



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Departamento de Ingeniería Química

**BIODEGRADACIÓN ANAEROBIA DE  
COMPUESTOS TÓXICOS EN AGUAS  
RESIDUALES INDUSTRIALES**

Memoria presentada por :

**Diego Méndez Paz**

*para optar al grado de Doctor por la  
Universidad de Santiago de Compostela*

*Santiago de Compostela, Febrero de 2002*





UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Departamento de Ingeniería Química

**BIODEGRADACIÓN ANAEROBIA DE  
COMPUESTOS TÓXICOS EN AGUAS  
RESIDUALES INDUSTRIALES**

Memoria presentada por :

**Diego Méndez Paz**

*para optar al grado de Doctor por la  
Universidad de Santiago de Compostela*

*Santiago de Compostela, febrero de 2002*





## UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

### Departamento de Ingeniería Química

**Juan Manuel Lema Rodicio**, Catedrático de Ingeniería Química y **Francisco Omil Prieto**, Profesor Titular de Ingeniería Química, de la Universidad de Santiago de Compostela,

Informan:

Que esta memoria titulada “Biodegradación anaerobia de compuestos tóxicos en aguas residuales industriales”, que presenta **Diego Méndez Paz** para optar al grado de Doctor, se realizó bajo nuestra dirección en el Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Santiago de Compostela.

Y para que así conste, expiden el siguiente informe en Santiago de Compostela a 27 de febrero de 2002.

Juan Manuel Lema Rodicio

Francisco Omil Prieto



## Agradecimientos

A Juan Lema por su dirección de este trabajo, su apoyo y sus expertos consejos y opiniones. A Francisco Omil, también por su dirección, su apoyo y por la ayuda prestada en numerosas ocasiones.

A Quique por sus consejos y favores. A Beni y Juan Garrido por la alegría que transmiten. A los antiguos integrantes del Laboratorio de Aguas, Anuska, Ana Puñal, Marivel y José Luis, por ayudarme en los comienzos y por el buen ambiente que siempre reinaba en el laboratorio del sótano (a pesar de mi lucha por sobrevivir a la salsa y la pachanga con la que me masacraban) y en el laboratorio del IIT.

A todos los que se han ido incorporado a este laboratorio y han contribuido al buen ambiente de trabajo y al mal olor, Andrés, Bastian, Felipe, Belén (con su lenguaje tan cómico), Julio, Amaya, Elena Maneiro, Paolo, Giani, Robert, Antonio, Ana Fernández, Héctor, Gonzalo, Carola, Isabela, Marta, Almudena, Elena, Sandra y alguno más que seguro que se me olvida. Y a José Manuel, que aunque está poco por aquí, cuando está se hace notar.

A Julio y Amaya por su amistad y por los buenos momentos que hacen más llevadero el trabajo. A Bastian, que generosamente nos regaló su radiocasette para que todos los días suene la música en el laboratorio y por los buenos ratos pasados en el laboratorio (especialmente cuando poníamos su cinta de Led Zeppelin y tras subir excesivamente el volumen cuando llegaba "Rock & Roll" entraba Juan en el laboratorio con alguna visita).

A los integrantes del Laboratorio de Fermentación, a Ángeles, a Juani y Ana Torrado por su ayuda con el Biostat Q, a Iñaki por el conocimiento compartido en

nuestra lucha, con distintas armas, contra los tintes, y a Gerardo, que se fue demasiado pronto.

A Mar, gracias a quien los equipos analíticos estaban siempre a punto y funcionando a todo tren. A Luisa y Cristina, que también colaboraron y ayudaron en los análisis de laboratorio. A Marga por su ayuda con el Microtox y con otras muchas cosas. A todas ellas y a Pili por su amistad y por tenernos al tanto de los cotilleos.

A Priscila por su ayuda con el respirómetro y a Vinka. A Jaime por su ayuda con los reactores. A Rosa, que siempre nos echa una mano en lo que puede.

A Carlos Hernández por aconsejarme la incorporación a este grupo de investigación y por su preocupación diaria por mi salud, algún día le haré caso y dejaré de fumar.

A Jano, Jose, Juan, Johnny, Ferro, Iñaki y al resto de amigos porque aunque cada vez nos vemos menos, cuando la hacemos la diversión está siempre asegurada, y por estar ahí siempre que los necesité.

A Noelia, por estar a mi lado todos estos años y hacer todo más fácil.

A mis padres, gracias a quienes he llegado hasta aquí, y a mis hermanos.



# Índice

<b>Objetivos</b>	O-1
<b>Capítulo 1. Introducción</b>	
1.1. Nuevas perspectivas en la gestión de efluentes industriales	1-1
1.1.1. <i>Procesos de tratamiento</i>	1-3
1.1.2. <i>Los procesos de tratamiento anaerobio: una tecnología limpia</i>	1-4
1.1.3. <i>Fenómenos de inhibición o toxicidad</i>	1-10
1.1.4. <i>Presencia de formaldehído y tintes en aguas industriales</i>	1-12
1.2. Formaldehído	1-13
1.2.1. <i>Generalidades</i>	1-13
1.2.2. <i>Propiedades físicas y químicas</i>	1-13
1.2.3. <i>Metabolismo intermediario</i>	1-14
1.2.4. <i>Principales reacciones</i>	1-15
1.2.5. <i>Usos</i>	1-16
1.2.6. <i>Toxicidad</i>	1-17
1.2.7. <i>Presencia en aguas residuales</i>	1-19
1.3. Tintes	1-21
1.3.1. <i>Generalidades y clasificación</i>	1-21
1.3.2. <i>Los tintes azo. Toxicidad sobre humanos y animales</i>	1-26
1.3.3. <i>Aguas residuales coloreadas: generalidades y</i>	

<i>estrategias de tratamiento</i>	1-29
1.4. Referencias	1-44
<b>Capítulo 2. Materiales y Métodos</b>	
2.1. Métodos analíticos	2-1
2.1.1. <i>Fase líquida</i>	2-1
2.1.2. <i>Fase gaseosa</i>	2-4
2.1.3. <i>Fase sólida</i>	2-5
2.2. Ensayos de toxicidad: Microtox	2-5
2.3. Respirimetrías	2-6
2.4. Referencias	2-11
<b>Capítulo 3. Biodegradación de formaldehído bajo condiciones anaerobias</b>	
3.1. Introducción	3-1
3.2. Materiales y métodos	3-3
3.2.1. <i>Biomasa</i>	3-3
3.2.2. <i>Ensayos de actividad</i>	3-3
3.2.3. <i>Ensayos abióticos y de biodegradabilidad</i>	3-5
3.2.4. <i>Ensayos de toxicidad</i>	3-5
3.2.5. <i>Análisis</i>	3-5
3.2.6. <i>Cálculos</i>	3-6
3.3. Resultados	3-10
3.3.1. <i>Caracterización de la biomasa</i>	3-10
3.3.2. <i>Ensayos abióticos y de biodegradabilidad</i>	3-12
3.3.3. <i>Ensayos de toxicidad</i>	3-15

3.4. Discusión	3-22
3.4.1. <i>Caracterización de la biomasa</i>	3-22
3.4.2. <i>Efecto de los cosustratos en la degradación del formaldehído</i>	3-23
3.4.3. <i>Toxicidad del formaldehído en la degradación de los AGV</i>	3-23
3.4.4. <i>Mecanismo de degradación anaerobia del formaldehído</i>	3-26
3.5. Referencias	3-29

#### **Capítulo 4. Tratamiento bacteriano de Poly R-478**

4.1. Introducción	4-1
4.2. Materiales y métodos	4-4
4.2.1. <i>Biomasa y reactivos</i>	4-4
4.2.2. <i>Ensayos en discontinuo en condiciones anaerobias</i>	4-5
4.2.3. <i>Ensayos en continuo en condiciones anaerobias</i>	4-6
4.2.4. <i>Ensayos en discontinuo en condiciones aerobias</i>	4-6
4.2.5. <i>Medida de color</i>	4-12
4.3. Resultados	4-12
4.3.1. <i>Ensayos en discontinuo en condiciones anaerobias</i>	4-12
4.3.2. <i>Ensayos en continuo en condiciones anaerobias</i>	4-15
4.3.3. <i>Ensayos en discontinuo en condiciones aerobias</i>	4-18
4.4. Discusión	4-22
4.4.1. <i>Ensayos en discontinuo en condiciones anaerobias</i>	4-22
4.4.2. <i>Ensayos en continuo en condiciones anaerobias</i>	4-23
4.4.3. <i>Ensayos en discontinuo en condiciones aerobias</i>	4-24

4.5. Referencias	4-25
------------------	------

**Capítulo 5. Biodegradación anaerobia del tinte azo  
*Acid Orange 7* en discontinuo**

5.1. Introducción	5-1
5.2. Materiales y métodos	5-3
5.2.1. <i>Biomasa y reactivos</i>	5-3
5.2.2. <i>Ensayos sin cosustrato</i>	5-4
5.2.3. <i>Ensayos con cosustrato</i>	5-5
5.2.4 <i>Ensayos abióticos</i>	5-5
5.2.5. <i>Cálculos</i>	5-5
5.3. Resultados	5-6
5.3.1. <i>Ensayos abióticos</i>	5-6
5.3.2. <i>Ensayos en ausencia de cosustrato</i>	5-7
5.3.3. <i>Ensayos con presencia de cosustrato</i>	5-10
5.3.4. <i>Toxicidad de AO7</i>	5-18
5.3.5. <i>Metabolitos generados en la reducción del AO7</i>	5-21
5.4. Discusión	5-27
5.4.1. <i>Ensayos abióticos</i>	5-27
5.4.2. <i>Ensayos en ausencia de cosustrato</i>	5-27
5.4.3. <i>Ensayos con presencia de cosustrato</i>	5-28
5.4.4. <i>Toxicidad de AO7</i>	5-36
5.4.5. <i>Metabolitos generados en la reducción del AO7</i>	5-37
5.5. Referencias	5-42

**Capítulo 6. Biodegradación anaerobia del tinte azo  
*Acid Orange 7* en continuo y semicontinuo**

6.1. Introducción	6-1
6.2. Materiales y métodos	6-4
6.2.1. <i>Biomasa</i>	6-4
6.2.2. <i>Ensayos en discontinuo con adiciones sucesivas</i>	6-5
6.2.3. <i>Ensayos en continuo</i>	6-6
6.3. Resultados	6-6
6.3.1. <i>Ensayos en discontinuo con adiciones sucesivas</i>	6-6
6.3.2. <i>Ensayos en continuo</i>	6-11
6.4. Discusión	6-20
6.4.1. <i>Ensayos en discontinuo con adiciones sucesivas</i>	6-20
6.4.2. <i>Ensayos en continuo</i>	6-25
6.5. Referencias	6-28
<b>Conclusiones</b>	C-1
<b>Nomenclatura</b>	N-1



## Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es evaluar la viabilidad del uso de procesos biológicos anaerobios como tecnología aplicable al tratamiento de aguas residuales industriales con presencia de compuestos tóxicos o de difícil biodegradación.

Se han elegido, como ejemplos significativos, el formaldehído, presente en diferentes aguas residuales industriales en proporciones variables, y dos tintes industriales, el Poly R-478, tinte polimérico de estructura compleja, y el *Acid Orange 7*, tinte azo de estructura más sencilla, ambos pertenecientes a dos grandes grupos de colorantes habitualmente empleados en la industria.

La metodología seguida supone la realización de un trabajo en etapas, siendo solamente válidas las conclusiones obtenidas al final del proceso. La primera etapa consiste en la determinación de la biodegradabilidad anaerobia. Para ello se realizan ensayos en discontinuo, aplicando distintas concentraciones iniciales del compuesto, lo que permite establecer su cinética de degradación, empleando el método de las velocidades iniciales, y el conocimiento del rango de concentración recomendable a emplear en los posteriores estudios.

A continuación se aborda el estudio sobre la toxicidad que puedan ejercer estos compuestos sobre la actividad microbiana. Para ello se evalúa el efecto sobre el proceso de metanogénesis, el más sensible a la presencia de tóxicos. Se considera tanto la toxicidad inmediata como su evolución en el tiempo, con el fin de detectar efectos acumulativos o, por el contrario, procesos de aclimatación del lodo al tóxico.

Se intenta, además, dilucidar las rutas de biodegradación (o biotransformación) así como determinar la cinética del proceso, que permitan encontrar las etapas limitantes y, en lo posible, definir la estrategia que permita superar esos límites. Es también importante determinar si durante el proceso se produce la mineralización completa de los compuestos en estudio o si, por el contrario, tiene lugar la formación de productos intermedios. En ese caso es de interés analizar las posibilidades de su

posterior degradación o eliminación, mediante sistemas complementarios. Se evalúa, también, la variación (aumento o disminución) de toxicidad tras el tratamiento.

Se considera también el uso de cosustratos como medio para favorecer tanto la extensión como la cinética de la degradación. Es conocido que, en ocasiones, el uso de estos cosustratos puede estimular la actividad de distintos grupos tróficos, permitiendo de eses modo acelerar el proceso mediante la activación de rutas metabólicas alternativas.

Una vez realizados los estudios en discontinuo, que permiten dar luces sobre las posibilidades del proceso así como establecer las condiciones límites, se plantea el tratamiento en continuo cuyos resultados deben ser definitivos a la hora de considerar el interés o no del proceso. En esta fase se obtienen los datos precisos sobre conversiones y capacidades que, finalmente, permiten obtener los parámetros de diseño y establecer las estrategias de operación.



# Capítulo 1

## Introducción

### 1.1. Nuevas perspectivas en la gestión de efluentes industriales

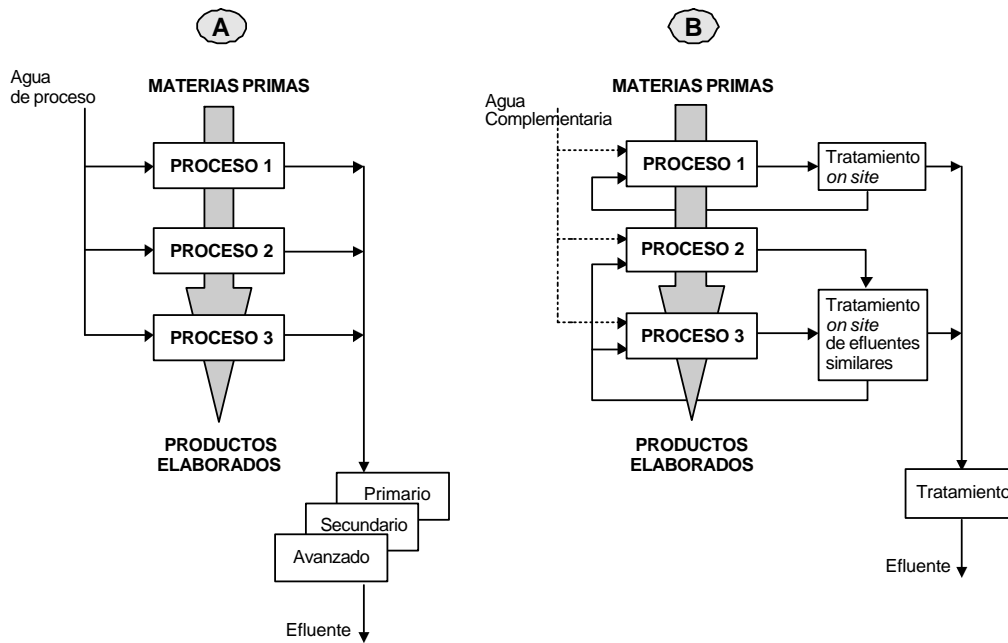
Muy frecuentemente se designa al pasado siglo XX como el siglo de la química orgánica debido al desarrollo de miles de compuestos diferentes utilizados para la elaboración de una infinidad de nuevos productos: fibras sintéticas, plásticos, compuestos farmacéuticos, etc. Paralelamente, esto ha supuesto el vertido al medio ambiente en forma de efluentes líquidos, sólidos o gaseosos, de un gran número de estas sustancias, con un fuerte impacto asociado sobre el medio receptor. Este impacto está en numerosas ocasiones originado por el papel limitado que pueden jugar estas sustancias en los ciclos naturales de descomposición de la materia debido a su carácter antropogénico y xenobiótico. Un ejemplo claro lo constituye la industria química y petroquímica, que tiene el dudoso honor de ser la principal fuente de este tipo de residuos, completamente diferentes a los residuos generados por el sector agroindustrial.

Por otra parte, uno de los principales puntos que tiene en cuenta la nueva legislación de la Unión Europea es la necesidad de adoptar procesos de producción con “emisión cero”, que pueden desarrollarse a partir de la minimización de la descarga de los contaminantes generados por las actividades industriales. Para alcanzar ese objetivo, la primera prioridad sería la reducción de la emisión de contaminantes en cada etapa del proceso de fabricación, mientras que la segunda se centraría en el tratamiento y reciclaje de productos de deshecho.

Los procesos de fabricación antiguos (Figura 1.1A) estaban basados en un consumo considerable de agua limpia, lo que implica un caudal muy grande del efluente a

tratar. Además, debido a la complejidad de la composición de esta corriente, la planta de depuración será necesariamente grande y compleja.

Al contrario, los nuevos procesos de fabricación tienen como uno de sus principales objetivos la minimización de las necesidades de agua de proceso, por lo que se basan en la adopción *on site* de plantas de tratamiento específicas para tratar las corrientes generadas por un proceso determinado. Este concepto implica unidades de tratamiento más pequeñas y específicas, que pueden producir agua reutilizable en cada proceso. Sólo la fracción residual generada por estas unidades se trataría en una planta general de tratamiento de aguas (Fig. 1.1B).



**Figura 1.1.** Diferentes estrategias de gestión de aguas residuales en un proceso.

La siguiente prioridad sería la optimización de la selección y operación de los procesos de tratamiento de aguas residuales con el objetivo de combinar tanto la deseada alta calidad del efluente final como la minimización del consumo energético. La tendencia anteriormente comentada de reducción del volumen de las aguas residuales generadas por un proceso de fabricación supone muy frecuentemente la presencia de una pequeña corriente pero muy concentrada, que puede ser más difícil de tratar. El diseño final puede ser, por lo tanto, el resultado de la combinación apropiada de varios métodos de tratamiento de aguas residuales, como los procesos anaerobios, nitrificantes, denitrificantes, etc. Por lo tanto, el desarrollo de tecnologías avanzadas para el tratamiento de aguas residuales que puedan cumplir con los objetivos anteriormente mencionados (alta calidad del efluente final, menor consumo energético, reciclado) es altamente prioritario (Lema y Omil, 2001).

#### **1.1.1. Procesos de tratamiento**

Los procesos de tratamiento de las aguas residuales industriales cubren en la actualidad una amplia gama de operaciones que han de ser adecuadamente combinadas para conseguir el efluente final deseado. Sigue vigente la tradicional clasificación entre procesos biológicos y físico-químicos, según las características de biodegradabilidad del vertido a tratar, pero lo más común es la combinación entre varias de estas etapas.

Los procesos físico-químicos han sido tradicionalmente empleados para la separación de las sustancias no deseadas, ya sea por medios puramente físicos (sedimentación, flotación, filtración) o mediante una primera etapa en donde se favorezca la creación de partículas aglomerantes (precipitación, coagulación-floculación). Por ello, estos procesos no resuelven en su totalidad el problema ya que lo que hacen es cambiar de fase el contaminante, postergando el problema de su eliminación. Además, en muchos casos esto supone un alto coste de operación tanto por el coste de reactivos como, fundamentalmente, por el coste de la gestión de los lodos generados.

