mostraron que el fenol es más fácilmente biodegradable en aerobiosis que en condiciones de desnitrificación.

En la Figura 6.12 se puede observar la cinética de consumo de fenol obtenida con la prueba OCDE 301 A, en la que el nivel mínimo de biodegradación (60%) se alcanzó al cabo de 4 d. Luego de 7.7 d de iniciada la prueba, se alcanzó un 99% como nivel final de biodegradación. El ajuste de los datos a un modelo cinético con la forma de la Ecuación 6.3 permitió estimar los tiempos de latencia y de vida media en 1.6 y 3.6 d, respectivamente.



**Figura 6.12** (●) % de biodegradación y (○) consumo de fenol en la prueba aerobia OCDE 301 A con extracto de sedimento como inóculo.

Para comparar la biodegradabilidad aerobia del fenol con respecto a la de la anilina en la misma prueba (OCDE 301 F), se realizó un ensayo respirométrico según el método descrito en la sección 5.4.2 y utilizando la suspensión de Polyseed® como inóculo. La cinética obtenida se muestra en la Figura 6.13. En la prueba respirométrica se obtuvo una cinética más rápida que en la prueba 301 A, puesto que el 60% de biodegradación se alcanzó luego de sólo 1 d. La Ecuación 6.3 no pudo ajustarse a los datos experimentales; sin embargo, tanto el  $t_L$  como el  $t_{1/2}$  son inferiores a 1 d.



**Figura 6.13** Cinética de biodegradación de fenol en la prueba aerobia 301 F con suspensión de Polyseed® a 1% v/v como inóculo

Varios autores han reportado, para un mismo compuesto, diferencias en las cinéticas obtenidas en distintas pruebas de biodegradabilidad. Por ejemplo, Reuschenbach *et al.* (2003) encontraron que la anilina se biodegrada más rápidamente en la prueba 301 A que en la prueba 301 F y más aún que en la 301 B. Los autores atribuyen estas discrepancias a que las pruebas respirométricas presentan limitaciones de transferencia de masa. En el caso del fenol, podemos atribuir la rapidez de la prueba respirométrica OCDE 301 F a la concentración inicial empleada (equivalente a 21 mg/l), que es inferior a la utilizada en la prueba 301 A (42 mg/l). El fenol es

una molécula biodegradable pero tóxica a elevadas concentraciones, debido a lo cual pudo presentarse una cierta inhibición de la actividad microbiana en el ensayo 301 A.

---

---

# CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

---

---

### 7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En esta investigación, de acuerdo a los objetivos planteados, se logró diseñar un procedimiento de evaluación de la biodegradabilidad anóxica de compuestos orgánicos en medio líquido, utilizando iones nitrato como aceptor de electrones.

A partir de la caracterización fisicoquímica efectuada, se demostró que en los sedimentos estudiados se encuentran presentes iones nitrato. En caso de ausencia de oxígeno, estos pueden ser utilizados en procesos desnitrificantes, ya que constituyen los aceptores externos preferenciales de electrones. Por lo tanto, se mostró la relevancia ambiental de la prueba de biodegradabilidad diseñada, al menos en lo que respecta al lago de Tecocomulco, Hgo. Esta situación puede extrapolarse a otras regiones que, como la mencionada, están rodeadas de zonas de explotación agrícola.

En este trabajo, se validó un dispositivo experimental para la medición de la biodegradabilidad anóxica de moléculas orgánicas. Este material es confiable y permite que se estudie la mineralización de la sustancia de prueba; así mismo, su manejo es muy sencillo y fácil de controlar. Pudimos establecer que los extractos de sedimentos lacustres constituyen un inóculo adecuado para esta prueba de biodegradabilidad, que además simula a un cierto grado un ecosistema que hasta el momento ha sido poco considerado por la normatividad.

Una serie de experimentos demostró que las moléculas de glucosa y anilina son convenientes como referencia positiva, tanto para realizar pruebas de biodegradabilidad aerobias como anóxicas.