Las aguas residuales con características para ser tratadas biológicamente han sido sometidas tradicionalmente a procesos de tipo aerobio, en donde se consigue una

eficaz mineralización de la materia orgánica. Sin embargo, estas unidades tienen un coste de operación considerable debido a la necesidad de aireación y a su elevada producción de lodos. Además, la legislación desarrollada en los últimos años ha supuesto unas restricciones más estrictas sobre el vertido de lodos, la contaminación del aire, el control de olores, etc. La combinación de estos factores ha tenido un impacto considerable que ha reducido significativamente la aplicabilidad de los procesos aerobios en las aguas residuales industriales.

En este contexto, los procesos anaerobios de tratamiento de aguas residuales son una alternativa cada vez más consolidada. En comparación con las plantas convencionales de tratamiento aerobio, las principales ventajas del tratamiento anaerobio son: a) menores costes de tratamiento; b) alta flexibilidad, ya que puede aplicarse a efluentes de muy diverso tipo; c) operación con altas cargas de materia orgánica, lo que supone menores requerimientos de espacio; d) menor volumen de los lodos en exceso; e) los organismos anaerobios pueden mantenerse sin alimentación durante largos períodos de tiempo.

### **1.1.2. Los procesos de tratamiento anaerobio: una tecnología limpia**

La adopción de tecnologías limpias para el desarrollo de nuevos procesos de fabricación, así como para la adaptación de los existentes, es uno de los conceptos fundamentales en los que está basada la política medioambiental de la UE. Este concepto, que implica el progresivo abandono o modificación de aquellas tecnologías menos eficaces y que generen más corrientes residuales, también está siendo aplicado para las nuevas plantas de tratamiento de aguas residuales. Es en este campo donde los procesos anaerobios suponen un paso importante, que se puede resumir en los aspectos que se desarrollan a continuación.

#### **Menor generación de biomasa residual**

La tecnología anaerobia supone una producción de lodos muy inferior a la de los procesos aerobios (5-20%). En la situación actual en Europa, con numerosos vertederos a punto de cerrarse, grandes limitaciones para su uso en agricultura, etc., las tecnologías que generen menores cantidades de lodo residual estarán en una

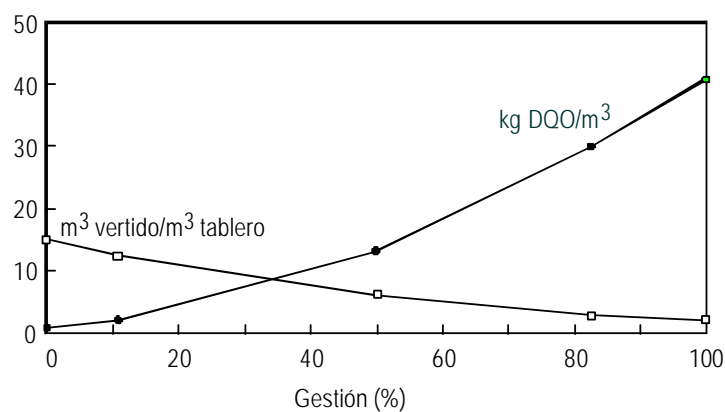
situación más ventajosa, ya que los lodos son a menudo considerados como sólidos peligrosos o tóxicos, lo que implica su procesado en plantas específicas.

### **Mayores cargas orgánicas aplicadas y mayores concentraciones**

En los sistemas anaerobios las cargas orgánicas aplicadas son muy altas, con un rango de  $5\text{-}20 \text{ kg DQO}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ , mientras que lo normal en los sistemas aerobios es  $0,5\text{-}3 \text{ kg DQO}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ . Esto implica una reducción sustancial del volumen del reactor y de la superficie necesaria, es decir, un coste menor de instalación. Por otra parte, algunas industrias están alcanzando hoy en día altos niveles de reutilización de sus aguas, y el efluente final que generan, a pesar de tener un caudal pequeño, está muy cargado tal y como se muestra en la Figura 1.2, referente a la gestión de los vertidos realizada en una factoría de tableros de fibra (Fernández *et al.*, 1995). Los procesos basados en la tecnología anaerobia están especialmente indicados para el tratamiento de caudales pequeños altamente concentrados. La comparación entre las diferentes tecnologías puede hacerse en términos de materia orgánica eliminada por unidad de área requerida. Los sistemas aerobios convencionales (lodos activos, filtros percoladores, etc.) tienen valores típicos de  $1\text{-}10 \text{ kg DBO eliminado}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$  (Hu *et al.*, 1999). Los sistemas anaerobios industriales, sin embargo, están incluidos en un rango superior, de  $20 \text{ a } 40 \text{ kg DBO eliminado}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$  (Fig. 1.3).

### **Estabilidad y menos problemas operacionales**

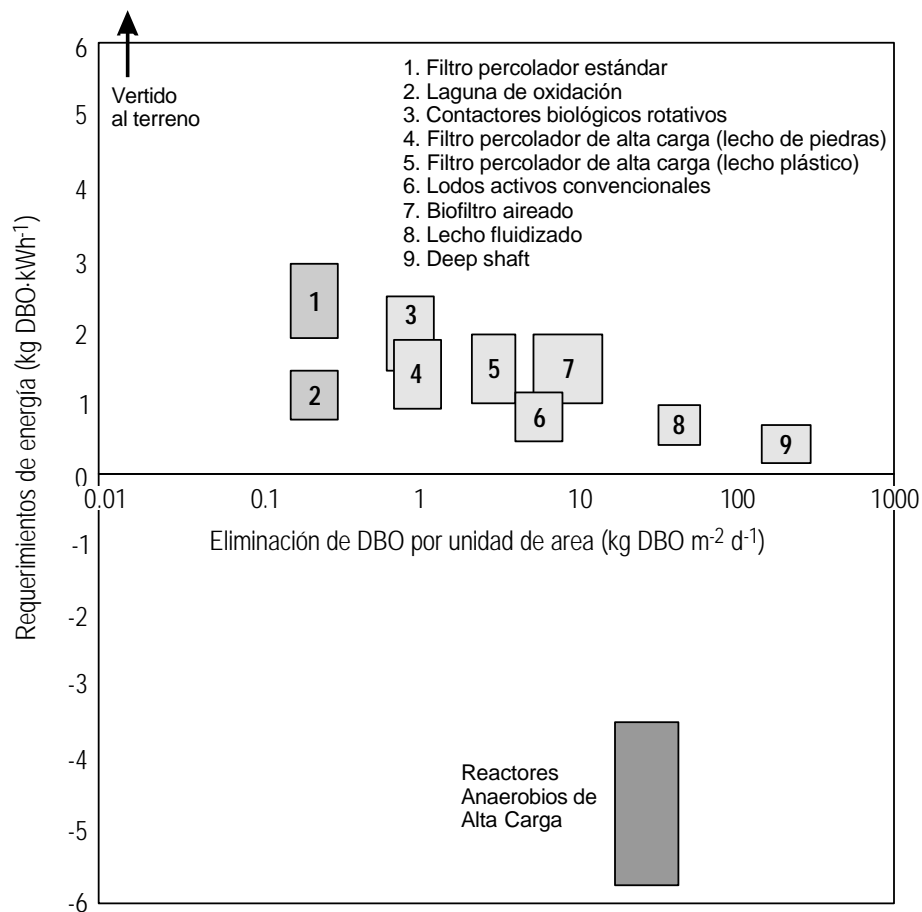
Un conocimiento cada vez mayor de los procesos que se llevan a cabo en los reactores anaerobios, así como el desarrollo de nuevas aplicaciones tecnológicas, está haciendo cada vez más posible reemplazar numerosos procesos aerobios, que continúan presentando numerosos problemas de operación (*bulking*, pérdida de biomasa) y de gestión de lodos. Al contrario, los reactores anaerobios de alta carga desarrollados en las últimas décadas están basados en biomasa inmovilizada tanto mediante granulación como adhesión, lo que minimiza los problemas de pérdida por lavado de lodos.



**Figura 1.2.** Efecto de la gestión de efluentes en la industria de la fabricación de tableros de fibra. Reducción del volumen de vertido específico (relativo a la producción de tableros) y aumento de la concentración de los vertidos resultantes (Fernández *et al.*, 1995).

### Tratamiento de aguas residuales estacionales

Una importante ventaja de la tecnología anaerobia radica en su idoneidad para el tratamiento de aguas residuales que se generan de forma estacional, como las producidas por las factorías conserveras (Omil *et al.*, 1996). El lodo anaerobio puede mantenerse activo durante largos períodos de tiempo, con un pequeño descenso de su actividad. El re arranque puede, por lo tanto, realizarse en períodos muy cortos de tiempo.



**Figura 1.3.** Comparación de procesos aerobios y anaerobios en términos de requerimientos de energía y espacio (Lema y Omil, 2001).

### **Biotransformación y biodegradación de xenobióticos**

Las investigaciones recientes indican que ciertos compuestos orgánicos, no biodegradables bajo condiciones aerobias, pueden transformarse anaeróbicamente. Por ejemplo, los procesos anaerobios pueden dehalogenar con éxito compuestos

orgánicos clorados tales como los AOX generados en la industria de la pulpa y papel (Parker *et al.*, 1993). Esto implica un importante potencial de detoxificación, que ya en la actualidad se está mostrando como una razón muy importante para la selección de etapas de tratamiento anaerobio.

Además, los procesos anaerobios han conseguido mineralizar completamente numerosos compuestos antropogénicos. Compuestos aromáticos como fenoles y cresoles, comúnmente presentes en los vertidos de la industria petroquímica, han sido degradados anaeróbicamente (Charest *et al.*, 1999; Kennes *et al.*, 1997). Una revisión muy completa acerca de los últimos desarrollos y más recientes aplicaciones de las tecnologías anaerobias sobre el tratamiento de efluentes complejos que contienen ácido tereftálico, resinas sintéticas, carboximetilcelulosa, ácido maleico, etc. ha sido publicada por Macarie (1999), mostrando la Tabla 1.1 un pequeño resumen de los datos aportados por este trabajo.

### **Emisión de compuestos orgánicos volátiles**

El control estricto de las emisiones gaseosas que contienen compuestos orgánicos volátiles se hace cada vez más extensivo no sólo a los procesos productivos, sino a las plantas de tratamiento de efluentes. En los reactores aerobios, muchos compuestos contaminantes orgánicos pasan directamente a la atmósfera antes de degradarse, mediante su desorción desde el agua al aire suministrado a la unidad (Speece, 1996). Esta es una de las principales ventajas de la tecnología anaerobia cuando se realiza un balance medioambiental global de una planta de tratamiento.

### **Eficacia energética**

El tratamiento anaerobio produce energía en forma de biogás ( $1,27 \cdot 10^7$  J·kg<sup>-1</sup> DQO eliminado) mientras que los procesos aerobios requieren entre 0.5 y 2 kW·h·kg<sup>-1</sup> O<sub>2</sub>, dependiendo de la tecnología aplicada (Speece, 1996). Esta característica supone un beneficio tanto económico como ecológico. Parte de la energía puede usarse para calentar el reactor, mientras que el exceso de energía puede convertirse en electricidad ( $1,05 \cdot 10^7$  J·kg<sup>-1</sup> requerido por 1 kW·h producido).



### Una tecnología flexible

La tecnología anaerobia presenta una gran flexibilidad, siendo posible tratar muy diversos tipos de aguas residuales: de alta, media y baja carga; corrientes calientes y frías; efluentes simples y complejos. La capacidad de adaptación mostrada por la biomasa anaerobia se ha citado frecuentemente como un factor clave en el desarrollo de sistemas para tratar nuevos efluentes. Los trabajos llevados a cabo con las aguas residuales generadas por las factorías conserveras de productos marinos han mostrado el potencial de estos procesos incluso para el tratamiento de aguas con alto contenido salino (Omil *et al.*, 1996). Además, los procesos anaerobios son muy adaptables a los medios disponibles en cada caso, habiéndose desarrollado plantas extremadamente simples, únicamente con un control de la temperatura. En el otro extremo, hoy se dispone de tecnologías muy sofisticadas, como las usadas en los reactores de lecho fluidizado, sistemas EGSB, etc., que requieren mecanismos precisos para controlar la hidráulica y la estabilidad del proceso (Rebac *et al.*, 1995).

**Tabla 1.1.** Reactores anaerobios que tratan aguas generadas por empresas no relacionadas con la alimentación y el sector agroindustrial (Macarie, 1999).

Tipo de aguas	Tipo de reactor				
	AC	AF	UASB	EGSB	FB
Pulpa y papel	14	4	75	-	3
Petroquímica y Química	4	17	23	9	1
Lixiviados	-	1	17	-	-
Farmacia	2	2	5	3	-
Caucho	-	3	3	-	-
Textil	-	-	3	-	-
Curtidos	-	-	2	-	-
Desulfuración de gases	-	-2	58	-	-

AC, contacto anaerobio; AF, filtro anaerobio; UASB, Reactor anaerobio de lecho de lodos; EGSB, reactor de lecho expandido; FB, reactor de lecho fluidizado

### 1.1.3. Fenómenos de inhibición o toxicidad

Por encima de una determinada concentración, prácticamente cualquier sustancia puede producir efectos inhibitorios, incluso compuestos utilizados como sustrato para la biomasa. Sin embargo, a bajas concentraciones, muchos compuestos naturales presentan efectos estimulantes para el metabolismo bacteriano. En aguas residuales que contienen compuestos solubles y fácilmente biodegradables, los problemas de toxicidad están normalmente limitados a la etapa metanogénica.

El agua residual puede contener numerosos compuestos inhibitorios de la metanogénesis, que pueden clasificarse de acuerdo con su patrón de toxicidad en tres tipos: metabólico, fisiológico y bactericida. El efecto de cada una de estas categorías de toxinas en los componentes celulares de las bacterias y en su actividad metanogénica se describe en la Tabla 1.2.

**Tabla 1.2.** Patrones de toxicidad

Tipo de toxina	Actividad			Efecto en las bacterias
	Durante la exposición	Después de la exposición	A largo plazo	
atóxica	alta	alta	alta	sin daño
metabólica	baja	alta	alta	sin daño
fisiológica	baja	baja	alta	Componentes subcelulares dañados
bactericida	baja	baja	baja	Toda la célula dañada

Hasta hace poco tiempo, la presencia de determinadas sustancias en el medio era considerada como perjudicial, debido a que producían efectos inhibitorios sobre la actividad de las bacterias anaerobias, especialmente las bacterias metanogénicas. Entre estas sustancias destacan algunos cationes como el sodio, sustancias inorgánicas como el amoníaco y el sulfuro de hidrógeno, y una gran variedad de

compuestos orgánicos, entre los cuales se puede citar el formaldehído, que, en concentraciones relativamente bajas, es considerado como un agente bactericida.

La toxicidad de los compuestos comúnmente inhibidores de la metanogénesis (como los AGV,  $\text{NH}_3$  y  $\text{H}_2\text{S}$ ) está altamente influenciada por el pH ya que es la fracción no ionizada la que se considera como agente tóxico. El mantenimiento del pH en un reactor que produzca un nivel alto de disociación (pH alto para AGV y  $\text{H}_2\text{S}$ , mientras que bajo para  $\text{NH}_3$ ), es una posible alternativa para reducir el efecto tóxico de estos compuestos. La toxicidad que ejercen otros compuestos como metales pesados, sustratos grasos y otros complejos (grasa, lignina, resinas) también está relacionada con el pH, pero a través de un efecto indirecto sobre las reacciones de solubilización-precipitación. Un pH que causa un alto nivel de insolubilización presumiblemente va a reducir su efecto tóxico (por ello es recomendable un pH alto para metales pesados y un pH bajo para sustratos grasos), aunque de todos modos, tampoco es deseable una gran acumulación de sólidos en el reactor ya que interfieren con la biomasa al ocupar espacio y, en casos específicos, incluso pueden llegar a ser muy perjudiciales para la misma.

El efecto inhibitorio de ciertos compuestos puede disminuir por adaptación del lodo a la toxina. Un buen ejemplo de esta adaptación es el de la toxicidad causada por el  $\text{NH}_3$ . La adaptación metanogénica a la inhibición puede ser real o un resultado indirecto de la degradación o modificación biológica de la toxina por otros organismos del lodo anaerobio. Un caso de adaptación indirecta es el que se presenta con fenol, sustancia que se degrada por acción de las bacterias, y con sulfito, compuesto que se reduce anaeróticamente a  $\text{H}_2\text{S}$ , mucho menos tóxico. Con frecuencia, el lodo anaerobio se adapta a toxinas orgánicas biodegradables. Para favorecer la adaptación, el lodo debe ser expuesto inicialmente a concentraciones subinhibitorias de la toxina. Concentraciones crecientes podrán ser toleradas una vez que el lodo pueda degradar la toxina.

En muchos casos los agentes tóxicos sólo causan este efecto mientras están presentes. Tan pronto como se reemplaza el agente tóxico del medio, el efecto tóxico deja de ser apreciable. En este caso se dice que la toxicidad es reversible, causada por

el impedimento que ejerce dicha sustancia sobre algún proceso metabólico, pero sin causar ningún daño a las células. Un ejemplo de esta toxicidad es la causada por el sodio.

En otros casos la toxicidad permanece después de eliminar el agente tóxico del medio, pero la recuperación de la actividad es más rápida que la regeneración de las bacterias metanogénicas. En este caso se dice que la toxicidad es recuperable. En este tipo de toxicidad el agente tóxico daña los componentes subcelulares (membranas y enzimas intracelulares) sin causar la muerte de las células de las bacterias metanogénicas. Los compuestos fenólicos son un ejemplo de agentes tóxicos que causan este tipo de toxicidad.

La toxicidad bactericida o letal causa la muerte de las células. En este caso, después de la eliminación del agente tóxico del medio, el período de tiempo necesario para recuperar la actividad perdida es igual al necesario para la regeneración de las bacterias metanogénicas. El cloroformo o el formaldehído son ejemplos de agentes que causan toxicidad bactericida o letal.

#### **1.1.4. Presencia de formaldehído y tintes en aguas industriales**

El formaldehído es un compuesto tóxico muy conocido, que está presente en numerosas aguas residuales industriales, tales como las generadas en el procesado del petróleo o durante la fabricación de tableros de fibras de madera a base de colas. Estos dos sectores son importantes en Galicia, y es importante tener un conocimiento mayor sobre los efectos que causa este compuesto en los procesos biológicos de tratamiento anaerobio y aerobio.

Otro problema medioambiental importante lo suponen las industrias del sector textil, también con una gran presencia en nuestra comunidad. Una de las principales características de los efluentes generados por estas factorías es su coloración, debido a la presencia de numerosos tintes. En este trabajo se centraron los estudios realizados en el tinte *Acid Orange 7* por pertenecer al grupo de tintes azo, los más numerosos en cuanto a producción y uso, y dentro de ellos, uno de los más conocidos. Se usa ampliamente para dar color a numerosos materiales tales como

lana, cuero y papel. También se hicieron ensayos con el Poly R-478, un tinte polimérico de estructura más compleja y peso molecular más elevado, por lo que su tratamiento bacteriano presenta *a priori* un mayor grado de dificultad, contemplándose por ello alternativas combinadas de bacterias y hongos.

## **1.2. Formaldehído**

### **1.2.1. Generalidades**

El formaldehído, también llamado formol, aldehído fórmico o metanal, es un gas volátil, ligeramente más pesado que el aire, incoloro y muy soluble en agua. Fue sintetizado por vez primera en 1868 al poner en contacto una corriente de aire cargada de metanol con una espiral de platino incandescente. Está muy presente en la naturaleza, por ejemplo, en la madera y en la fruta de forma natural. Se añade a diversos productos como adhesivos, pinturas, barnices y tejidos. Una alta concentración de formaldehído puede causar una reacción alérgica. La producción anual de formaldehído está en torno a los 3.7 billones de kilos, estando entre los 25 productos químicos con mayor producción en Estados Unidos (American Chemical Society, 1996).

La estructura química del formaldehído se muestra en la Fig. 1.4.

### **1.2.2. Propiedades físicas y químicas**

En condiciones normales es un gas de olor característico que irrita fuertemente las mucosas y que, tras su condensación, produce un líquido incoloro, con puntos de ebullición y fusión de  $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $-92\text{ }^{\circ}\text{C}$ , respectivamente. Su temperatura de autoignición es  $363\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Es bastante soluble en agua, pudiendo disolverse hasta un 52,5%. La solución acuosa de formaldehído al 37% en peso (40% en volumen) se denomina formalina o formol; ésta contiene además entre 10% y 15% de metanol para inhibir su posterior polimerización a paraformaldehído (Coldicon *et al.*, 1983).

La entalpía normal de formación del formaldehído es de  $108,6\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Al disolver el gas en agua, se forman hidratos, por eso el único modo de expulsar el gas por

completo de la disolución es disminuyendo la presión a la vez que se aspira una corriente de gas. En la destilación fraccionada de una disolución de formaldehído puro, sin emplear vacío, ni hacer pasar una corriente de aire, se obtiene una mezcla de agua y formaldehído; si la disolución es de formaldehído bruto, que todavía contiene una fracción de metanol, destila primero el metanol y después lo hace la solución acuosa de formaldehído. Las disoluciones diluidas de formaldehído con sólo pequeñas cantidades de metanol pueden concentrarse hasta un 52,3% empleando sulfato de cobre anhidro o acetato de sodio también anhidro. No pueden conseguirse concentraciones mayores ya que entonces se produce una separación de porciones sólidas de polimerización.



**Figura 1.4.** Estructura química del formaldehído

### 1.2.3. Metabolismo intermediario

El formaldehído es un producto de la oxidación del alcohol metílico o metanol (Ec. 1.1).



Su elevada solubilidad le permite ser absorbido en las vías respiratorias altas, aunque pequeñas cantidades del gas inhalado pueden penetrar en los pulmones. El aldehído, una vez inhalado, se metaboliza fundamentalmente tanto en el hígado

como en la sangre a ácido fórmico (HCOOH) por la acción de la enzima formaldehído deshidrogenasa (F. Desh.), como se muestra en la Ec. 1.2.



También puede sufrir un proceso de oxidación directa, aunque en menor proporción en los diferentes tejidos.

El ácido fórmico, a su vez, puede seguir diversos caminos metabólicos, como :

Ser oxidado a dióxido de carbono y agua (Clark, 1985)

Ser eliminado por la orina como sal sódica (NaHCOO)

Entrar en el metabolismo de los compuestos de carbono inorgánico (Gottschling *et al.*, 1984)

#### 1.2.4. Principales reacciones

El formaldehído es un compuesto de gran reactividad. Se combina con casi todas las sustancias orgánicas posibles, actuando no sólo como aldehído H-CHO, sino también como metilenglicol HO-CH<sub>2</sub>-OH. Reacciona con los compuestos de oxígeno, nitrógeno y carbono. Destacan las siguientes reacciones:

Introducción del grupo HO-CH<sub>2</sub> (oximetilo).

Introducción del grupo CH<sub>2</sub>

Introducción del grupo CH<sub>3</sub>

Bajo la acción de pequeñas cantidades de álcali, por ejemplo agua de cal, el formaldehído sufre una polimerización de naturaleza completamente distinta. Por la condensación de carbono se llega a sustancias análogas a los azúcares C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>, denominadas formosas, obteniéndose como producto intermedio el gliceraldehído. El

componente principal de la formosa es la acrosa- $\alpha$ , es decir, el azúcar de frutas inactivo.

El formaldehído es un reductor enérgico en presencia de bases fuertes, así puede utilizarse como agente separador de diferentes disoluciones de metales, tales como oro, plata y mercurio. Calentándolo en presencia de lejía sódica diluida se convierte en metanol y ácido fórmico; con lejía sódica concentrada tan sólo produce ácido fórmico y un desprendimiento simultáneo de hidrógeno.

### **1.2.5. Usos**

El uso industrial más importante del formaldehído es como materia prima para la fabricación de resinas, adhesivos o colas para madera (colas aminoplásticas). Algunas de estas colas o resinas son las compuestas por úrea-formaldehído (UF), fenol-formaldehído (PF), o fenol-formaldehído/resorcinol-formaldehído (PF/RF). Las primeras son menos resistentes y dan resultados satisfactorios solamente en interiores con bajo riesgo (Laidlaw). En ambientes de intemperie los mejores resultados se obtienen con mezclas de resinas de melamina-formaldehído y urea-formaldehído (MF/UF). El *p*-tert-butilfenol es otra resina de formaldehído que se emplea en moldeado y fundición, muy especialmente en la fabricación de zapatos, automóviles y en la lana de vidrio; se puede encontrar en colas para madera, goma, cuero, teléfonos y ruedas de timones. También se usa en colas empleadas para cerrar cigarrillos puros y en adhesivos de algunas gomas arábicas usadas en litografía

Otro de los usos más conocidos del formaldehído está asociado al hecho de ser considerado como el "Fijador clásico". Los fijadores químicos son agentes que se emplean para retardar y/o prevenir los cambios "post-mortem" en células y tejidos. Las técnicas histológicas se basan en el uso de estos agentes, procurando siempre que los tejidos así tratados permanezcan tan semejantes a los vivos como sea posible. El formaldehído se usa como fijador desde hace aproximadamente 100 años y, en la actualidad, es el más usado con estos fines en los laboratorios de Anatomía Humana Normal y Patológica, a nivel de aulas de operación y hospitales (Clark, 1985).



También se emplea desde hace tiempo como curtiente, por lo general, como auxiliar de algún otro curtiente. Su empleo en este sector radica en su capacidad de reaccionar con muchas sustancias orgánicas que contienen un átomo de hidrógeno activo. En el curtido, esta capacidad se traduce en la formación de un enlace cruzado en la proteína y la estabilización de la curtición.

En la industria de los tintes se usa como producto de partida en procesos de síntesis, así como en producción de acabados textiles para aumentar la fijación del color de las fibras ya teñidas. En la industria del papel, de tapicerías y en la textil se ha hecho uso de su propiedad de insolubilizar la albúmina y la gelatina.

Existen otros usos y aplicaciones del formaldehído, tales como en microscopía electrónica, como embalsamador, como estabilizante fotográfico, en algunas vacunas antitetánicas, en tratamiento antipolilla de pieles, en fabricación de zapatos, como antimicótico, desinfectante, preservador queratolítico (preparado antiverrugas o callicida) y como germicida y fungicida, como preservador de plantas antes de ser secadas, o de alimentos.

El formaldehído también se puede encontrar en los gases de escape de los motores diesel, en cosméticos (en los cosméticos se pueden encontrar agentes liberadores de formaldehído), papel envolvente de naranjas, en sábanas de algodón de hospitales, en aceite de hígado de bacalao, en impresión *offset* y en métodos analíticos de la leche.

### **1.2.6. Toxicidad**

Las propiedades del formaldehído en los procesos de preservación y conservación de los tejidos se descubrieron en 1893. No obstante, en ese momento se desconocía su alto potencial tóxico (Perkins y Klimbough, 1986).

La EPA (*Environmental Protection Agency*) consideró que el formaldehído es un probable cancerígeno humano (grupo B<sub>2</sub>), sobre la base de estudios experimentales y epidemiológicos. Los estudios epidemiológicos sugirieron un aumento en la incidencia de tumores en el cerebro, leucemia y cirrosis hepática entre trabajadores. Los estudios de laboratorio mostraron que el formaldehído causaba cáncer nasal en ratas, mutaciones en bacterias, levaduras y células de mamíferos y humanos.

El formaldehído representa un factor de riesgo laboral de tipo químico, ampliamente estudiado, cuyo efecto tóxico depende de su concentración, tiempo de exposición, características del individuo y presencia de otros contaminantes. Según los estudios de diversos autores, los niveles permitidos de exposición ocupacional al formaldehído deberían oscilar entre los límites inferiores de 1 ppm por un período de tiempo de 30 minutos (según lo establecido por el Instituto de Seguridad Ocupacional y Salud de los Estados Unidos, *NIOSH*) y concentraciones de 3 ppm en períodos de 8 horas (Pabst, 1983; Imbus, 1985; Frigas *et al.*, 1984; Clark *et al.*, 1983; Coldicon *et al.*, 1983). En la práctica estos períodos están estipulados entre 5 y 10 ppm, en períodos no mayores de 30 minutos. En Alemania, por ejemplo, se permite 1 ppm en períodos de 8 horas.

Pabst (1987) clasificó los efectos tóxicos del formaldehído, dependiendo de su frecuencia, del siguiente modo:

Irritación de las membranas mucosas.

Irritación de la piel (dermatitis).

Efectos cancerígenos

Se comprobó en animales que la zona más sensible a los vapores del formaldehído era la mucosa nasal (Imbus, 1985; Kilbom *et al.*, 1985; Halperin *et al.*, 1983). El 25% de las ratas expuestas a una concentración de 14,6 ppm presentaban lesiones en las mucosas nasales (Walker *et al.*, 1987). esto se debe a la elevada solubilidad del formaldehído en el fluido nasal (Ballenger, 1984).

Comparando el formaldehído con el fenol (otro compuesto usado como desinfectante), para la mayoría de los organismos en los que se hicieron pruebas, el formaldehído era más tóxico (Tisler y Zagorc-Koncan, 1997; Gerike y Gode, 1990).

A continuación se muestra una relación entre las concentraciones ambientales de formaldehído y los efectos sobre la salud en humanos (Tabla 1.3) así como concentraciones ambientales de formaldehído medidas en lugares en los que se usa con frecuencia (Tablas 1.4 y 1.5).

**Tabla 1.3.** Efectos producidos por la inhalación de formaldehído, en función de su concentración ambiental (Pabst, 1987).

<b>Concentración ambiental (ppm)</b>	<b>Efecto</b>
< 0,05 – 1,5	No se observan efectos en el 50-70% de las personas expuestas
0,05 – 1	Umbral olfativo (antes de la acomodación)
0,05 – 1,05	Efectos neurofisiológicos
0,05 – 2	Irritación ocular
0,1 – 2.5	Irritación de vías respiratorias superiores (nariz y garganta)
5 – 30	Efectos pulmonares y en vías respiratorias inferiores
50 – 100	Edema pulmonar, neumonía
> 100	Muerte

### **1.2.7. Presencia en aguas residuales**

El formaldehído puede encontrarse en altas concentraciones en las aguas residuales generadas en determinados procesos industriales. Por ejemplo, en la producción de fibras de poliéster ( $3-5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) (Bannik y Muller, 1951), colas industriales ( $0,2-4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) (Garrido *et al.*, 2000). Existen estudios acerca de los efectos dañinos que provoca el vertido de contaminantes orgánicos de formaldehído (Grafstrom *et al.*, 1985), por lo cual las aguas residuales generadas en estas actividades deben ser tratadas antes de ser vertidas.

**Tabla 1.4.** Concentraciones ambientales de formaldehído (tomada de COMPLUCAD® “La exposición al formaldehído”. Acta de Barcelona, Sociedad Anatómica Española, 1996. [www.compucad.com](http://www.compucad.com)).

Referencia	Operación/Lugar	Concentración (mg·L <sup>-1</sup> )
Berstein <i>et al.</i> , 1984	Sala de disección	2,2 – 7,9
	Manipulación de piezas	2 – 4
INSHT, 1989	Biopsias	1 – 4
	Perfusiones	5 – 6
Akbar-Khanzadeh <i>et al.</i> , 1994	Sala de disección	0,07 – 2,94
Delfrade y Velasco, 1995	Sala de disección	0,96 – 1,32
Delfrade y Velasco, 1995	Lab. Anatomía Patológica	0,25 – 1,39

**Tabla 1.5.** Concentración ambiental de formaldehído en ocho hospitales de cataluña (tomada de COMPLUCAD® “La exposición al formaldehído”. Acta de Barcelona, Sociedad Anatómica Española, 1996. [www.compucad.com](http://www.compucad.com)).

ÁREA	Formaldehído (ppm)	
	Valor mínimo	Valor máximo
Anatomía patológica (preparación de muestras)	0,30	6,90
Anatomía patológica (archivo de muestras)	0,22	0,36
Autopsias (sala de operaciones)	0,10	8,40
Autopsias (concentración de fondo)	0,10	1,70
Autopsias (manipulación de piezas de archivo)	1,10	1,60
Aire urbano	0,02	0,04

Las aguas residuales generadas en la elaboración de colas industriales a partir de urea y formaldehído, tienen una alta concentración de DQO ( $0,4-4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y de Nitrógeno Orgánico (NTK) ( $0,1-0,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y una baja relación DQO/NTK (Garrido *et al.*, 2001).

Diversos autores han constatado la toxicidad del formaldehído en tratamientos biológicos anaerobios (Qu y Bhattacharya, 1997; Sharma *et al.*, 1994; Vidal *et al.*, 1999). Se han encontrado valores de  $\text{IC}_{50}$  de formaldehído entre  $200$  y  $300 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , para distintos ensayos anaerobios sin cosustrato (Pearson *et al.*, 1980), y con sacarosa (Todini y Hulshoff, 1992) o glucosa (Lu y Hegemann, 1998) como cosustrato.

Garrido *et al.* (2000) emplearon un sistema de nitrificación/desnitrificación para eliminar la materia orgánica y el nitrógeno de un agua residual procedente de una fábrica de resinas de úrea-formol, alcanzando una eliminación de formaldehído superior al 99%, con una reducción del contenido de materia orgánica entre el 70 y 85%.

### **1.3. Tintes**

#### **1.3.1. Generalidades y clasificación**

La clasificación más conocida para los tintes es el *Colour Index* (C.I.), creado en 1924 por la *Society of Dyers and Colourists*. Clasifica a los tintes asignando a cada uno un nombre genérico, en función de sus características de aplicación y se le asigna un número de constitución en el *Colour Index*, dependiendo de su estructura química.

En la Tabla 1.6 se puede ver el porcentaje de aplicación de los distintos tipos de tintes, según su estructura química (no se incluyen los tintes *Sulfur* porque su estructura química es indefinida y no pueden ser incluidos dentro de ninguna clasificación química). Los sustratos a los que se aplica cada tipo de tinte, así como el método de aplicación y naturaleza química se muestran en la Tabla 1.7.

En 1990 de los aproximadamente 2 000 tintes *Acid* registrados en el *Colour Index*, el 55% todavía estaban en uso. El siguiente tipo de tintes más común eran los *Direct* (alrededor de 1450, estando un 40% en uso) y los *Disperse* (alrededor de 1250, estando en uso un 60%). El uso de los *Reactive* (75% en uso), *Solvent* (60% en uso) y pigmentos (60% en uso) se incrementaba. Por el contrario, el uso de los *Vat* (45% en uso) y *Mordant* (33% en uso) parecía disminuir (Shore, 1990). En la Tabla 1.8 se pueden ver algunos ejemplos de tintes *Acid* empleados para teñir lana.

El crecimiento que ha experimentado el uso de los tintes *Reactive* es debido al incremento del uso de las fibras de celulosa (Shore, 1990) y a limitaciones técnicas y económicas de otros tintes usados para estas fibras. Generalmente, la tinción con estos colorantes implica tres etapas (Gutiérrez y Crespi, 1999):

- a) Sorción del colorante en la fibra, que se lleva a cabo en medio neutro y con adición de un electrolito (generalmente NaCl o Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>) para favorecer el potencial del baño y así favorecer la sorción del colorante sobre la fibra.
- b) Reacción del colorante con la fibra. Esta reacción se inicia con la adición de una base al baño de tintura; simultáneamente tiene lugar la reacción secundaria de hidrólisis del colorante.
- c) Eliminación del colorante hidrolizado. El colorante disuelto se encuentra hidrolizado en la fase acuosa, en la disolución intermicelar y adsorbido por la fibra. Su eliminación se consigue por vaciado del baño de tintura, sucesivos lavados de la fibra en frío y, finalmente, se suele efectuar un lavado en caliente.

Hasta la Primera Guerra Mundial, la mayoría de la facturación de tintes sintéticos se hacía en Alemania. Hoy en día se fabrican por todo el mundo. El 50% de los tintes se usan en la industria textil.

**Tabla 1.6.** Porcentaje de distribución de los distintos tipos de tintes según su estructura química y su rango de aplicación (Shore, 1990).





