En lo que respecta a la evaluación de la biodegradabilidad anóxica de compuestos xenobióticos, se realizaron diferentes ensayos con fenol. En ellos se pudo observar que su comportamiento ambiental difiere de acuerdo a las condiciones a las que es sometido. Así, en medios aerobios, el fenol es fácilmente biodegradable, mientras que en condiciones

desnitrificantes se dificulta su biodegradación y es posible que se acumulen metabolitos intermediarios. Sin embargo, estos resultados confirman que la prueba anóxica proporciona información acerca del comportamiento de las sustancias químicas cuyo destino final es el ecosistema sedimentario, adicional a la proporcionada por las pruebas de biodegradabilidad aerobia.

Una de las ventajas que aporta este método, con respecto a las pruebas normalizadas de la OCDE, es que la biodegradabilidad de las moléculas ocurre por desnitrificación, el cual es el proceso anaerobio mediante el cual los microorganismos adquieren mayor energía para su metabolismo. Las pruebas anaerobias normalizadas hasta la fecha contemplan procesos metanogénicos, que no forzosamente reflejan lo que sucede en un ecosistema como el sedimentario, en el que muy posiblemente existen diversos aceptores externos de electrones.

La prueba de biodegradabilidad que aquí se propone requiere concentraciones más altas del compuesto de prueba, en relación a lo establecido en las pruebas estandarizadas (OCDE 308 y 309, e ISO 14592). Bajo estas condiciones no se reproduce de modo exacto un ambiente natural, en el que los contaminantes suelen estar presentes a bajas concentraciones, lo cual requeriría el monitoreo de la sustancia de prueba marcada con  $^{14}\text{C}$ . Las pruebas ISO y OCDE utilizan este tipo de técnicas, lo cual a su vez eleva el costo y la complejidad de sus procedimientos.

Como perspectiva de esta investigación, pensamos que es conveniente realizar diferentes pruebas anóxicas con más moléculas xenobióticas de interés ambiental, a diferentes concentraciones, para de esta manera conocer mejor el alcance de la prueba de biodegradabilidad propuesta.

---

---

# REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

---

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexander M. (1981) Biodegradation of chemicals of environmental concern. *Science* 211(4478): 132-137.
- Anderson R.T. y Lovley R.D. (2000) Hexadecane decay by methanogenesis. *Nature* 404: 722-723.
- ATSDR (1998) Toxicological profile for phenol. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, pp. 127–133.
- Bonnet C. (2000) Développement de bioessais sur sédiments et applications à l'étude en laboratoire de la toxicité de sédiments dulçaquicoles contaminés. Tesis de doctorado, Université de Metz, Francia.
- Brock (1999) Biodegradación de compuestos xenobióticos. En: Biología de los microorganismos, Ed. Prentice Hall, Madrid, pp. 584-585.
- Calmon A., Dusserre-Bresson L., Bellon-Maurel V., Feuilloley P. y Silvestre F. (2000) An automated test for measuring polymer biodegradation. *Chemosphere* 41: 645-651.
- Camargo T. (2000) Inventario de aguas superficiales del Estado de Hidalgo. Universidad del Estado de Hidalgo, México, pp. 40-41.
- Campy M. y Meybeck M. (1995) Les sédiments lacustres. En: Limnologie générale (Pourriot R. y Meybeck M., Eds.), Masson, París, pp. 185-226.
- ECN (2002) Determination of the ultimate aerobic biodegradability of packaging materials in an aqueous medium - Method by analysis of evolved carbon dioxide. EN/4047:2002, Directive 94/62/EC, European Committee of Normalization.
- EPA (1994) Aniline Fact Sheet: Support Document. Environmental Protection Agency, E.U.A. Disponible en: <http://www.epa.gov/chemfact/>
- Esteves F.A., Enrich-Prast A. y Biesboer D.D. (2001) Potential denitrification in submerged. natural and impacted sediments of Lake Batata, an Amazonian lake. *Hydrobiologia* 444: 111–117.