Clasificación química	%								
	<i>Acid</i>	<i>Basic</i>	<i>Direct</i>	<i>Disperse</i>	<i>Mordant</i>	<i>Pigment</i>	<i>Reactive</i>	<i>Solvent</i>	<i>Vat</i>
<b>Acridina</b>		<b>92</b>		<b>4</b>				<b>4</b>	
<b>Aminocetona</b>	<b>11</b>			<b>40</b>	<b>8</b>		<b>3</b>	<b>8</b>	<b>30</b>
<b>Antraquinona</b>	<b>15</b>	<b>2</b>		<b>25</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>9</b>	<b>36</b>
<b>Azina</b>	<b>39</b>	<b>39</b>				<b>3</b>		<b>19</b>	
<b>Formazán</b>	<b>70</b>						<b>30</b>		
<b>Indigoide</b>	<b>2</b>					<b>17</b>			<b>81</b>
<b>Azoico metálico</b>	<b>65</b>		<b>10</b>				<b>12</b>	<b>13</b>	
<b>Metina</b>		<b>71</b>		<b>23</b>		<b>1</b>		<b>5</b>	
<b>Nitro, nitroso</b>	<b>31</b>	<b>2</b>		<b>48</b>	<b>2</b>	<b>5</b>		<b>12</b>	
<b>Oxazina</b>		<b>22</b>	<b>17</b>	<b>2</b>	<b>40</b>	<b>9</b>	<b>10</b>		
<b>Ftalocianina</b>	<b>14</b>	<b>4</b>	<b>8</b>		<b>4</b>	<b>9</b>	<b>43</b>	<b>15</b>	<b>3</b>
<b>Qinoftalona</b>	<b>30</b>	<b>20</b>		<b>40</b>				<b>10</b>	
<b>Estibeno</b>			<b>98</b>					<b>2</b>	
<b>Tiazina</b>		<b>55</b>			<b>10</b>			<b>10</b>	<b>25</b>
<b>Tiazol</b>		<b>5</b>	<b>95</b>						
<b>Tiaril metano</b>	<b>35</b>	<b>22</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>24</b>	<b>5</b>		<b>12</b>	
<b>Azoico no metálico</b>	<b>20</b>	<b>5</b>	<b>30</b>	<b>12</b>	<b>12</b>	<b>6</b>	<b>10</b>	<b>5</b>	
<b>Xaneno</b>	<b>36</b>	<b>16</b>			<b>9</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>38</b>	

**Tabla 1.7.** Sustratos y aplicación de los distintos tipos de tintes (Kirk-Ohmer, 1993)

<b>Tipo</b>	<b>Sustratos</b>	<b>Método de aplicación</b>
<i>Acid</i>	Nilón, lana, seda papel, tintas y cuero	Generalmente en baños neutros o ácidos de tinte
Componentes azoicos y composiciones	Algodón, rayón, celulosa, acetato y poliéster	Impregnación de la fibra con componentes asociados y tratamiento con disoluciones de sales de diazonio estabilizadas
<i>Basic</i>	Papel, nilón modificado, poliéster y seda	En baños ácidos de tinte
<i>Direct</i>	Algodón, rayón, papel, cuero y nilón	En baños de tinte neutros o ligeramente alcalinos, con electrolitos adicionales
<i>Disperse</i>	Polyester, poliamida, acetato, acrílico y plásticos	Finas dispersiones acuosas, a menudo aplicadas a lata temperatura y presión o métodos de transferencia a baja temperatura: el tinte puede rellenar la ropa y endurecerse o fijarse térmicamente
Intensificadores de brillo fluorescentes	Jabón y detergentes, todas las fibras, aceites, pinturas y plásticos	En disoluciones, dispersiones o suspensiones, en bruto
De comida, drogas y cosméticos	Comidas, drogas y cosméticos	
<i>Mordant</i>	Lana, cuero y aluminio anodizado	En combinación con sales quelantes de cromo
Naturales	Comidas	Como los tintes <i>Mordant, vat, solvent, o direct y acid</i>
Bases oxidantes	Pelo, piel sintética y algodón	Aminas aromáticas y fenoles oxidados sobre el sustrato
Pigmentos	Pinturas, tintas, plásticos y telas	Se pintan sobre la fibra con resinas o dispersiones en bruto
<i>Reactive</i>	Algodón, lana, seda y nilón	Los componentes reactivos del tinte reaccionan con los grupos funcionales de la fibra para unirse covalentemente al tinte bajo la influencia del calor y el pH (alcalino)
<i>Solvent</i>	Plásticos, gasolinas, barnices, lacados, marcadores, tintas, grasas, aceites y ceras	Disolución sobre el sustrato
<i>Sulfur</i>	Algodón y rayón	Sustratos aromáticos son mezclados en una cuba con sulfuro de sodio y son oxidados sobre la fibra a productos insolubles con contenido en azufre
<i>Vat</i>	Algodón, nilón y lana	Son insolubles y se reducen con sodio para hacerlos solubles



**Tabla 1.8.** Ejemplos de tintes *Acid* empleados en la tinción de lana con el color resultante tras mezclar las proporciones marcadas en el método (Town End, Leeds, plc. Industrial Dyestuffs. <http://www.dyes.co.uk/acid-dyes-wool.html>)

<b>Método de tintura</b>	
Método ácido ( <i>Acid Levelling Dyes Duramine</i> )	Método neutro ( <i>Neutral Dyeing Acid Dyes Evron</i> )
 Yellow 2G <i>Acid Yellow 17</i>	 Yellow R <i>Acid Yellow 42</i>
 Yellow T <i>Acid Yellow 23</i>	 Yellow R <i>Acid Yellow 42</i>
 Yellow RP <i>Acid Yellow 25</i>	 Brilliant Yellow 3GL <i>Acid Yellow 127</i>
 Yellow 2GP <i>Acid Yellow 29</i>	 Yellow LNW <i>Acid Yellow 151</i>
 Yellow AE <i>Acid Orange 3</i>	 Yellow RX <i>Acid Orange 67</i>
 Orange II <i>Acid Orange 7</i>	 Orange 2G Acid <i>Orange 116</i>
 Orange G <i>Acid Orange 10</i>	 Brown R <i>Acid Orange 51</i>
 Red 2G <i>Acid Red 1</i>	 Red BG <i>Acid Red 114</i>
 Red W <i>Acid Red 14</i>	 Red VB <i>Acid Red 119</i>
 Floxine BL <i>Acid Red 37</i>	 Brilliant Red 3B <i>Acid Red 129</i>

### **1.3.2. Los tintes azo. Toxicidad sobre humanos y animales**

Los tintes azo son los más importantes en la producción mundial de tintes sintéticos, tanto en número, como en cantidad fabricada, significando aproximadamente el 60-70% de los más de 10 000 tintes empleados en los procesos de las industrias textiles (Carliell *et al.*, 1995), y el 70% del mercado de tintes orgánicos. Se fabrican principalmente en China, India, Corea, Taiwan y Argentina.

Estos compuestos se caracterizan por tener un enlace N=N al que se añaden estructuras aromáticas como sustituyentes. El enlace azo es el responsable del color y su rotura implica la pérdida de color del compuesto.

El gran problema derivado de los tintes azo es que se sintetizan a partir de aminas aromáticas.

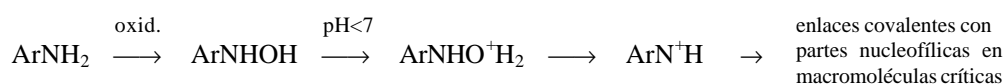
Las aminas aromáticas son sólidos a temperatura ambiente. Si no tienen otro grupo funcional son incoloras. Son compuestos con una alta presión de vapor, dando un olor característico. Sólo son parcialmente solubles en agua. Son muy susceptibles de ser oxidadas si son expuestas al aire durante largos períodos, cambiando a color marrón o negro.

Los principales riesgos que presenta la exposición a las aminas aromáticas son la formación de methemoglobina y el cáncer. Estos efectos están atribuidos a los productos de la oxidación metabólica del nitrógeno (Neumann y Wieland, 1973).

El contacto a través de la piel o inhalación de estos compuestos podría provocar deficiencias respiratorias debido a problemas en los sistemas de transporte del oxígeno en la sangre, ya que el hierro del grupo hemo de la hemoglobina es oxidado de Fe (II) a Fe (III) y el producto resultante (methemoglobina) no puede combinarse con el oxígeno o dióxido de carbono. Las arilhidroxilaminas son consideradas las más peligrosas en este sentido, ya que son las que tienen mayor poder para formar la methemoglobina (Gerulis, 1985).

También es muy conocido el poder cancerígeno de las aminas aromáticas. Este problema se consideró a principios del siglo XX como una epidemiología de cáncer de origen industrial (Parkes, 1976 ).

Las primeras sospechas del poder cancerígeno de las aminas aromáticas se produjeron en 1895, cuando se diagnosticaron casos de cáncer de vejiga entre los trabajadores del sector de los tintes, en Suiza (Rehn, 1895). Una serie de estudios epidemiológicos y estudios sobre las aminas, concluyeron que las aminas aromáticas eran cancerígenas (*Second Annual Report on Carcinogenesis*, 1981; *International Agency for Research on Cancer*, 1974; *International Agency for Research on Cancer*, 1978). El efecto cancerígeno de estos compuestos está relacionado con cambios en el ADN que originan la formación de tumores. Se cree que son los productos resultantes de la reacción metabólica de las aminas aromáticas, y no éstas, los que dañan el ADN. Estos productos de reacción son electrofílicos y forman enlaces covalentes con las bases de los ácidos nucleicos del ADN. Miller (1978) propuso el siguiente mecanismo de reacción en el cual ArNH<sub>2</sub> es la amina aromática:



Esta secuencia de reacción implica que factores estructurales en la amina aromática favorezcan la formación de cationes, por ello, el tipo de anillo aromático, posición del grupo amino, presencia y posición de otros sustituyentes, son factores de consideración en el poder cancerígeno de las aminas aromáticas.

En la actualidad, diferentes productos textiles, artículos de cuero, pieles, papeles, cartones, aceites minerales y utensilios de pintura son susceptibles de contener tintes azo. La exposición de los consumidores a los tintes azo puede tener lugar solamente si el tinte o pigmento se transfiere desde el sustrato hacia la piel humana. Los niños tienen más riesgo de exposición, ya que pueden chupar productos teñidos y la velocidad de absorción oral del tinte es mayor que la cutánea. Hay que tener en cuenta que las aminas aromáticas pueden estar presentes en pequeñas cantidades en el producto teñido, ya que, la síntesis del tinte no es completa al 100%, o bien, debido a procesos aislados de degradación durante el procesado.

Pero aunque no se produzca la ingestión directa de las aminas aromáticas, la ingestión de los tintes azo es igualmente peligrosa, dado que pueden ser reducidos por bacterias de la flora intestinal, generándose aminas aromáticas.

Los tintes azo fueron muy empleados como colorantes en alimentos tales como refrescos, caramelos, perritos calientes, helados y cereales, y en drogas o cosméticos. A principios de los años setenta se usaban, aproximadamente, 68 000 toneladas al año del tinte azo Amaranth en unos 60 países en todo el mundo (Collins y McLaughlin, 1972), estimándose que en América el consumo anual por persona de estos tintes era próximo a 2 kg (Westoo, 1965).

Dado que el cáncer de intestino era más común en sociedades altamente industrializadas (Berg *et al.*, 1973; Berg *et al.*, 1974; Wynder y Ready, 1974), se investigó la posible conexión entre estos tumores y el uso de tintes (Wolff y Oehme, 1974). Se encontró que varios tintes eran tóxicos en animales, por ejemplo, el Amaranth era tóxico para los fetos de rata (Collins y McLaughlin, 1973; Collins *et al.*, 1975; Collins *et al.*, 1975b) y cancerígeno para las ratas (Daniel, 1962). Los tintes azo son degradados por las bacterias del intestino *in vivo* (Jones *et al.*, 1964; Roxon *et al.*, 1967; Larsen *et al.*, 1976) y es posible que los efectos tóxicos y/o cancerígenos en el intestino sean debidos a sus productos de degradación. Por ejemplo, el 1-amino-2-naftol, generado en la reducción del Orange II (C.I. Acid Orange 7) induce a tumores en la vejiga (Bonser *et al.*, 1956; Chung *et al.*, 1975). Estudios encaminados a identificar las especies bacterianas responsables de la reducción y degradación de los tintes azo concluyeron que se trataba de enterobacterias facultativas anaerobias, que constituían una pequeña parte de la microflora intestinal (Roxon *et al.*, 1966; Roxon *et al.*, 1967b; Sheline *et al.*, 1970; Walker *et al.*, 1971).

Los tintes azo ingeridos no se absorben en el intestino delgado y son metabolizados por las bacterias intestinales en el colon. Los metabolitos pueden ser excretados con las heces o pueden ser absorbidos en el sistema circulatorio y ser excretados con la orina (Ryan *et al.*, 1968).

Entre 120 y 150 de los más de 2 000 tintes usados corrientemente, son enormemente susceptibles de causar cáncer. Los tintes basados en derivados de benzidina y

diazobenzidina parecen ser los mayores causantes de cáncer de entre todos ellos (Feasold *et al.*, 1999).

Las aminas aromáticas también pueden causar procesos irritativos en ojos y piel. En la Tabla 1.9 se recoge la recopilación de los efectos causados por algunas aminas aromáticas.

Entre 1997 y 1998 la Agencia Federal de Medio Ambiente de Austria investigó la presencia de tintes azo en artículos de cuero, lana, felpa y telas. En este país, una ordenanza de Enero de 1999 penaliza la producción de objetos que contuviesen tintes o pigmentos azo, cuyo contenido en alguna de las 20 arilaminas especificadas en la Ley, excediese la concentración de  $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Las investigaciones concluyeron que en el 6% de los productos analizados, el contenido de arilaminas sobrepasaba dicho límite. (Feasold *et al.*, 1999).

En Alemania también ha sido penalizado recientemente el empleo de algunos tintes azo por su uso en prendas textiles que están en contacto con el cuerpo y el carácter cancerígeno de las aminas generadas en su degradación (O'Neill *et al.*, 1999). De todos modos, tintes azo *Acid* o *Direct* que pueden liberar aminas tales como bencidina, *o*-rolidina y *o*-dianisidina, todavía se usan (Oh *et al.*, 1997).

### **1.3.3. Aguas residuales coloreadas: Generalidades y estrategias de tratamiento**

En 1978 se estimó que un 2% de las 450 000 toneladas de los tintes producidos a escala mundial, se descargaban en los efluentes generados en los procesos de producción, mientras que el 9% era descargado en efluentes generados en industrias de tinción. Estas cantidades suman un total de 50 000 toneladas (O'Neill *et al.*, 1999).

**Tabla 1.9.** Efectos provocados en la sangre, hígado y vejiga, por la administración crónica a perros de aminas primarias.

	Formación de metemoglobina	Toxicidad y/o cáncer (hígado)	Cáncer de vejiga
4-Aminobifenil (Benner y Stevenson, 1952; Kaufmann <i>et al.</i> , 1966; Desai, 1981; Desai, 1981b)	+++	-	+++
2-naftilamina (Denton, 1967; Henderson y Sutherland, 1910; Petrov y Prosvirkina, 1956)	+	-	++
1-naftilamina (Radonski, 1979; Roth y Lepke, 1972; Bauman y Brown, 1959)	-	-	-
Bencidina (Benner y Stevenson, 1952; Hamilton y Spiegler, 1964; <i>Japan Dyestuff Industry Assn.</i> , 1982)	-	-	+
Anilina (a) (Pelster <i>et al.</i> , 1965; Pelster <i>et al.</i> , 1967; <i>Japan Dyestuff Industry Assn.</i> , 1982; <i>United Sates International trade Comission</i> , 1984b)	++	-	-
Diclorobencidina (Denton y Hammond, 1967; Cimerol <i>et al.</i> , 1965; Desai, 1981; Desai, 1981b)	-	+	++
Metilendiamina (Day y Peters, 1967; Iqbal, 1976; Oster, 1961)	-	+++	+ -
4,4-metileno-bis (2-cloroamina) (Baessler y Mayer, 1973; Wilfong, 1972; <i>United Sates International trade Comission</i> , 1984)	-	++	++
4,4-metileno-bis (2-metilamina) (Bohm y Wissner, 1971; Bhutani, 1976; Albright <i>et al.</i> , 1967)	-	++	-
Anilina (b) (Stroh <i>et al.</i> , 1957; Tsutsumi y Terade, 1951; <i>United Sates International trade Comission</i> , 1984; <i>Colour Index</i> , 1971)	-	+ -	+
4-aminobifenilamina (Baessler y Mayer, 1973; Cogswell, 1984; <i>Colour Index</i> , 1971)	-	++	+ -

La composición de los efluentes textiles varía en función del producto, ya que los tintes se clasifican en función de la naturaleza del producto a teñir. También hay otros factores a tener en cuenta, como las tendencias de la moda, por ejemplo, la moda de los tejanos negros originó en una factoría de Bélgica efluentes altamente coloreados, muy difíciles de tratar (O'Neill *et al.*, 1999). También hay que tener en cuenta factores económicos y técnicos para la elección de los tintes a emplear ya que, en la industria textil moderna los tintes deben de ser resistentes a los agentes químicos, a la luz y a todas aquellas sustancias comunes con las que se ponen en contacto (agua, jabones, detergentes, etc.) para mantener así su estructura y color.

Así pues, el esfuerzo por conseguir una mayor conservación del colorante sobre el sustrato textil redundará en un mayor problema del tratamiento de los efluentes textiles. Este problema se agudiza en los tintes reactivos, ya que contienen grupos capaces de reaccionar con las fibras para formar enlaces covalentes colorante-fibra. Estos tintes se aplican fundamentalmente a fibras celulósicas, esencialmente algodón y rayón. Los principales tipos de contaminación identificados en aguas residuales textiles se muestran en la Tabla 1.10.

La presencia de pequeñas cantidades de tinte en el agua (menos de 1 ppm en algunos casos) es visible y afecta a la transparencia del agua y a la solubilidad de gases en ríos y lagos (Bant, 1996). Los tintes presentan poca toxicidad para los mamíferos y organismos acuáticos (Churchley, 1998). Clark y Anliker (1984) estudiaron la  $LC_{50}$  para los peces de unos 3 000 colorantes, encontrando que sólo en un 2% de éstos era inferior a  $1,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , mientras que un 96% tenía una  $LC_{50}$  de  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . El ojo puede detectar concentraciones de  $5 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de tintes reactivos en agua (Shelley, 1994; Wilmott *et al.*, 1998; Pierce, 1994). Por ello, las normas sobre niveles de vertido de aguas coloreadas se aplican más por razones estéticas que por la prevención de efectos tóxicos (O'Neill *et al.*, 1999). De todos modos, hay que tener en cuenta que la presencia de tintes en cauces de ríos dificulta la llegada de la luz a las zonas más profundas, repercutiendo en las especies acuáticas que las habitan.

**Tabla 1.10.** Principales efectos contaminantes de las aguas residuales coloreadas (Correia *et al.*, 1994; Sharma, 1989).

Contaminantes	Naturaleza química	Principales procesos de origen	Principal impacto en procesos de tratamiento biológico
Carga Orgánica	Hidratos de carbono, enzimas, grasas, aceites lubricantes, ceras, agentes revestidores	Desalado, Restriegue, Lavado	Alta demanda en sistemas de aireación. Problemas de bulking en lodos activos.
	Ácido acético	Tinción	
Color	Tintes, impurezas de lana restregada	Tinción, Restriegue	Conversión insuficiente en bioreactores.
Nutrientes (N, P)	Sales de amonio, urea, tampones fosfato y secuestrantes	Tinción	En sistemas anaerobios no se convierten. Incremento de la complejidad y sensibilidad en los procesos aerobios (requerimientos de eliminación biológica de nutrientes).
	Efectos de pH y sales	NaOH, ácidos minerales/orgánicos; cloruro de sodio, silicatos, sulfitos, carbonato	Restriegue, Desalado, blanqueo, Mercerizado, Tinción, Reutralización
Azufre	Sulfato, sulfito e hidrosulfito, ácido sulfúrico	Tinción	Reducción de sulfato en reactores anaerobios.
Tóxicos	Metales pesados, agentes reductores (sulfuro), agentes oxidantes (cromato, peróxido, dicromato, persulfato), biocidas, sales de amonio cuaternario	Desalado, blanqueo, Tinción, Acabado	Inhibición de grupos microbianos sensibles, (nitrificantes, metanogénicos) en bioreactores.
Compuestos orgánicos refractarios	Revestimientos, tintes, resinas, saladores sintéticos (pVA), organoclorados, disolventes orgánicos	Restriegue, Desalado, Blanqueo, Tinción, Lavado, Acabado	Conversión insuficiente en bioreactores. Posible acumulación en agregados/películas de biomasa, llegando hasta la inhibición



La Agencia Medioambiental del Reino Unido, para prevenir los vertidos de efluentes coloreados en sus ríos, definió unos Estándares de Calidad Ambiental que delimitan las concentraciones que no se deben sobrepasar aguas abajo del punto de vertido. Estos estándares se expresan como absorbancia por longitud de onda. Las longitudes de onda consideradas están entre los 400 y 700 nm a intervalos de 50 nm. El límite de color permitido en un vertido se calcula por la ecuación 1.3 (*Environment Agency, Cardiff, UK perscomm, 1998*).

$$C_d = \frac{(C_s \cdot F_t) - (C_u \cdot F_u)}{F_d} \quad [1.3]$$

Siendo:

- $C_d$  Color límite de vertido (absorbancia·cm<sup>-1</sup>).
- $C_s$  Color estándar del cauce (absorbancia·cm<sup>-1</sup>).
- $C_u$  Color natural del cauce aguas arriba del punto de vertido (absorbancia·cm<sup>-1</sup>).
- $F_d$  Caudal de vertido (ML·d<sup>-1</sup>).
- $F_t$  Caudal total del río corrientes abajo del punto de vertido (ML·d<sup>-1</sup>).
- $F_u$  95% del caudal del río aguas arriba del punto de vertido.

A pesar de que algunos investigadores han usado aguas textiles artificiales para el desarrollo de métodos de tratamiento, la concentración de los tintes empleados varía entre 0,01 y 7 g·L<sup>-1</sup> (O'Neill *et al.*, 1999). Esta variabilidad se debe a que es difícil encontrar información actual acerca de las concentraciones de tintes en aguas residuales y a que el contenido de tintes en los efluentes depende del tipo de tinte empleado (Tabla 1.11). El uso de la absorbancia o de la medida ADMI (*American Dye Manufacturers Institute*) es más adecuado para describir los efluentes textiles en términos de carga contaminante. De todos modos, si se habla de distintos tintes,

no hay correlación directa entre los valores de absorbancia y sus concentraciones, ya que cada tinte tiene distintos máximos de absorbancia.

Las aguas residuales generadas en los procesos de tinción de fibras naturales (a excepción de las generadas en la tinción de lana) suelen ser muy variables, si bien poseen un bajo contenido en materiales coloidales y en suspensión, suelen ser pobres en nutrientes, especialmente en nitrógeno y su carga orgánica suele aproximarse al doble de la que posee un agua residual urbana (Gutiérrez y Crespi, 1999).

**Tabla 1.11.** Estimación del grado de fijación de distintos tipos de tintes al sustrato de aplicación y pérdidas en el efluente (Easton, 1995).

<b>Tipo de tinte</b>	<b>Fibra</b>	<b>Grado de fijación (%)</b>	<b>Pérdidas con el efluente (%)</b>
<i>Acid</i>	Poliamida	89-95	5-20
<i>Basic</i>	Acrílico	95-100	0-5
<i>Direct</i>	Celulosa	70-95	5-30
<i>Disperse</i>	Poliéster	90-100	0-10
<i>Metal-Complex</i>	Lana	90-98	2-10
<i>Reactive</i>	Celulosa	50-90	10-50
<i>Sulfur</i>	Celulosa	50-90	10-40
<i>Vat</i>	Celulosa	80-95	5-20

### **Métodos de tratamiento físico-químicos**

El método más usado para el tratamiento de estos efluentes es el de coagulación-floculación, si bien, además de una elevada generación de fangos, el nivel de eliminación de DQO y DBO no suele superar el 75-80% (Gutiérrez y Crespi, 1999).

De entre los métodos no biológicos para eliminar el color de los efluentes coloreados destacan la absorción con carbono activo, la filtración con membranas, la

decoloración con ozono, los métodos de coagulación-floculación y las técnicas electroquímicas (Cooper, 1993).

La adsorción con carbón activo tiene el inconveniente de que el carbón granular es caro y la rentabilidad de este tratamiento está ligada a una reutilización elevada de este material. La desorción de las moléculas de colorante es muy difícil, por lo que hay que pirolizarlas, incrementándose así el coste del tratamiento. Una variante más económica cuando la coloración no es excesiva y el floculo biológico está bien formado, es añadir carbón activo en polvo al reactor biológico. El carbón activo se quedaría retenido con el floculo biológico en la fase de decantación. La diferencia de coste es de 0,09-0,11 €m<sup>-3</sup> frente a los 0,45-0,60 €m<sup>-3</sup> cuando se emplea carbono granular (Crespi *et al.*, 1986).

Con respecto a los tratamientos con membranas, Schafer *et al.* (1988) obtuvieron una eliminación de color del 99% y de DQO y COT del 90% con nanofiltración. También se pueden coseguir buenos niveles de decoloración con ultrafiltración empleando agentes tensoactivos (Soma *et al.*, 1988). Debe elegirse correctamente el tamaño de poro en función del tamaño de las moléculas a retener ya que, en caso contrario la limpieza de las membranas es complicada. Además de ser un método caro, su principal problema es que al finalizar la operación se obtiene un nuevo efluente coloreado, con menor volumen pero mayor concentración, que hay que tratar (Gutiérrez y Crespi, 1999).

La oxidación con ozono (puede estar inducida por radiación UV o catálisis) es un método rápido y eficaz para varios tipos de tintes, especialmente los *Reactive* (Strickland y Perkins, 1995). La ozonización puede incrementar la biodegradabilidad de los efluentes textiles (Langley y Leist, 1994), aunque esto depende del tipo de efluente porque en otros casos también puede hacerlos más tóxicos (Hill y Anderson, 1995). Para grandes volúmenes de efluente resulta un tratamiento caro.

Los tratamientos de coagulación-floculación dan buenos resultados cuando se emplean como tratamiento terciario, después del sistema biológico. Si se realiza antes de la etapa biológica, la cantidad de coagulante a adicionar debe ser mayor y una elevada concentración de polielectrolito puede causar problemas en los procesos

de desnitrificación (Gutiérrez y Crespi, 1999). Juhera y Ferre (1993) idearon un sistema basado en una coagulación-floculación, seguida de un paso a través de un filtro de arena y carbón, requiriéndose una segregación previa de los efluentes muy coloreados o tóxicos. El grupo *Archaeus Technology (Removing Colour from dyehouse efflents*, 1993) desarrolló un sistema con un adsorbente que es un polielectrolito orgánico, provisto de un dispositivo de regeneración automático. Es apropiado para tintes *Reactive* solubles, *Acid*, *Direct* y premetalizados. La empresa *Courtalds Textiles*, en su planta de Leicester, emplea desde 1995 un sistema basado en una combinación de adsorción y coagulación (Reid, 1996). El adsorbente es un polímero orgánico denominado *Macrosorb*. El 50% del agua tratada es reutilizada.

Las técnicas electroquímicas se basan en la electrolisis de las moléculas orgánicas, aunque, para no tener un consumo de energía demasiado elevado, sólo se efectúa una oxidación parcial de las moléculas. Se trata de procesos limpios, que operan a baja temperatura y que, en la mayoría de los casos, no necesitan la adición de productos químicos (Ochoa, 1995). La decoloración se obtiene por eletroxidación con ánodos no solubles o por electrocoagulación con ánodos solubles, en los que los hidróxidos del metal resultantes adsorben el tinte (Gutiérrez y Crespi, 1999).

### **Métodos de tratamiento biológicos**

En los últimos años se han producido una gran proliferación de estudios de investigación en el tratamiento biológico de los tintes industriales, bien con complejos efluentes reales o con tintes específicos, para determinar cómo reaccionan a determinados tratamientos. De estos trabajos se han derivado numerosas publicaciones de decoloración de tintes industriales, tanto con hongos como con bacterias.

#### ***Procesos con hongos***

Los primeros trabajos con empleo de hongos para decolorar aguas residuales se produjeron con aguas residuales generadas en procesos de fabricación de pulpa y papel. Los hongos empleados fueron *Phanerochate Chrysosporium* y *Tinctorpora sp.* (Eaton *et al.*, 1980; Fukuzumi, 1980). Con *Phanerochate Chrysosporium*

también se consiguió decolorar tintes poliméricos tales como el Polimeric B-411, Polimeric R-481, y Polimeric Y-606 (Glen y Gold, 1983). La primera publicación de decoloración de tintes azo mediante hongos ligninolíticos apareció en 1990 (Cripps *et al.*, 1990), cuando cultivos de *Phanerochate Chrysosporium*, en presencia de oxígeno y bajo condiciones de limitación de nitrógeno, decoloraron los tintes *Acid Orange 7*, *Acid Orange 6* y *Direct Red 28*. La capacidad de ciertas especies de hongos para degradar tintes azo está relacionada con la síntesis de enzimas extracelulares tales como lignina y manganeso peroxidasas o lactasas (Chivukula y Renganathan, 1995; Helingfing *et al.*, 1998; Klim y Shoda, 1999; Schliephake *et al.*, 2000).

La lignina y manganeso peroxidasa tienen un mecanismo de actuación similar; durante el ciclo catabólico, el  $H_2O_2$  las oxida y éstas, a su vez, oxidan el compuesto (tinte azo) en dos etapas consecutivas de transferencia de electrones. Mientras que las lignina peroxidasas oxidan compuestos aromáticos no fenólicos, en las manganeso peroxidasas se oxida el  $Mn^{+2}$  a  $Mn^{+3}$  y éste es capaz de oxidar diversas estructuras fenólicas. Las lacasas son enzimas que contienen cobre y son sintetizadas por plantas y hongos. Estas enzimas también son capaces de oxidar fenoles y aminas, en presencia de oxígeno (Barr y Aust, 1994; Glenn *et al.*, 1986; Thurston, 1994).

### ***Procesos bacterianos***

Tradicionalmente, el tratamiento de efluentes coloreados en sistemas convencionales de lodos activos no es demasiado efectivo y, en la mayoría de los casos, cuando se consigue eliminar color, es por fenómenos de adsorción del tinte sobre el lodo. Pagga y Brown (1986) estudiaron la biodegradabilidad aerobia de 87 tintes, simulando las condiciones de una planta de tratamiento de aguas residuales de lodos activos, concluyendo que era improbable la degradación de éstos en dichas condiciones y que el principal mecanismo para eliminar el color era por adsorción sobre el lodo. Glenn *et al.* (1991) emplearon una planta piloto de lodos activos para estudiar la biodegradabilidad de 18 tintes azo, de los cuales 3 fueron aparentemente biodegradados, 4 se adsorbieron en gran medida sobre el lodo y 11 permanecieron sin alterarse. La adsorción de tintes en una unidad de lodos activos también se ha

planteado como una alternativa para la eliminación del color en aguas residuales. Pagga y Klaus (1994) desarrollaron un método para estimar la posibilidad de adsorción de un tinte en un sistema de lodos activos. Más recientemente, se han publicado varios trabajos sobre decoloración de tintes azo (*Acid Orange 7*, *Acid Red 88*, *Acid Red 4*, *Acid Orange 8*) en condiciones aerobias, por procesos reductivos y en presencia de otras fuentes adicionales de carbono (Coughlin *et al.*, 1997, 1999; Dykes *et al.*, 1994; Jiang y Bishop, 1994; Sugiura *et al.*, 1999). También hay referencias acerca de la reducción aerobia de tintes azo que son usados como única fuente de carbono y energía por las bacterias (Dykes *et al.*, 1994; Yatome *et al.*, 1993). De todos modos, hay muy pocos trabajos que demuestren fehacientemente que las bacterias utilizan el tinte azo como única fuente de carbono y energía, en condiciones aerobias. El mecanismo de reducción aerobia de tintes azo requiere la presencia de enzimas (“azoreductasas aerobias”) que catalicen la reducción en presencia de oxígeno molecular. Estos enzimas fueron purificados y caracterizados para dos cultivos distintos (Zimmermann *et al.*, 1982, 1984) y usaban el NADH como cofactor.

Los mayores esfuerzos investigadores en el tratamiento biológico de los tintes sintéticos (especialmente los azo) se han dirigido hacia los tratamientos bacterianos en condiciones anaerobias. Los primeros estudios en este campo se dirigieron hacia las bacterias presentes en el intestino de los humanos, que participaban en el metabolismo de los tintes azo, ingeridos en los alimentos (Chung *et al.*, 1978, 1992; Brown, 1981), y hacia los mecanismos implicados en la reducción de los tintes azo (Hernández *et al.*, 1967a, 1967b; Gingell y Walker, 1971).

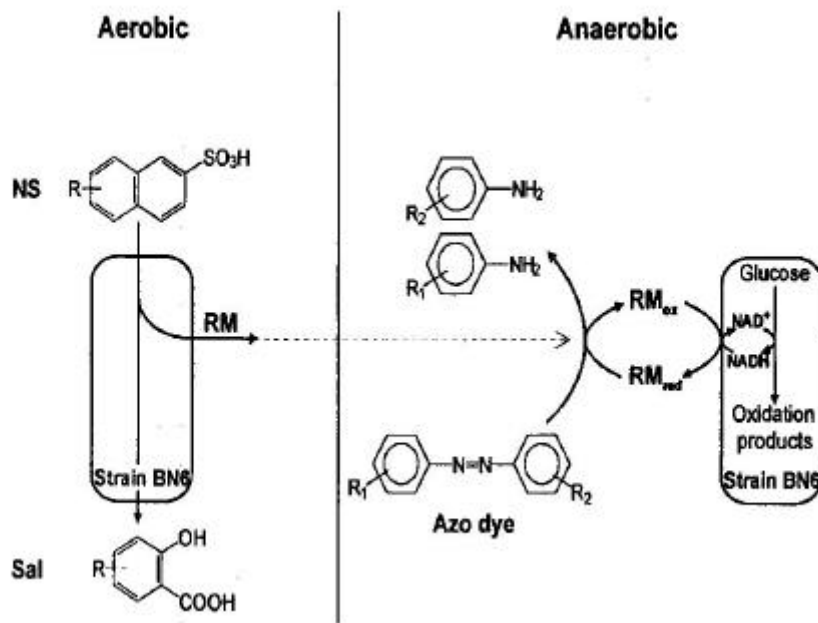
El carácter no específico de la reducción de los tintes azo en condiciones anaerobias ha sido corroborado por diversos investigadores (Brown y Laboureur, 1983; Carliell *et al.*, 1994; Ganesh *et al.*, 1994; Delée *et al.*, 1998; Bromley-Challenor *et al.*, 2000), lo cual parece indicar un mecanismo no enzimático. Gingell y Walker (1970) ya habían propuesto la hipótesis de una reacción final no enzimática, de oxidación-reducción, entre los flavin nucleótidos reducidos y los compuestos azo. Según este mecanismo se comprende que el oxígeno (Roxon *et al.*, 1966; Wuhrmann *et al.*,

1980) u otros compuestos aceptores de electrones, como el nitrato o nitrito (Wuhrmann *et al.*, 1980; Carliell *et al.*, 1994), inhiban la reducción de los tintes azo, ya que son más oxidantes. Recientemente se ha comprobado la capacidad de las flavinas reductasas para actuar como azoreductasas *in vitro* (Rush, 2000).

El hecho de que con extracto celular se alcancen mayores velocidades de reducción de los tintes azo (Walker, 1970; Wuhrmann *et al.*, 1980; Mechsner y Wuhrmann, 1982) ha sido explicado tradicionalmente en base a la baja permeabilidad de la membrana celular a compuestos azo con grupos sulfónicos, altamente polares, lo cual implica un mecanismo de reducción intracelular. Sin embargo, Brown (1981), usando diversos cultivos, demostró que la velocidad de reducción de tintes azo poliméricos era similar a la de otros análogos de menor peso molecular, con lo cual concluyó que la reducción de los tintes azo era un proceso extracelular ya que, era improbable que los compuestos poliméricos atravesaran la membrana celular. Este postulado está en concordancia con otros que responsabilizan a pequeñas moléculas transportadoras de electrones, generadas enzimáticamente (como las flavinas reducidas) y que atraviesan la membrana celular, de la reducción de los tintes azo (Gingell y Walker, 1971; Bronsted y Kopecek, 1992). Otros estudios avalan la teoría de la reducción extracelular ya que, la adición de transportadores de electrones, tales como FAM y FADH (Gingell y Walker, 1971; Chung *et al.*, 1978; Raffi *et al.*, 1990) o bencil viologen (Chung *et al.*, 1978; Bragger *et al.*, 1997) aceleran la reducción de los compuestos azo, incluso con extracto celular.

También hay otros compuestos, no generados enzimáticamente, que añadidos al medio de reacción incrementan la velocidad de reducción. Así Keck *et al.* (1997), tras comprobar el incremento en la velocidad de reducción de los tintes azo al añadir quinonas (resultante de la degradación aerobia del 2-naftalenosulfonato con cultivos de *Sphingomonas xenopaga* BN6) concluyeron que las quinonas se reducían enzimáticamente y, mediante una reacción química de oxidación-reducción, reducían el tinte azo (Fig. 1.5). Posteriormente, se comprobó que la actividad quinona-reductasa residía en la membrana celular de las células del cultivo empleado (*Sphingomonas xenopaga* BN6) y, por lo tanto, ni el tinte ni las quinonas tenían que

entrar en la célula (Kudlich *et al.*, 1997). El papel de los sistemas enzimáticos de la membrana (como la NAD(P)H citocromo reductasa o el sistema citocromo P<sub>450</sub>) en la reducción de los tintes azo ya había sido apuntado anteriormente (Brown y de Vito, 1993; Zbaida, 1995; Hernández *et al.*, 1967a, 1967b).

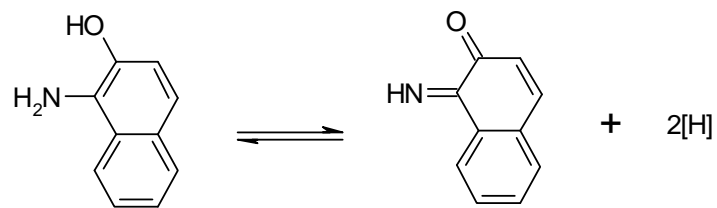


**Figura 1.5.** Mecanismo propuesto para explicar el papel del transferidor de equivalentes redox (RM) en la reducción de los compuestos azo empleando el cultivo BN6 (Figura tomada de Keck *et al.*, 1997).

Van der Zee *et al.* (2000) encontraron que el 1-amino-2-naftol generado en la reducción del *Acid Orange 7*, catalizaba la reducción de dicho tinte azo, posiblemente debido a la formación de la aminoquinona correspondiente (Fig 1.6).

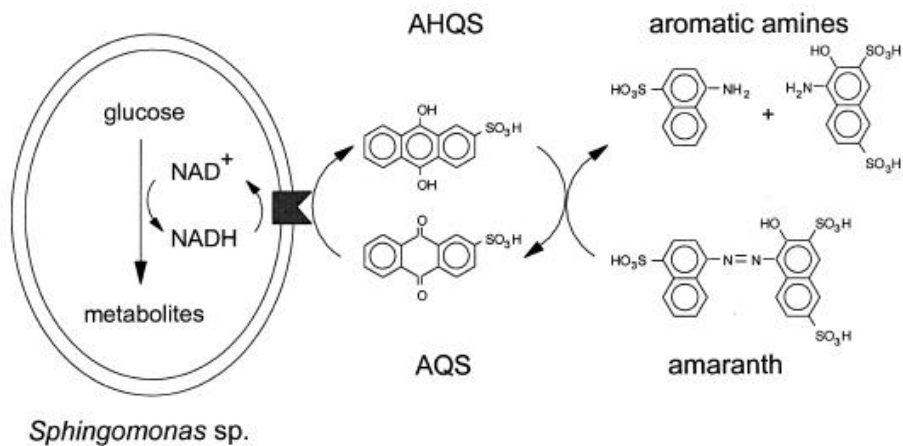


También se comprobó que la adición de una antraquinona incrementaba varios órdenes de magnitud la velocidad de reducción del *Acid Orange 7* con sulfuro (Van der Zee *et al.*, 2000) y en un bioreactor anaerobio (Cervantes *et al.*, 2001). El mecanismo propuesto por Field *et al.* (2000) para explicar el incremento en la velocidad de degradación de los tintes azo en presencia de quinonas (Fig. 1.7) es similar al propuesto por Keck *et al.*(1997).



**Figura 1.6.** Reacción de equilibrio entre el 1-amino-2-naftol y su aminoquinona (Figura tomada de Van der Zee *et al.*, 2000).

De los distintos tratamientos biológicos disponibles para el tratamiento de efluentes coloreados, el tratamiento bacteriano anaerobio parece el más apropiado, tanto por aspectos operacionales, como de eficacia. En los últimos años se han llevado a cabo numerosos estudios, con tintes muy diversos, que han sido decolorados con bacterias en condiciones anaerobias, especialmente tintes azo (Tabla 1.12).



**Figura 1.7.** Mecanismo que explica el papel de la antraquinona AQS como aceleradora de la velocidad de reducción de los tintes azo (Figura tomada de Field *et al.*, 2000).