- Evans C. y Fuchs G. (1988) Anaerobic degradation of aromatic compounds. *Annual Review of Microbiology* 42: 289-317.
- Fung D.Y.C., Donahue R., Jensen J.P., Ullmann W.W., Hausler W.J. y Lagrange W.S. (1976) A collaborative study of the microtiter count method and standard plate count method for viable cell count of raw milk. *Journal of Milk and Food Technology* 39: 24-26.
- Hagblom M.M., Knight V.K. y Kerkhof L.J. (1999) Anaerobic decomposition of halogenated aromatic compounds. *Environmental Pollution* 107: 199-207.
- Howe G.E., Parking L.L. y Bills T.D. (1994) Effects of water temperature and pH on toxicity of terbufos, trichlorfon, 4-nitrophenol and 2,4-dinitrophenol to the amphipod *Gammarus pseudolimnareus* and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 13: 51-66.
- Huizar-Álvarez R., Campos-Enríquez O., Mitre-Salazar L.M., Alatríste-Vilchis D., Méndez-García T. y Juárez-Sánchez F. (2001) Evaluación hidrogeológica de la subcuenca de Tecocomulco, Estados de Puebla, Tlaxcala. México. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas* 18(1): 55-73.
- INE (2002) NOM-021-RECNAT-2000. Norma Oficial Mexicana que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudios, muestreo y análisis. Instituto Nacional de Ecología, México.
- ISO (2002) Water quality. Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations. Part 1: Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions. Draft International Standard ISO/DIS 14592 part 1. Organización Internacional de Normalización, Ginebra, Suiza.
- Kalsch W., Knacker T., Danneberg G., Studinger G. y Franke C. (1999) Biodegradation of [<sup>14</sup>C]-4-nitrophenol in a sediment-water simulation test. *International Biodeterioration and Biodegradation* 44: 65-74.
- Kool H.J. (1984) Influence of microbial biomass on the biodegradability of organic compounds. *Chemosphere* 13(7): 751-761.
- Kukkonen J. y Landrum P.F. (1996) Distribution of organic carbon and organic xenobiotics among different particle-size fractions in sediments. *Chemosphere* 32: 1063-1076.

- Lacorte S. y Barceló D. (1995) Determination of organophosphorous pesticides and their transformation products in river waters by automated on-line solid-phase extraction followed by thermospray liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography* 712: 103–112.
- Larson R.J., Hansmann M.A. y Bookland E.A. (1996) Carbon dioxide recovery in ready biodegradation tests: Mass transfer and kinetic considerations. *Chemosphere* 333(6): 1195-1210.
- Lovley D.R. (2001) Anaerobes to the rescue. *Science* 293: 1444-1446.
- Madsen T., Rasmussen H.B. y Nilsson L. (1995) Aerobic biodegradation potential in digested sludge, a freshwater swamp and a marine sediment. *Chemosphere* 31(10): 4243-4258.
- Manahan S.E. (1994) Phase interactions. En: Environmental Chemistry, 6a Edición, Lewis Publishers, Boca Raton, E.U.A., pp. 111-135.
- Nyholm N. (1991) The European system of standardized legal tests for assessing the biodegradability of chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry* 10: 1237-1246.
- OCDE (1992) *Guidelines for the testing of chemicals*. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París, Francia.
- OCDE (2001a) *Proposal for a New Guideline 302 D. Inherent Biodegradability – CONCAWE Test*. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París, Francia.
- OCDE (2002) *Guideline 308. Aerobic and anaerobic transformation in aquatic sediment systems*. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París, Francia.
- OCDE (2004) *Guideline 309. Aerobic Mineralisation in Surface Water – Simulation Biodegradation Test*. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París, Francia.
- Painter H.A. (1995) Detailed review paper on biodegradability testing. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París, Francia.
- Power E.A. y Chapman P.M. (1992) Assessing sediment quality. En: Sediment toxicity assessment (Burton G.A.J., Ed.), Lewis, Chelsea, E.U.A., pp. 1-18.
- Reuschenbach P., Pagga U. y Strotmann U. (2003) A critical comparison of respirometric biodegradation tests based on OECD 301 and related methods. *Water Research* 37: 1571-1582.