El principal problema del tratamiento anaerobio de los tintes azo es la generación de aminas aromáticas. La mayoría de estas aminas no son degradables en condiciones anaerobias por lo que, si además de la decoloración se desea alcanzar la mineralización de los tintes, hay que recurrir a procesos secuenciales o simultáneos anaerobio-aerobio, ya que las aminas aromáticas pueden ser degradadas en condiciones aerobias y con esta secuencia se puede alcanzar la mineralización del tinte azo (Haugh *et al.*, 1991). Los procesos simultáneos anaerobio-aerobio se llevan a cabo en un mismo sistema en el que hay partes anaerobias y otras aerobias. Diversos investigadores han desarrollado este tipo de sistemas consiguiendo resultados satisfactorios (Kudlich *et al.*, 1996; Tan *et al.*, 1999a, 1999b).

**Tabla 1.12.** Resultados obtenidos para determinados tintes reactivos incubados anaeróbicamente con una fuente de carbono suplementaria (Carliell *et al.*, 1994).

	<b>Clasificación química</b>	<b>Decoloración (%)</b>	<b>Tiempo necesario (h)</b>
<b>Tintes <i>Reactive</i> en polvo</b>			
<i>C.I. Reactive Yellow 16</i>	Azo	80-90	6.5
<i>C.I. Reactive Red 198<sup>a</sup></i>	Azo	85-90	2
<i>C.I. Reactive Red 41</i>	Azo	89-90	4.5
<i>C.I. Reactive Blue 38</i>	Ftalocianina	40	4.5
<i>C.I. Reactive Blue 21</i>	Ftalocianina	85-90	4.5
<i>C.I. Reactive Blue 220</i>	Azo	90-95	1
<i>C.I. Reactive Black 5</i>	Azo	80-85	4.5
<b>Disoluciones de tinte <i>Reactive</i></b>			
<i>C.I. Reactive Yellow 95</i>	Azo	0	-
<i>C.I. Reactive Orange 12</i>	Azo	90-95	23
<i>C.I. Reactive Red 218</i>	Azo	90-95	32
<i>C.I. Reactive Red 24</i>	Azo	90-97	32
<i>C.I. Reactive Orange 13</i>	Azo	85-90	50
* <i>C.I. Reactive brown 11</i>	Azo	90	23
Blue PB	complejo metálico	98	2
<i>C.I. Reactive Blue 49</i>	Antraquinona	7-10	2
<i>C.I. Reactive Black 39</i>	Azo	70-75	2.5
*Black SG	complejo metálico	75-80	7.5
<i>C.I. Reactive Blue 72</i>	Ftalocianina	25-30	50
* Sin n° C.I. disponible			

## 1.4. Referencias

- Akbar-Khanzadeh F., Vaquerano M.U., Akbar-Khanzadeh M. And Bisesi M.S. (1994). Formaldehyde exposure, acute pulmonary response, and exposure control in a gross anatomy laboratory. *American Journal of Industrial Medicine*, **26**, 61-75.
- Albright L.F. *et al.* (1967). *Chemical Engineering*, **74**, 197-202, 251-256.
- American Chemical Society (1996). Facts and figures for the chemical industry. *Chemical & Engineering News*. June, **24**, 74.
- Baessler, K. and Mayer, K.M. (1973). *FabwerkeHoechst AG*, US 3761425.
- Ballenger J.J. (1984). Some effects of formaldehyde on the upper respiratory tract. *Laryngoscop.*, **94**, 1411-1413.
- Bannink H.F. and Muller F.M. (1951). On the sensitivity of methane fermentation of calcium acetate towards some toxic substances. *Antonie van Leeuwenhoek*, **17**, 171-182.
- Bant I.M., Nigam P., Singh D. and Marchant R. (1996). Microbial decolorization of textile-dye containing effluents: A review. *Bioresource Technology*, **58**, 217-227.
- Bauman R.G. and Brown J.W. (1959). *Journal of Applied Polymer Science*, **1**, 351.
- Benner R.G. and Stevenson A.C. (1952). *Du Pont*, US 2619503.
- Berg J.W. and Howell M.A. (1974). The geographic pathology of bowel cancer. *Cancer*, **34**, 807-814.
- Berg J.W., Haenszel W. and De Vesa S.S. (1973). Epidemiology of gastrointestinal cancer. *In Proceedings of the Seventh National Cancer Conference*, 459-464. J.B. Lipincott, Philadelphia.
- Berstein R., Stayner I., Elliott L., Kimbrough, R., Falk H. and Blade I. (1984). Inhalation exposure to Formaldehyde. An overview of its toxicology,

epidemiology monitoring and control. *American Industrial Hygiene Association Journal*, **45**, 778-785.

Bhutani S.K. (1976). *Olin Corp.*, US 3935264.

Bohm W. and Wissner A. (1971). Bayer DE-OS1643379.

Bonser G.M., Bradshaw L., Clayson D.B. and Jull J.W. (1956). A further study on the carcinogenic properties of ortho-hydroxyamines and related compounds by bladder implantation in the mouse. *British Journal of Cancer*, **10**, 539-546

Bragger J.L., Lloyd A.W., Soozandehfar S.H., Bloomheld S.F. Marriott C. and Martin G.P. (1997). Investigation into the azo reducing activity of a common colonic microorganism. *International Journal of Pharmaceutics*, **157**, 61-71.

Bromley-Challenor K.C.A., Knapp Zhang Z., Gray N.C.C., Hetheridge M.J., and Evans M.J. (2000). Decolorization of an azo dye by unacclimated activated sludge under anaerobic conditions. *Water Research*, **24**, 4410-4418.

Brown D. and Laboureur P. (1983<sup>a</sup>). The degradation of dyestuffs. Part I Primary biodegradation under anaerobic conditions. *Chemosphere*, **12**, 397-404.

Brown J. (1981). Reduction of polymeric azo and nitro dyes by intestinal bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **41**, 1282-1286.

Carliell C.M., Barclay S.J., Naidoo N., Buckley C.A., Mulhland D.A. and Senior E. (1995). Microbial decolourisation of a reactive azo dye under anaerobic conditions. *Water SA*, **21**, 1, 61-69.

Cassebaum H. (1957). Die Konstitution des  $\alpha$ -Dinaphthyl-Dichinhydrons. *Chem. Ber.*, **90**, 1537-1547.

Cervantes F.J., van der Zee F.P., Lettinga G. and Field J.A. (2001). Enhanced decolourisation of acid orange 7 in a continuous UAS reactor with quinones as redox mediators. *Water Science and Technology*, **44**(4), 123-128.

Charest A., Bisailon J.G., Lepine F. And Beaudet R. (1999). Removal of phenolic compounds from a petrochemical effluent with a methanogenic consortium. *Canadian Journal of Microbiology*, **45**(3), 235-241.

- Chung K.T., Fulk G.E. and Stein M.W. (1975). TryptoPhanase of fecal flora as possible factor in the etiology of colon cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, **54**, 1073-1078.
- Chung K.T., Fulk, G.E. and Egan, M. (1978). Reduction of azo dyes by intestinal anaerobes. *Applied and Environmental Microbiology*, **35**, 558-562.
- Chung K.T., Stevens S.E., and Cerniglia C.E. 1992). The reduction of azo dyes by the intestinal microflora. *Critical Reviews in Microbiology*, **18**, 175-190.
- Churchley J.H. (1998). Ozone for dye waste colour removal: four years operationat Leck STW. *International Ozone Association*, **20**, 111-120.
- Cimerol J.J., Clarck W.M. and Denton W.I. (1965). *Olin Mathieson Chem. Corp. BE* 661047.
- Clark R.P. (1985). Formaldehyde in patology departaments. *Journal of Clinical Pathology*, **30**, 339-346.
- Clarke E.A. and Anliker R. (1984). Safety in use of organic colorants: health and and safety aspects. *Review of Progress in Coloration*, **14**, 84-89.
- Cogswell S.A. (1984). *Chemical Economics Handboock*. SRI International Menlo Park, Calif. p.611. 5032K.
- Coldicon V.R., Ward J., Trieft N.M, Jansen H.E. and Smith J.H. (1983). Occupational exposure to formaldehyde in a medical center autopsy service. *Occup.*, **25**, 544-548.
- Collins T.F.X. and Mclaughin J. (1983). Technology studies on food colourings. Part II. Embryotoxicity of R salt and metabolites of amaranth (FC & Red N° 2) in rats. *Food and Cosmetics Toxicology*, **11**, 355-365.
- Collins T.F.X. and McLaughlin J.M. (1972).Technology studies on food colourings. Part 1. Embryotoxicity of Amaranth (FD & C Red No. 2) in rats. *Food and Cosmetics Toxicology*, **10**, 619-624.
- Collins T.F.X., Black T.F., Ruggles D.I: and Gray G.C. (1975b). Long-term effects dietary amarant rats. II. Effects on fectal development. *Toxicology*, **3**, 129-140.

- Collins T.F.X., Keeler H.V., Black T.N. and Ruggles, D.I. (1975). Long-term effects dietary amarant rats. I. Effects on reproduction. *Toxicology*, **3**, 115-118..
- Colour Index*, 3<sup>rd</sup> ed. Society of Dyers and Colourists. Bradford, England, and American Association of Textile Chemists and Colorists. North Carolina. United States. (1971).
- Cooper P. (1993). removing colour from dyehouse wastewaters – a critical review of the technology available. *Journal of Society of Dyers and Colourists (JSDC)*, **109**, 97-100.
- Correia V.M., Stephenson T. And Judd S.J. (1994). Characterization of textile wastewaters – a review. *Environmental Technology*, **15**, 917-929.
- Coughlin M.F., Kinkle B.K. and Bishop P.L. (1999). Degradation of azo dyes containing aminonaphtol by *Spihingomanoas sp* strain 1CX. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **23**, 311-316.
- Coughlin M.F., Kinkle B.K., Tepper A. and Bishop P.L. (1997). Characterization of aerobic azo dye-degrading bacteria and their activity in biofilms. *Water Science and Technology*, **36**, 215-220.
- Crespi M., Valdeperas M y Cegarra J. (1986). Posibilidad de reciclar las aguas residuales textiles después de un tratamiento biológico con carbono activado. *Tecnología del agua*, **25**, 45-53.
- Cripps C., Bumpus J.A. and Aust S.D. (1990). Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, **56**(4), 1114-1118.
- Daniel J.W. (1962). The excretion and metabolism of edible food colorants. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **4**, 572-594.
- Day M. and Peters Jr., A.T. (1967). *Journal of the Society of Dyers and Colourists*, **83**(4), 137-143.

- Delée W., O'Neill C., Hawkes F.R. Pinheiro H.M. (1998). Anaerobic treatment of textile effluents: a review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **73**, 323-335.
- Delfrade J.J. y Velasco J. (1995). Evaluación del formaldehído en ciertas especialidades médicas. *Prevención*, 133.
- Denton W.I. and Hammond P.D. (1967). *Olin Matieson Chem. Corp.* US 3356729.
- Desai M.N. (1981). *Trans. Saest.*, **16**,2, 77-87.
- Desai M.N. (1981b). *Chem. Abstr.*, **95**, 105208.
- Dykes G.A., Timm R.G., and von Holy A. (1994). Azoteductase activity in bacteria associated with the greening of industrial chocolate puddings. *Applied and Environmental Microbiology*, **60**, 3027-3029.
- Easton D., Chang, H.M. and Kirk T.K. (1980). Fungal decolorization of Kraft bleach plant effluent. *Tappy J.*, **63**, 103:109.
- Easton J.R. The dye maker's view. (1995). *Colour In Dyehouse Effluent*. Ed. by Cooper P. Society of Dyers and Colourists, The Alden Press, Oxford. pp. 9-21.
- Fassold E., Häusler G., Hohenblum P. and Scharf S. Azo-dyes in leather and textile goods. (Azofarbstoff in Leder und Textilien. - Deutsche Zusammenfassung) Wien, (1999. Reports; R-159).
- Fernández J.M., Méndez R. and Lema J.M. (1995) Anaerobic treatment of eucalyptus fiberboard manufacturing wastewater by a hybrid USBF lab-scale reactor. *Environmental Technology*, **15**, 677-684.
- Field J.A., Cervantes F.J., van der Zee F.P. and Lettinga G. (2000). Role of quinones in the biodegradation of priority pollutants: a review. *Water Science and Technology*, **42**(5-6), 215-222.
- Frigas E. Filley W.V. and Reed C.E. (1984). Bronchial Challenge with Formaldehyde gas: lack of bronchoconstriction in 13 patients suspected of having formaldehyde -Induced ashm. *Mayo Clinic Proceedings*, **59**, 295-299.



- Fukuzumi T. (1980). Microbial decolorization and defoaming of pulping waste liquors in lignin biodegradation. *Microbiology Chemistry and Potential Applications*. Vol. 1, ed. T. K. Jurj. T. Huguchi & H. Chang CRC Press. Boca Ratom FL, 215-230.
- Ganesh R., Boardman G.D. and Michelson, D. (1994). Fate of azo dyes in sludges. *Water Research*, **28**, 1367-1376.
- Garrido J.M., Méndez R. and Lema J.M. (2000). Treatment of wastewaters from a formaldehyde-urea adhesives. *Water Science Technology*, **42**(5-6), 293-300.
- Garrido J.M., Méndez R. and Lema J.M. (2001). Simultaneous urea hydrolysis, formaldehyde removal and denitrification in a multified upflow filter under anoxic and anaerobic conditions. *Water Research*, **35**(3), 691-698.
- Gerike P. and Gode P. (1990). Yhe degradability and inhibitorythreshold concentration of some disinfectants. *Chemosphere*, **21**, 799-812.
- Gerulis J.J. (1985). Aromatic amines: Toxicology, ocupational health, and environmental protection. Ullman´s Enciclopedia of Industrial Chemistry, A2, 50-53. Ed. Advisory Board.
- Gingell R. and Walker R. (1970). Mechanism of azo reduction by *Streptococcus faecalis*. II. The Role of Soluble Flavins. *Xenobiotica*, **1**(3), 231-239.
- Glenn J.K. and Gold M.H. (1983). Decolorization of several polimeric dyes by the lignin-degrading Basidiomycete *Phanerochate Chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, **45**, 1741-1747.
- Gottschilling L.M., Beaulieu H.J. and Melvin W.W. (1984). Monitoring of Formic Acid in Urine of Human Esposed to low levels of formaldehyde. *American Industrial Hygiene Association Journal*, **45**, 19-23.
- Grafstrom R.C., Curren R.D. Yang L.L. and Harris C.C. (1985). genotoxicity of formaldehyde in cultured human bronchial fibroblast. *Science*, **228**, 89-90.
- Gujer W. and Zehnder A.J.B. (1983). Conversion processes in anaerobic digestion. *Water Science and Technology*, **15**, 127-167.

- Gutiérrez M.C. y Crespi M. (1999). Colorantes reactivos en los efluentes textiles: nuevos tratamientos para su eliminación. *Tecnología del Agua*, **195**, 42-49.
- Halpering W.E., Goodman M., Stayner L., Elliot L.J., Keenly R.A. and Ladring P.J. (1983). Nasal cancer in a worker exposed to formaldehyde. *The Journal of the American Medical Association*, **249**, 510-512.
- Hamilton J.M. and Spiegler L. (1964). *Du Pont*. US 3127356.
- Harper S.R. and Pohland F.G. (1986). Recent developments in hydrogen management during anaerobic biological wastewater treatment. *Biotechnology and Bioengineering*, **28**, 585-602.
- Haug W., Schmidt A., Nörtemam B. and Hempel D.C., Stolz, A., Knackmuss, H.J. (1992). Mineralization of the sulfonated azo dye Mordant Yellow 3 by a 6-aminonaphtalene-2-bencenesulfonate-degrading bacterial consortium. *Applied and Environmental Microbiology*, **57**, 3144-3149.
- Henderson G.G. and Sutherland M.M.J. (1910). *J. Chem. Soc. Trans.*, **97**, 1616.
- Henze M. and Harremöes P. (1983). Anaerobic treatment of wastewater in fixed film reactors. *Water Science and Technology*, **15**, 1-101.
- Hill W.E. and Anderson R.D. (1995). Book of Papers. Proc. conf. of ATCC. Atlanta. Research Triangle Park., N.C. (USA). ATCC, 356-371.
- Hu H.Y., Goto N. and Fujie K. (1999). Concepts and methodologies to minimize pollutant discharge for zero-emission production. *Water Science and Technology*, **39**(19), 9-16.
- Imbus H.R. (1985). Clinical evaluation of patients with complains related formaldehyde exposure. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **76**, 831-840.
- INSHT (1989). El trabajo y la salud. Barcelona: Instituto Nacional de Salud e Higiene en el trabajo.
- International Agency for Research on Cancer (IARC): *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of chemicals for Man (4)*, Lyon, 1974.

- International Agency for Research on Cancer (IARC): *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of chemicals for Man (16)*, Lyon, 1978.
- Iqbal A.F.M: (1976). *Monsanto*, U.S 3944615.
- Japan Dyestuff Industry Assn. *Assn. Japan Chem.*, (1982) (April 15) 8.
- Jiang M. and Bishop P.L. (1994). Aerobic biodegradation of azo dyes in biofilms. *Water Science and Technology*, **29**, 525-530.
- Jones R., Ryan A.J. and Wright S.E. (1964). The metabolism and excretion of tartrazine in the rat, rabbit and man. *Food and Cosmetics Toxicology*, **2**, 447-452 .
- Kaufmann T. *et al.*, in W. Foerst (ed.): *Neue Methoden der präparativen organischen Chemie*, vol. 4. Verlag Chemie , Weinheim 1966, p. 62.
- Keck A., Klein J., Kudlich M., Stolz A., Knackmuss H.J. and Mattes R. (1997). Reduction of azo dyes by redox mediators originating in the naphthalenesulfonic acid degradation pathway of *Sphingomonas* sp. strain BN6. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**(9), 3684-3690.
- Kennes C., Méndez-Pampín R. and Lema J.M. (1997). Methanogenic degradation of p-cresol in batch and in continuous UASB reactor. *Water Research*, **31** ç(7), 1549-1554.
- Kirk-Ohmer. (1993). *Encyclopaedia of Chemical Technology*, Volume 8. John Wiley & Sons, New York.
- Klibum K.H., Washaw R., Boylen C.T., Johnson S.J., Scidman B., Sinclair R. and Takaro T. (1985). Pulmonary and Neurobehavioral Effects of formaldehyde Exposure. *Archives of Environmental Health*. **40**, 254-260.
- Kudlich M., Bishop P.L., Knackmuss H.J., Stolz A.(1996). Simultaneous anaerobic and aerobic degradation of the sulfonated azo dye Mordant Yellow 3 by immobilized cells from a naphthalenesulfonate-degrading mixed culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **46**, 597-603.

- Kudlich M., Keck A., Klein J., Stolz A. (1997). Localization of the Enzyme system involved in anaerobic reduction of azo dyes by *Sphingomonas* sp. Strain BN6 and effect of artificial redox mediators on the rate of azo dye reduction. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**(9), 3691-3694.
- Laidlaw R.A. Elección de las mejores colas para madera terciada. Unasyuva N° 11. Los temas ([www.fao.org](http://www.fao.org)).
- Langley J. and Leist G. (1994). Ozone treatment of textile Effluents. Book of Papers. Atlanta. Research Triangle Park., N.C. (USA). ATCC, 306-313.
- Larsen L.C., Meyer T. and Scheline R.R. (1976). Reduction of sulphonated water-soluble azo dyes by caecal microorganisms by the rat. *Acta Pharmacologica et Toxicologica*, **38**, 353-357.
- Lema J.M. and Omil F. (2001). Anaerobic treatment: A key technology for a sustainable management of wastes in Europe. *Water Science and Technology*, **44** ç(8), 133-140.
- Lu Z. and Hegeman W. (1988). Anaerobic toxicity and biodegradation of formaldehyde in batch cultures. *Water Research*, **32**, 209-215.
- Macarie H. (1999). Overview on the application of anaerobic digestion to the treatment of chemical and petrochemical wastewaters. *Proceedings of IAWQ Symposium on Waste minimisation and end of pipe treatment in chemical and petrochemical industries*. 14-18 November , Merida, Yucatan (Mexico). 405-412.
- Miller F.C. (1978). *Com. Res.*, 38, 1479.
- Neumann H.G. and Wieland E.W. (1973). *Ind. Med. Surg.*, **42**(1), 15-19.
- O'Neill C., Hawkes F.R., Hawkes D.L., Lourenzo N.D., Pinheiro, H.M. and Delée, W. (1999). Colour on textil efluentes – sources, measurement, discharge consents and and simulation: a review. *Journal of Chemical Technology aand Biotechnology*, **74**, 1009-1018.