- Rodríguez M. (2003) Fenton and UV-vis based advanced oxidation processes in wastewater treatment: Degradation, mineralization and biodegradability enhancement. Tesis doctoral, Universitat de Barcelona, España.  
 Disponible en: [http://www.tdx.cesca.es/TESIS\\_UB/AVAILABLE/TDX-0718103-115659/TOL208.pdf](http://www.tdx.cesca.es/TESIS_UB/AVAILABLE/TDX-0718103-115659/TOL208.pdf).
- Schwedt G. (1996) The nitrogen cycle. En: The essential guide to environmental chemistry, Wiley, Sussex, Reino Unido, pp. 10-12.
- Struijs J., Stoltenkamp-Wouterse M.J. y Dekkers A.L.M. (1997) A rationale for the appropriate amount of inoculum in ready biodegradability tests. *Biodegradation* 6: 319-327.
- Tabka H., Seigneux C., Adler N., Pulgarin C. y Péringer P. (1993) Inoculum standardization for biodegradability tests. *Biotechnology Letters* 7(3): 217-222.
- Van Ginkel C.G., Haan A., Luijten M.L.G.C. y Stroo C.A. (1995) Influence of the size and source of the inoculum on biodegradation curves in closed-bottle tests. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 31: 218-223.
- Vázquez-Rodríguez G.A. y Beltrán-Hernández R.I. (2004) Pruebas normalizadas para la evaluación de la biodegradabilidad de sustancias químicas. Una revisión. *Interciencia* 29(10): 568-572.
- Vázquez-Rodríguez G., Palluy F., Goma G. y Rols J.-L. (1999) Procedures in ready biodegradability testing: effects of the inoculation and the monitored parameter. *Environmental Technology* 20: 301-308.
- Vázquez-Rodríguez G., Goma G. y Rols, J.-L. (2003) Activated sludge as inoculum for ready biodegradability testing: effects of source. *Environmental Technology* 24: 979-987.
- WHO (1994) Phenol Environmental Health Criteria 161. World Health Organization.  
 Disponible en: <http://www.inchem.org/>
- Woolard C.R. e Irvine R.L. (1995) Treatment of hypersaline wastewater in the SBR. *Water Research* 29(4): 1159-1168.
- Yúfera E.P. y Carrasco J.M.D. (1973) Química agrícola. Alhambra, Madrid, pp. 301-305.
- Zhang C. y Bonnet G.N. (2005) Biodegradation of xenobiotics by anaerobic bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67(5): 600-618.

---

---

# ANEXOS

---

---

## 9. ANEXOS

### A. ANILINA

#### A.1 PRODUCCIÓN

La anilina, también llamada aminobenceno, es un líquido aceitoso e inflamable, que se puede encontrar naturalmente en algunos alimentos. Es producido en cantidades muy grandes (mil millones de libras en 1992) por siete compañías en los Estados Unidos y es probable que en los próximos años la demanda aumente del 3 al 4% (EPA, 1994).

#### A.2 USOS

Los usuarios más grandes de la anilina son compañías que elaboran isocianatos; otros usos de la anilina incluyen la producción del caucho, la fabricación de intermediarios para la síntesis de pesticidas, especialmente herbicidas y fungicidas. La anilina también se utiliza para producir medicamentos, resinas, barnices, perfumes, tintes, pigmentos, productos químicos fotográficos (hidroquinona), explosivos, y compuestos fenólicos (EPA, 1994).

#### A.3 DESCARGAS AL MEDIO AMBIENTE

La anilina es descargada al ambiente por usos industriales; se le ha detectado pero no cuantificado en el agua subterránea. Se ha medido en un máximo de 36 ppb en un acuífero cerca del sitio subterráneo de la gasificación del carbón en Wyoming, Estados Unidos. La anilina se ha encontrado en aguas residuales de industrias, así como en vertederos (EPA, 1994).

#### A.4 TRANSPORTE

La anilina en solución se fija fuertemente por adsorción a la materia orgánica coloidal, la cual aumenta con eficacia su solubilidad y transporte en el agua subterránea. También se fija por adsorción moderada al material orgánico del suelo; su adsorción es dependiente del pH (pKa

de 4.596). Se volatiliza lentamente del suelo y del agua superficial, pero está sujeta a biodegradación. Aunque ésta se degrada rápidamente en la atmósfera, la anilina se puede depositar en suelo por la deposición húmeda y seca, y por adsorción en partículas de aerosol (EPA, 1994).

#### **A.5 TRANSFORMACIÓN/PERSISTENCIA**

La anilina experimenta fotólisis directa y tiene absorción considerable a longitudes de onda de alrededor 290 nm. En la atmósfera, los fotoproductos formados a partir de la anilina incluyen N-metilanilina, N,N-dimetilanilina, hidroxianilinas isoméricas y fenoles. En el suelo, los microorganismos pueden utilizar la anilina como fuente de carbono y nitrógeno. Esta sustancia está ligada a los materiales húmicos del suelo. Al parecer, los productos de la oxidación incluyen el azobenceno, azoxibenceno, fenazina, formanilida y acetanilida. Un pH reducido aumenta la remoción de anilina por adsorción; sin embargo, la adsorción a las partículas coloidales puede ampliar su persistencia en el ambiente acuático. No se espera que la anilina se acumule perceptiblemente en organismos acuáticos; no obstante, es absorbida y metabolizada por los peces (EPA, 1994).

## **B. FENOL**

### **B.1 PRODUCCIÓN**

El fenol fue aislado por primera vez en 1834 a partir del alquitrán de carbón, el cual constituyó la principal fuente explotada de este compuesto hasta la primera guerra mundial; posteriormente, la producción se llevó a cabo mediante síntesis química y la utilización de catalizadores. El fenol se produce también de manera natural, pues se encuentra en la lignina, y como resultado de la descomposición de materia orgánica o de la degradación de pesticidas clorofenoxicarboxílicos y organofosforados (Lacorte y Barceló, 1995).

### **B.2 USOS**

El fenol es un producto químico ampliamente usado en la producción de bisfenol-A, que es un intermediario en la producción de resinas epóxicas y fenólicas, la cual ocupa el 70% del fenol producido. Otros usos, con aproximadamente el 25% del total de la producción de fenol, son la síntesis de caprolactamas, anilina, alquilfenoles y xilenoles. Alrededor de 1% de la producción se destina a otros usos, tales como agente desinfectante y la preparación de medicinas (ungüentos, gotas para oídos y nariz, lociones antisépticas, entre otros; ATSDR, 1998).

### **B.3 DESCARGAS AL MEDIO AMBIENTE**

El fenol es liberado al ambiente como resultado de su manufactura y uso, de la quema de madera, tanto intencional como accidental (incendios forestales), así como de la degradación natural de materia orgánica y algunos insecticidas. De forma antropogénica, los compuestos fenólicos son generados por plantas de carbón, refinerías e industrias que procesan resinas, plásticos, tintas, colorantes, industrias farmacéuticas, entre otras. Debido a su amplio uso, el

fenol es considerado un contaminante común de las aguas residuales domésticas, industriales y agrícolas (ATSDR, 1998).

#### **B.4 TRANSPORTE**

El fenol es liberado al medio ambiente, regularmente en fase gaseosa, lavado por la lluvia y llevado vía deposición húmeda y lixiviación a través del suelo. La evaporación tiende a ser lenta en el agua. Aunque el fenol no es muy persistente en aire, agua superficial u oceánica e incluso en suelos, reacciona fotoquímicamente, teniendo un tiempo de vida media de algunas horas; en cambio, su degradación por vía biológica es de aproximadamente 2 días (WHO, 1994).

La alta solubilidad del fenol hace que los vapores liberados hacia la atmósfera sean atrapados por la lluvia, ocasionando el transporte de fenol desde zonas industriales hacia el campo, ríos y mares (Rodríguez, 2003). Debido a que el pKa del fenol es 9.68, éste se encontrará en mayor proporción disociado en medios acuáticos naturales, por lo que su transporte hacia otras esferas ambientales dependerá del pH del medio (ATSDR, 1998).

#### **B.5 TRANSFORMACIÓN/PERSISTENCIA**

El fenol es biodegradable en aguas naturales siempre y cuando su concentración no sea muy alta y provoque inhibición en los microorganismos responsables de su descomposición; así mismo, ésta se ve afectada cuando la concentración de compuestos orgánicos e inorgánicos es alta (WHO, 1994). El fenol puede ser convertido por bacterias, bajo condiciones aerobias, en CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O, mientras que en condiciones anaerobias puede transformarse en CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub>. El catecol, *cis-cis* muconato, β-cetoadipato, succinato y acetato son algunos de los intermediarios en la biodegradación del fenol (Rodríguez, 2003).