- Ochoa G.J.R. (1995). Técnicas electroquímicas para el tratamiento de efluentes industriales. *Ingeniería Química*, **4**, 125-131.
- Oh S.W., Kang M.N., Cho C.W. and Lee M.W. (1997). Detection of carcinogenic amines from dyestuffs of dyed substrates. *Dyes and Pigments*, **33**, 119-135.
- Omil F., Méndez R. and Lema J.M. (1996). Anaerobic treatment of sea food processing wastewaters in an industrial pilot plant. *Water SA*, **22**(2), 173-181.
- Oster G. (1961). US 3014799
- Pabst R. (1987). Exposure to formaldehyde in Anatomy: an Occupational Health Hazard? *The Anatomical Record*, **219**, 109-112.
- Pagga U. and Bron D. (1986). The degradation of dyestuffs: Part II Behaviour of dyestuffs in aerobic biodegradation tests. *Chemosphere*, **15**, 479-491.
- Pagga U. and Klaus T. (1994). Development of method for adsorption of dyestuffs on activated sludge. *Water Research*, **28**(5) 101-107.
- Parker W.J., Hill E.R. and Farquhar G.J. (1993). Assessment of design and operating parameters for high rate anaerobic dechlorination of segregated Krafft mill bleach plant effluents. *Water Environmental Research*, **65**(3), 264-270.
- Parkes H.G. in C.E. Scarle (ed.): *Chemical Carcinogenesis*. American Society Monograph No 173, American Chemical Society, Washington, D.C., 1976, 462-480.
- Pearson F., Shium-Chung C. and Gautier M. (1980). Toxic inhibition of anaerobic biodegradation. *Journal of Water Pollution Control Federation*, **52**, 472-482.
- Pelster H., König C. and Putter R. (1965). Bayer, US 3417090.
- Pelster H., König C. and Putter R. (1967). FR, 1531889.
- Perkins J.L. and Klimbough J.D. (1986). Formaldehyde exposure in a gross anatomy laboratory. *Occup.Med.*, **27**, 813-815.
- Petrov G.S. and Prosvirkina V.F. (1956). *Zh. Prikl. Klim. (Moskow)*, 30, 1660.

- Pierce J. (1994). Colour in textile effluents - the origins of the problem. *Journal of the Society of Dyers and Colourists*, **110**, 131-133.
- Qu M. and Bhattarya S.K. (1997). Toxicity and biodegradation of formaldehyde in anaerobic methanogenic culture. *Biotechnology and Bioengineering*, **55**, 727-7336.
- Radonski J.L. (1979). *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **19**, 129-157.
- Rebac S., Ruskova J., Gerbens S., van Lier J.B., Stams J.M. and Lettinga G. (1995). High-rate anaerobic treatment of waste-water under psychophilic conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **80**(5), 499-506.
- Rehn L. (1895). *Arch. Klin. Chir.*, **50**, 588-600.
- Reid R. (1996). On-site colour removal at Courtaulds Textiles. *Journal of the Society of Dyers and Colourists*, **112**, 140-141.
- Removing colour from dyehouse effluents. 1993. *New Environmental International Dyer*, **5**, pp. 17 and 21.
- Roth H.J. and Lepke P. (1972). *Archives of Pharmacology, (Wenhem, Germ.)*, **305**, 159.
- Roxon J.J., Ryan A.J. and (the late) Wright S.E. (1967). Reduction of water-soluble azo dyes by intestinal bacteria. *Food and Cosmetics Toxicology*, **5**, 367-369.
- Roxon J.J., Ryan A.J. and (the late) Wright S.E. (1967b). Enzymatic reduction of tartrazine by *Proteus vulgaris* from rats. *Food and Cosmetics Toxicology*, **5**, 645-656.
- Roxon J.J., Ryan A.J. and Wright S.E. (1966). Reduction of tartrazine by a *proteus* species isolated from rats. *Food and Cosmetics Toxicology*, **4**, 419-426.
- Ryan A.J., Roxon J.J. and Sivayavirajana A. (1968). Bacterial azo reduction: a metabolic reaction in mammals. *Nature (London)*, **219**, 854-855.
- Second Annual Report on Carcinogenesis. US Dept. of Health and Human Services. US Govt. Printing Office, december 1981.

- Sharma M.A. (1989). Treatment of cotton textile mills effluent – a case study. *Colourage*, October, 15-21.
- Sharma S., Ramakrishna C., Desai J.D. and Bhatt N.M. (1994). Anaerobic biodegradation of a petrochemical waste-water using biomass support particles. *Applied Microbiology and Biotechnology*; **40**(5), 768-771.
- Sheline R.R., Nigaard R.T. and (the late) Lomberg B. (1970). Enzymatic reduction of the azo dye Acid Yellowby extracts of *Sureptococcus fecalis* isolated from rat intestine. *Food and Cosmetics Toxicology*, **8**, 55-58.
- Shelley T.R. (1993). Dye pollution clean-up by syntactical mineral. *International Dyer*, **79**, 26-31.
- Shore J. (1990). Historical development and clasification of colorants. *Colorants and Auxiliars: Organic Chemistry and Aplication Properties*, Volume 1, Colorants. Ed. by Shore J, Society of Dyers and Colurists, Bradford. pp. 1-31.
- Soma C., Sergent C. and Rumeau M. (1988). Traitement des résiduares des industries eaux d`emoblissement textiles par microfiltration tangertielle sur membranes minérales. Tesis. Montpellier, Francia.
- Speece R.E. (1996). *Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters*. Archae Press, Nashville, Tennessee.
- Strickland A.F. and Perkins W.S. (1995). Decolorization of Continuous Dyeing Wastewaters by Ozonation. *Textile Chemists and Colorists*, **27**(5), 11-15.
- Stroh R. Ebesberger J., Haberland H. and Hahn (1957). *W.Angew. Chem.*, **69**, 124.
- Sugiura W., Miyashia T., Yokoyama T. and Arai M. (1999). Isolation of azo dye degrading microorganisms and their application to white discharge printing of fabric. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **88**, 577-581
- Tan N.C.G., Opsteeg J.L., Lettinga G. and Field J.A. (1999b). Integrated anaerobic/aerobic EGSB reactor for azo dye degradation. Alleman B.C. and Lesson A. (Eds.). vol. 5 (7). Battelle Press. Columbus Richland, 253-258.

- Tan NCG., Prenafeta-Boldu F.X., Opesteeg J.L., Lettinga G. , Field J.A. (1999a). Biodegradation of azo dyes in cocultures of anaerobic granular sludge with aerobic aromatic amine degrading enrichment cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **51**, 865-871.
- Tisler T. and Zagorc-Koncan J. (1997). Comparative assessment of toxicity of phenol, formaldehyde, and industrial wastewater to aquatic organisms. *Water, Air, and Soil Pollution*, **97**, 313-322.
- Todini O. and; Hulshoff Pol L. (1992). Anaerobic degradation of benzaldehyde in methanogenic granular sludge: the influence of additional substrates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **38**, 3, 417-20.
- Tsutsumi S. and Terade H. (1951). *Kogyo KagakuZasshi*, **54**. 527.
- Neumann International trade Commission, *Publication 1548*. "Import of Bencenoid Chemicals and Products. 1983". graphics Branch. Washington D.C., july 1984 pp. 10, 23.
- United Sates International trade Commission, *Publication 1588*. U.S. Government Printing Office. Washington D.C., 1984b.
- Van der Zee F.P., Lettinga G., Field J.A. (2000). The role of (auto)catalysis in the mecanism of an anaerobic azo reduction. *Water Science and Technology*, **42**(5-6), 301-308.
- Vidal G., Jiang Z.P., Omil F., Thalasso F. Mendez R. and Lema J.M. (1999). Continuous anaerobic treatment of waste-waters containing formaldehyde and urea. *Bioresource Technology*, **70**(3), 283-291.
- Walker B.F., Priscilla Li; Viven Perker and Gerald (1987). The Massachusetts Program to Reducting the Risk of Formaldehyde Exposure. *Public Health Reports*, **102**, 290-294.
- Walker R. (1970). The metabolism of azo compounds: a review of the literature. *Food and Cosmetics Toxicology*, **8**, 659-676.



- Walker R.R., Gengell R. and Murrells D.F. (1971). Mechanisms of azo reduction by *Streptococcus fecalis*. (1) Optimization of assay conditions. *Xenobiotica*, **1**, 221-229.
- Westoo G. (1965). On the metabolism of tartrazine in the rat. *Acta Chem. Scand.*, 1309-1316.
- Wilfong R.E. and Zimmerman J. (1972). *Rubber World*, **166**, 40-47.
- Wilmott N., Guthrie J. and Nelson G. (1998). The biotechnology approach to colour removal from textile effluent. *Journal of the Society of Dyers and Colourists*, **114**, 38-51.
- Wolff A.W. and Oehme F.W. (1974). Carcirogenic chemicals in food as an environmental issue. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **164**, 623-529.
- Wuhrmann K., Mechsner K.I. and kappeler Th. (1980). Investigation on rate - determinig factors in the microbial reduction of azo dyes. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, **9**, 325-228.
- Wynder E.L: and Ready B.S. (1974). Metabolic epidemiology of colorectal cancer. *Cancer* **34**, 801-806.
- Yatome C., Mastufuru H., Taguchi T. and Ogawa T. (1993). Degradation of 4'-demethylaminoazobencene-2-carboxilic acid by *Pseudomonas stuizeri*. *Aplied Microbiology and Biotechnology*, **39**, 778-781.
- Zehnder A.J.B. (1978). Ecology of methanogenesis. En: Michel,R. (Ed.), *Water Pollution Microbiology*, vol. 2, John Wiley & Sons, Inc., New York, 349-376.
- Zehnder A.J.B.; Inguarsen, K. and Marty, J. (1982). Microbiology of methane bacteria. In: Anaerobic Digestion 1981, Hughes et al. Eds., Elsevier Inc. Amsterdam.
- Zimmerman T., Kulla H.G. and Leisinger T. (1982). Properties of purified Orange II azoreductase, the enzyme initiating azo dye degradation by *Pseudomonas* KF46. *Euoepan. Journal of Biochemistry*, **129**, 197-203.

Zimmerman T., Gasser F., Kulla H.G. and Leisinger T. (1984). Comparison of two azoreductases acquired during adaptation to growth on azo dyes. *Archives of Microbiology*, **138**, 37-43.

## Capítulo 2

### Materiales y Métodos

#### 2.1. Métodos Analíticos

Los métodos analíticos utilizados en este trabajo se describen brevemente a continuación, habiendo sido agrupados según la fase analizada.

##### 2.1.1. Fase líquida

###### pH

Las medidas de pH se realizan utilizando un electrodo Ingold modelo U-455, conectado a un medidor pH/mV Crison 506. Previamente a su medida se realiza el calibrado utilizando disoluciones tampón Crison de pH 4,00 y pH 7,02 a 20 °C. La sensibilidad del medidor es de  $\pm 1$  mV. También se utiliza un equipo Knick (rango 0-14), conectado a un electrodo Schott Gerate. Previamente a su medida se realiza el calibrado utilizando disoluciones tampón de pH 4,00 y pH 7,02 a 20 °C.

###### Demanda Química de Oxígeno (DQO)

La Demanda Química de Oxígeno se determina mediante un método semi-micro (Soto *et al.*, 1989) que es una simplificación del método 508 (A y B) descrito en el Standard Methods (APHA, 1985).

###### Carbono Orgánico Total (COT)

La determinación del COT se realiza en un analizador de carbono orgánico total Shimadzu modelo TOC-5000. La cantidad de COT viene determinada por la diferencia entre el Carbono Total de la muestra (CT) y el Carbono Inorgánico (CI).

El CT se determina por medio de la lectura en un detector NDIR del CO<sub>2</sub> producido en la combustión de la muestra. Esta combustión tiene lugar en un tubo a 680 °C en

presencia de un catalizador de la oxidación. El CO<sub>2</sub> producido se lleva por medio de aire de alta pureza (150 mL·min<sup>-1</sup>) al recipiente de reacción del CI en donde el gas se enfría y se seca. Posteriormente pasa a través de un desorbedor de halógenos a la cámara de detección. El área del pico de lectura es proporcional a la concentración de carbono. Para determinar el CI, la muestra se introduce por medio del inyector al recipiente de reacción de CI en donde el gas portador (aire de alta presión) está borboteando en forma de pequeñas burbujas en una solución ácida. El carbono inorgánico en forma de CO<sub>2</sub> llega al detector NDIR donde se cuantifica.

### **Ácidos Grasos Volátiles (AGV)**

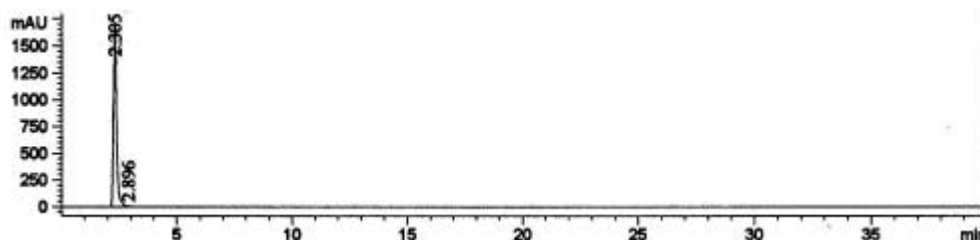
La composición de los ácidos grasos volátiles (acético, propiónico, n-butírico, iso-valérico y n-valérico), se analiza por cromatografía gaseosa mediante un cromatógrafo Hewlett-Packard, modelo 5890A, dotado de un detector de ionización de llama. La columna utilizada es de vidrio, de 2,27 m de longitud, con 100/120 de malla y de 1/8" de diámetro externo. La columna es de uso comercial, rellena de Chromosorb W-AW, impregnada con WPGA al 25 % y ácido fosfórico al 2 %. Se usa un inyector automático Hewlett-Packard, modelo 7673A.

Las temperaturas del inyector, columna y detector son 260, 105 y 280 °C, respectivamente. El gas portador es nitrógeno con un caudal de 24 mL·min<sup>-1</sup>, saturado con ácido fórmico antes de entrar al inyector. Como gas auxiliar se utiliza el aire y el hidrógeno con caudales de 400 y 30 mL/min, respectivamente. Los análisis se realizan empleando ácido trimetil acético (ácido piválico) como patrón interno.

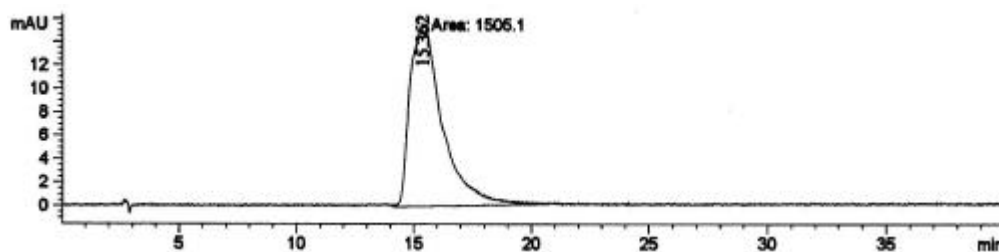
### ***Acid Orange 7* y Ácido Sulfanílico**

La medida de la concentración de *Acid Orange 7* (AO7) y Ácido Sulfanílico (AS) se hace mediante HPLC (High Liquid Performance Chromatography) empleando un cromatógrafo Hewlett Packard 1090 Series III, dotado de un detector DAD. Se emplea una columna Tracer PAH de 15 x 0,4 cm. Como eluyente se emplea una mezcla metanol/agua (30:70), con un flujo de 0,5 mL·mi<sup>-1</sup>. Para detectar el Ácido Sulfanílico se trabaja a 250 nm y para detectar el *Acid Orange 7* a 480 nm (Fig. 2.1).

A



B

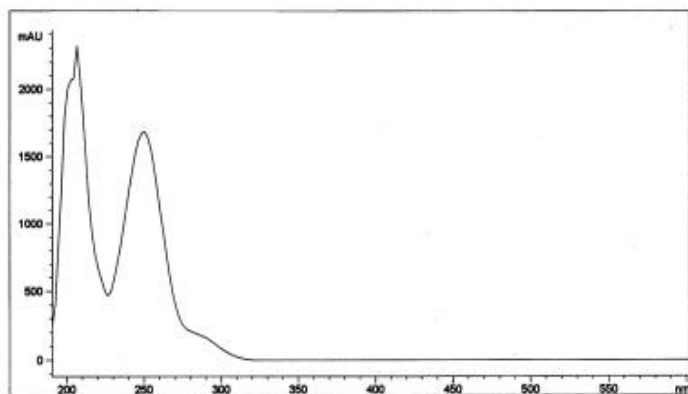


**Figura 2.1.** Cromatograma de HPLC a 250 nm con el pico correspondiente al Ácido Sulfanílico (A) y a 480 nm con el pico correspondiente al *Acid Orange 7* (B).

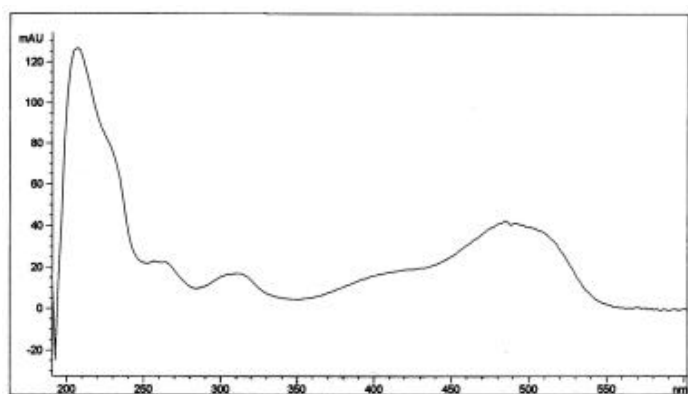
## Color

En los ensayos con *Acid Orange 7* el color se mide como el valor de la absorbancia de las muestras, previamente centrifugadas a 8 000 r.p.m. durante diez minutos, a la longitud de onda de 480 nm, que es el punto de máxima absorbancia del AO7 en el espectro visible (Fig. 2.2B). Las muestras se diluyeron en tampón fosfato (8,66 g·L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 5,38 g·L<sup>-1</sup> de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O) para obtener una medida de absorbancia menor de 1. Estas medidas se realizaron con un espectrofotómetro Hitachi, modelo U2000.

A



B



**Figura 2.2.** Espectros de absorción UV-VIS de Ácido Sulfanílico (A) y *Acid Orange 7* (B).

### 2.1.2. Fase gaseosa

#### Biogás

El análisis de la composición del biogás se realiza por cromatografía gaseosa empleando un cromatógrafo Hewlett-Packard, modelo 5890 Series II, dotado de un

detector de conductividad térmica. La columna utilizada es de acero inoxidable, de 2 m de longitud y de 1/8'' de diámetro externo, rellena de Porapak Q 80/100 de malla.