## C. EL CICLO DEL NITRÓGENO

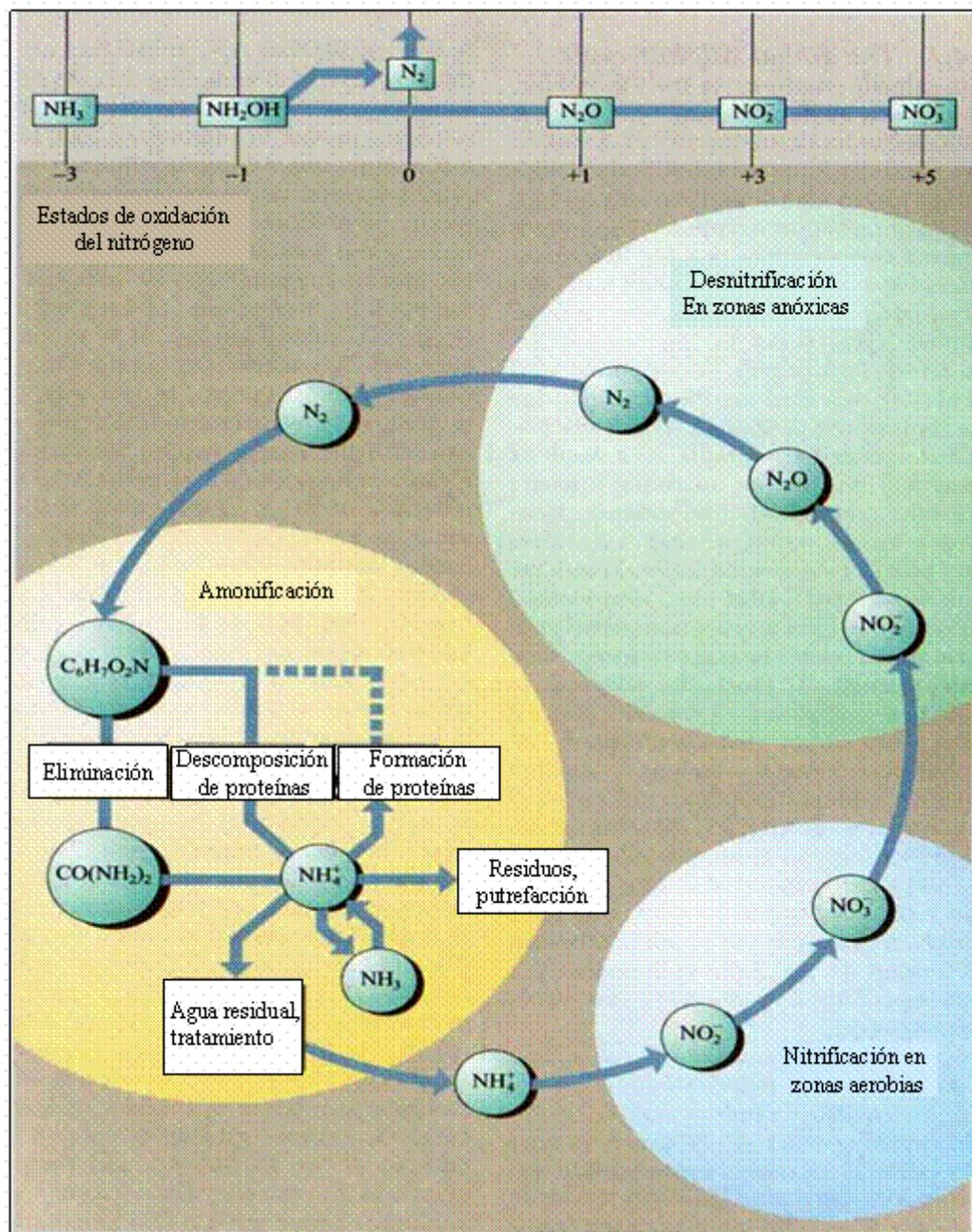
Aproximadamente el 80% de la atmósfera está constituida por nitrógeno elemental. Otras especies nitrogenadas son compuestos orgánicos tales como aminoácidos, proteínas, amidas y urea. Entre las especies inorgánicas se encuentran  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  y óxidos de nitrógeno como  $\text{N}_2\text{O}$ ,  $\text{NO}_2$  y  $\text{NO}$ ; estas dos últimas juegan un papel importante en la química atmosférica del nitrógeno (Schwedt, 1996).

El ciclo biológico del nitrógeno está limitado por su *fijación*, mediante la cual el  $\text{N}_2$  atmosférico entra a la hidrosfera, al suelo y especialmente a la biosfera. La fijación biológica es llevada a cabo por microorganismos y algas verde-azules y en simbiosis de microorganismos con plantas superiores. Las proteínas pueden formarse a partir de diversas formas inorgánicas de nitrógeno, en particular de  $\text{NH}_4^+$ , durante el proceso de *asimilación*. En el proceso contrario, la *amonificación*, los compuestos de nitrógeno orgánico pueden convertirse en  $\text{NH}_4^+$  gracias a la acción de bacterias desaminadoras (i.e., *Pseudomonas*). Estos microorganismos, que no pueden usar la luz como fuente de energía, obtienen así la energía necesaria para su metabolismo; vía oxidación, los aminoácidos son convertidos a  $\text{CO}_2$ , agua,  $\text{NH}_4^+$  y energía; vía nitrificación (i.e., *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*), el amoníaco es convertido a nitratos y posteriormente a nitritos. El  $\text{N}_2\text{O}$  y  $\text{N}_2$  son formados por desnitrificación y luego liberados a la atmósfera (Schwedt, 1996).

### C.1 AMONIFICACIÓN, NITRIFICACIÓN Y DESNITRIFICACIÓN

El aumento en la concentración de nitrógeno en aguas superficiales puede ser atribuido a ciertos compuestos de nitrógeno con números de oxidación comprendidos entre -3 y +5. En primer lugar la urea, que es un componente de los fertilizantes y se deriva esencialmente del metabolismo de ciertos animales. Por otra parte, las sales de amonio y el amoníaco proceden de la fertilización, de la putrefacción de la materia orgánica animal y vegetal, de cadenas tróficas y de aguas residuales. Finalmente, los nitratos son componentes de los fertilizantes y un producto final de especies de nitrógeno con bajos números de oxidación. Los procesos del ciclo microbiano del nitrógeno incluyen reacciones ácido-base y redox,

además de mecanismos de reacción que conducen a la formación o a la ruptura de enlaces C-N (Schwedt, 1996). En la Figura C.1 se representa gráficamente el ciclo del nitrógeno.



**Figura C.1** Ciclo del nitrógeno (Schwedt, 1996)

En la amonificación, el  $\text{N}_2$  es incorporado a moléculas orgánicas tales como proteínas. Debido a diversos procesos microbianos, las proteínas y aminoácidos son convertidos a

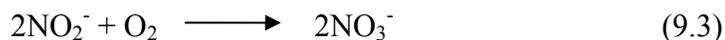
productos de excreción (i.e., urea y amoniaco). El amoniaco puede regresar al ciclo para la formación de proteínas, de acuerdo con la Reacción 9.1.



La hidrólisis de la urea es catalizada por la enzima ureasa, y conduce al amoniaco o al ion amonio, dependiendo de las condiciones de pH. En el ambiente, las sales de amonio pueden pasar al agua o al suelo. En zonas aerobias, la nitrificación lleva a cabo la oxidación microbiana de iones amonio a nitrito y posteriormente a nitrato. Los microorganismos del género *Nitrosomonas* oxidan el ion amonio a nitrito, según la Reacción 9.2.



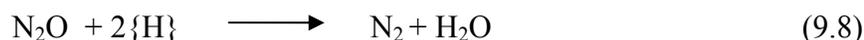
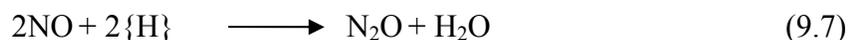
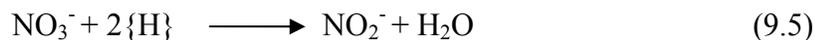
En segunda instancia, las bacterias del género *Nitrobacter* oxidan el nitrito a nitrato (Reacción 9.3).



La ecuación global del proceso de nitrificación se presenta en la reacción 9.4.



La *desnitrificación*, o reducción del nitrato a nitrógeno atmosférico, ocurre en zonas anóxicas gracias al metabolismo de numerosos microorganismos anaerobios facultativos y heterotróficos. Ellos usan el nitrato como aceptor de electrones para la oxidación de materia orgánica.



El producto final de la desnitrificación es el nitrógeno; entre los intermediarios que pueden terminar en el ambiente si hay insuficiencia de donadores de H se encuentran el NO y el N<sub>2</sub>O. Éste último también entra a la atmósfera proveniente de fuentes antropogénicas.