Las temperaturas del inyector, columna y detector son 90, 35 y 100 °C, respectivamente. Como gas portador se utiliza Helio con un caudal de 15 mL·mi<sup>-1</sup>. El volumen de muestra inyectado es de 1 mL tomado con una jeringuilla, a través de un septum a la entrada del depósito de medida del gas.

### **Presión**

La medida de la presión en las botellas se realiza mediante un transductor de presión (Centrepoint Electronics Ltd., Galway, Ireland). El calibrado de este aparato se realiza mediante un manómetro diferencial de mercurio.

### **2.1.3. Fase sólida**

#### **Sólidos en Suspensión Totales y Volátiles (SST, SSV)**

Para determinar los SST primeramente se realizan varios lavados de los sólidos, reduciendo finalmente el volumen líquido hasta 20 ó 30 mL, entonces se llevan a un crisol de porcelana, previamente pesado en seco. A continuación los sólidos se ponen a 105 °C, y una vez que se ha eliminado el agua, el aumento de peso con respecto al crisol seco nos da el contenido en SST. Para obtener el valor de SSV se lleva el crisol con los SST a 550 °C. La pérdida de peso producida nos da el contenido en SSV.

## **2.2. Ensayos de ecotoxicidad: Microtox**

Este ensayo de toxicidad bacteriana fue desarrollado en 1979 por Bulich, para evaluar la toxicidad de microcontaminantes acuáticos. Este ensayo se realiza con la bacteria marina *Photobacterium phosphoreum*, que se caracteriza por presentar en su metabolismo fenómenos de bioluminiscencia, la cual decrece rápidamente con la presencia de sustancias tóxicas en su medio. Esta reducción en la luminiscencia es el parámetro que se emplea para determinar el efecto tóxico de una sustancia o una

muestra, ya que incide directamente en el metabolismo bacteriano (De Bellerín, 1990; Ribó, 1992; Blum y Speece, 1991; Kaiser y Palabrica, 1991).

En la reacción responsable de la producción de luz, la enzima luciferasa cataliza la oxidación del flavin mononucleótido. Esta reacción está ligada al sistema del transporte de electrones en la respiración celular y por tanto, es indicativo del estado metabólico de la célula. Una disminución en la luminiscencia es indicativa de una disminución en la respiración celular, es decir, en la producción de energía.

La inhibición de la luminiscencia depende de la naturaleza y concentración del tóxico. La sensibilidad de la respuesta bacteriana depende de la temperatura y de la salinidad del medio en el que se realiza el ensayo.

La bioluminiscencia se mide a 490 nm. El ensayo se realiza a 15 °C y con una salinidad correspondiente al 2% en NaCl. Los reactivos empleados son: un cultivo liofilizado de bacteria marina *Photobacterium phosphoreum* almacenado en congelador (-20 °C); una solución de reconstitución, consistente en agua destilada libre de tóxicos; una solución de ajuste osmótico, consistente en NaCl al 22% y una solución diluyente, consistente en NaCl al 2%.

Los resultados de este ensayo se expresan en valores de  $EC_{50}$ , es decir, la concentración que provoca una reducción del 50% en la emisión de luz. Estos valores de  $EC_{50}$  se suelen dar a distintos tiempos (5, 10 y 15 minutos). De todos ellos es el valor de  $EC_{50}$  a los 15 minutos el que se emplea más a menudo.

### **2.3. Respirometrías**

Es una técnica de medida de actividad y toxicidad microbiana en condiciones aerobias.

#### **Metodología**

Los ensayos se realizan en viales de 15 mL y con un volumen útil de 10 mL. La velocidad de consumo de oxígeno de la biomasa se determina usando un “Biological



Oxygen Monitor (BOM)”, (Ginestet *et al.*, 1998). En la Figura 2.3 se muestra un esquema del equipo experimental usado.

Este sistema está dotado de un electrodo de oxígeno (Polarigraphic oxygen sensor, Orbisphere modelo 2120) encajado en un soporte de Perspex, que se introduce herméticamente en una celda dotada de un agitador magnético que contiene la muestra de biomasa y el resto de sustancias del medio de reacción. Esta celda está termostatzada por medio de una camisa de Perspex en la que circula agua a la temperatura que se desea llevar a cabo la reacción. Las lecturas tomadas por el electrodo son almacenadas en un ordenador mediante una tarjeta de adquisición de datos.

El procedimiento experimental seguido para la caracterización de la actividad de la biomasa fue el siguiente:

Se adicionan en la celda de 8 mL de tampón fosfato.

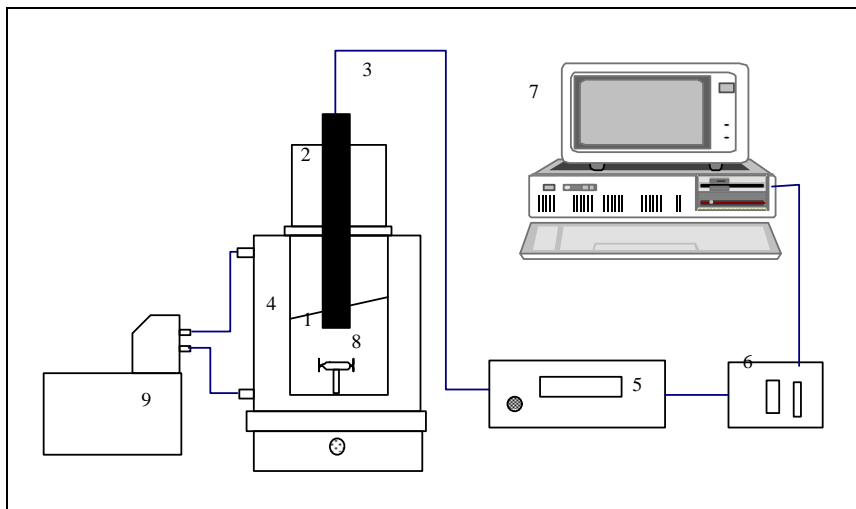
Se añaden 2 mL de lodo previamente aireado y lavado con tampón fosfato varias veces con la finalidad de eliminar los iones que pudiesen interferir en el ensayo. El volumen añadido proporcionaría una concentración final en el medio de reacción de aproximadamente  $1 \text{ g SSV}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Se satura el medio de reacción con aire durante 10-15 minutos al mismo tiempo que la celda permanece termostatzada a  $25\pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$ . Se alcanza así un 95-98% de saturación (alrededor de  $8 \text{ mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$ ) y el equilibrio térmico.

Se cierra la celda herméticamente con el soporte en que se encuentra insertado el electrodo de oxígeno, teniendo cuidado de que no quede ninguna burbuja en la celda. Las burbujas de aire pueden salir a través de una pequeña hendidura que posee el soporte en su parte lateral y por la cual también se podrá inyectar posteriormente el substrato. Finalmente, se conecta el agitador magnético.

Se inicia el proceso de adquisición de datos dejando pasar un tiempo prudencial hasta que se defina el consumo de  $\text{O}_2$  correspondiente a la respiración endógena. Se inyectan sucesivas dosis de substrato (únicamente HAC o bien HAC con el tóxico) usando una jeringuilla Hamilton que permite inyectar una dosis mínima

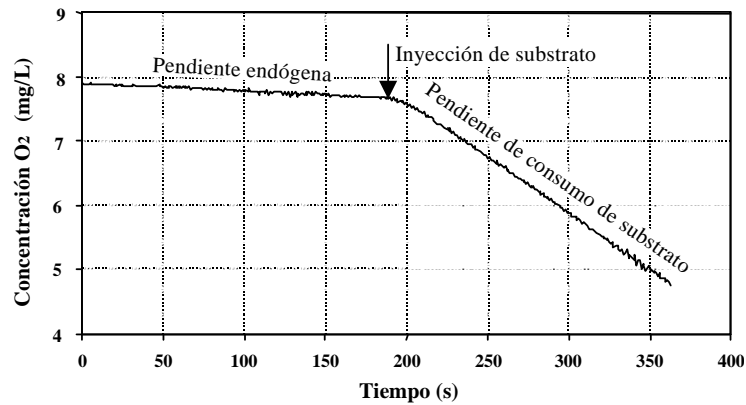
de 0,01 mL. Se observan las variaciones experimentadas en la velocidad de consumo de oxígeno con cada adición. En la Figura 2.4 se muestra la forma típica de un respirograma para la adición de una concentración dada de sustrato.



**Figura 2.3.** Esquema del equipo empleado en la medida del consumo de oxígeno. **1** Celda de medida; **2** Soporte del electrodo; **3** Electrodo de oxígeno; **4** Camisa; **5** Amplificador; **6** Tarjeta de adquisición de datos PCL-718; **7** Ordenador; **8** Agitador magnético; **9** Termostato.

Se determina la cantidad de biomasa en cada experimento a través del ensayo por el que se calcula la concentración de SSV.

Se calcula la actividad correspondiente a cada concentración de sustrato, expresada como  $\text{gDQO consumida} \cdot \text{g}^{-1} \text{SSV} \cdot \text{d}^{-1}$ . Para ello se usan las razones de consumo de oxígeno con cada concentración de sustrato, teniendo en cuenta el consumo de  $\text{O}_2$  correspondiente a la respiración endógena (Drtil *et al.*, 1993).



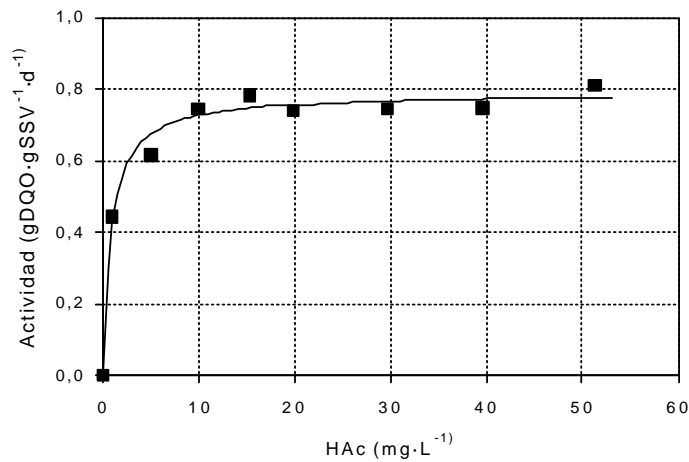
**Figura 2.4.** Respirograma típico para la determinación de la actividad bacteriana.

Como medio de reacción se usa un tampón fosfato, que proporciona un pH de  $7,0 \pm 0,1$ . La composición de dicho tampón se indica en la Tabla 2.1. El sustrato añadido fue ácido acético, en una concentración en torno a  $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , con la cual, el lodo empleado alcanza su actividad máxima (Fig. 2.5).

**Tabla 2.1.** Composición del tampón fosfato usado como medio de reacción (en  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  a excepción de las trazas nitrificantes, en  $\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

Compuesto	Concentración ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	3,309
$\text{K}_2 \text{HPO}_4$	3,970
$\text{MgSO}_4\cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	1,840
$\text{MgCl}_2\cdot 10 \text{H}_2\text{O}$	1,520
NaCl	0,800
Trazas nitrificantes	5,000

El lodo empleado provenía de un sistema de lodos activos, que la empresa Luis Calvo S.A. posee en su factoría de Carballo (A Coruña), dedicada a la elaboración de conservas de pescado, para tratar las aguas residuales generadas en la planta.



**Figura 2.5.** Valores de actividad del lodo empleado para las respirometrías para distintas concentraciones iniciales de HAc.

## 2.4. Referencias

- APHA-AWWA-WPCF. (1985). Standard Methods for the examination of water and wastewater. 16<sup>th</sup> Edition. Washington.
- Blum J.W. and Speece R.E. (1991). A database of chemical toxicity to environmental bacteria and its use in interspecies comparisons and correlations. *Research Journal Water Pollution Control Federation*, **63**(3), 198-207.
- De Bellerín A. (1990). Ensayo de Toxicidad Microtox. <sup>er</sup> monográfico, *Tecnología del Agua*, 41-55.

- Drtil M., Németh P. and Bodík I. (1993). Kinetic constants of nitrification. *Water Research*, **27**(1), 35-39.
- Ginestet P., Audic J.M., Urbain V. and Block J.C. (1998). Estimation of nitrifying bacterial activities of measuring oxygen uptake in the presence of metabolic inhibitors allythiourea and azide. *Applied and Environmental Microbiology*, **60**(6), 2266-2268.
- Kaise K.L.E. and Palabrica V.S. (1991). Photobacterium phosphoreum toxicity data index. *Water Pollution Research Journal of Canada*, **26**(3), 361-431.
- Ribó J.M. (1992). Evaluación de la contaminación química del medio acuático: El ensayo de bacterias luminescentes. *Afinidad*, **437**, 7-17.
- Soto M., Veiga M.C., Méndez R. and Lema J.M. (1989) Semi-micro COD determination method for high salinity wastewater. *Environmental Technology Letters*, **10**(5), 541-548.



## Capítulo 3

### Biodegradación de formaldehído en condiciones anaerobias

#### 3.1. Introducción

El formaldehído es un compuesto que se puede encontrar en los vertidos de aguas residuales de distintos tipos de procesos industriales. En la producción de resinas y colas, el formaldehído, junto con la urea, son utilizados como materias primas, por lo que se encuentran presentes en los vertidos debido tanto a pérdidas como al uso de aguas de lavado. Este tipo de industria tiene especial importancia en Galicia, ya que gran parte de la producción maderera se destina a la elaboración de tableros, para lo cual es necesario el uso de colas, de las cuales el formaldehído es una materia prima esencial. En la industria petroquímica, el formaldehído se obtiene como producto residual durante la producción de dimetilterftalato; en la de pesticidas en el proceso de obtención del pentaeritritol y en la industria de plásticos, el formaldehído se encuentra junto a sus derivados y otros compuestos tóxicos, tales como el fenol.

Se han realizado algunos estudios a nivel laboratorio para determinar la toxicidad metanogénica y biodegradabilidad anaerobia del formaldehído (Parkin *et al.*, 1983; Chou, 1977; Hovious, 1973; Botte, 1991). Las concentraciones críticas de formaldehído para un posible tratamiento anaerobio dependen de diversos factores entre los que se puede mencionar el pH, tipo de lodos utilizados, adaptación de la microflora al compuesto, etc.

Battacharya y Parkin (1988), estudiaron en condiciones anaerobias el efecto tóxico del formaldehído y el cloruro de metilo sobre dos cultivos bacterianos en los que se usó ácido acético y butírico como sustratos. La adición en continuo de  $51 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de formaldehído durante 40 días a un reactor, previamente alimentado con acetato, no

produjo mayores efectos tóxicos sobre la población bacteriana. Sin embargo una dosis de  $128 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de formaldehído causó un efecto inhibitorio produciendo una acumulación en la concentración de acetato. Este mismo efecto se pudo observar cuando se usó propionato como sustrato. Del mismo modo al añadir una concentración de formaldehído de  $800 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  durante 25 días produjo, en los cultivos correspondientes, una acumulación de  $1\ 000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de acetato y propionato, respectivamente. Los porcentajes promedios de eliminación de formaldehído fluctuaron entre el 55 y 60%, observándose que se producía un mayor efecto inhibitorio del formaldehído sobre los cultivos alimentados con acetato. Asimismo también se observó cierto grado de adaptación de las bacterias anaerobias al formaldehído.

De Bekker *et al.* (1983), proponen que la toxicidad del formaldehído sobre las bacterias se debe a la reacción de este compuesto con las proteínas presentes en la pared celular de los microorganismos. De esta manera las proteínas sufren una desnaturalización produciendo en las bacterias una incapacidad para realizar sus actividades metabólicas. Considerando esta teoría, los autores calculan que se puede producir un 100% de inhibición con una concentración de  $0,89 \text{ g formaldehído}\cdot\text{g}^{-1} \text{ SSV}$ .

Sin embargo, estudios realizados por Parkin y Speece (1983) muestran que el efecto tóxico del formaldehído sobre bacterias anaerobias puede ser reversible debido a la aclimatación de las bacterias. Estos autores alimentaron a un reactor tipo Filtro Anaerobio, que operó en continuo, concentraciones de 300, 600 y  $1\ 800 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de formaldehído observándose que se producía una metanización del sustrato, excepto para el caso de la concentración de  $1\ 800 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  en donde apenas hubo producción de metano y la posterior recuperación fue muy lenta. Por otra parte, Parkin *et al.* (1983) realizaron una experiencia que consistió en añadir  $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de formaldehído a un Filtro Anaerobio sin aclimatar por períodos de tiempo progresivamente más largos (1, 2, 4 y 7 días) con intervalos de 5 días, entre cada adición de formaldehído. Para los períodos de 2 y 4 días no se observó efecto tóxico sobre los lodos, sin embargo, en el día 7 de adición de formaldehído la producción de



metano se hizo casi nula. Qu y Bhattacharya (1997) en un quemostato comprobaron que con una concentración de lodo de 444 mg SSV·L<sup>-1</sup> y con 14 días de tiempo de retención de lodos, alcanzaban una conversión de formaldehído del 99%, con una concentración de 1110 mg·L<sup>-1</sup> en el influente.

Más recientemente, los estudios realizados por Vidal *et al.* (1999) con una mezcla de Ácidos Grasos Volátiles (AGV), han puesto de manifiesto que el formaldehído tiene un efecto inhibitorio sobre la actividad metanogénica a concentraciones mayores de 150 mg·L<sup>-1</sup>, y que valores en torno a 200 mg·L<sup>-1</sup> provocan un 50% de inhibición sobre la metanogénesis. También se ha determinado la biodegradabilidad del formaldehído en condiciones *batch* hasta con concentraciones de 250 mg·L<sup>-1</sup>, aunque se desconocen los metabolitos intermedios. En sistemas en continuo la biodegradación del formaldehído se favorece considerablemente, pudiéndose trabajar con concentraciones en el influente de hasta 1 000 mg·L<sup>-1</sup> sin detectar problemas de toxicidad en el reactor, donde su concentración permanece por debajo de 100 mg·L<sup>-1</sup>.

## **3.2. Materiales y Métodos**

### **3.2.1. Biomasa**

La biomasa que se utilizó en estos experimentos procede de los lodos generados en el reactor anaerobio de la factoría dedicada a la producción de conservas de productos marinos, que la empresa Luis Calvo S.A. posee en Carballo (A Coruña), y que trata efluentes de alta carga orgánica (Veiga *et al.*, 1994).

### **3.2.1. Ensayos de actividad**

Se llevaron a cabo dos ensayos diferentes para determinar la actividad metanogénica y sulfurogénica específicas del lodo. Los ensayos se llevaron a cabo en botellas de 500 mL (250 mL de fase líquida), sin agitación y con 1,0-1,2 g·L<sup>-1</sup> de sólidos en suspensión volátiles (SSV). Previamente, todas las botellas fueron pesadas vacías y llenas de agua, con lo cual, por diferencia de pesada, se obtienen los volúmenes de las fases líquida y gaseosa durante el transcurso del experimento.

Las botellas se cerraron con unos tapones herméticos de goma, a través de los cuales se realizó la toma de muestra de las fases líquida y gaseosa. Las botellas sólo se abrieron al final del experimento.

La secuencia de operación fue siempre la misma a lo largo de los experimentos: primero se pesan las botellas y se mide la presión interior; a continuación se realiza la toma de muestra gaseosa, que se analiza de inmediato; finalmente se hace la toma de muestra del líquido y se despresurizan las botellas. El objetivo de eliminar la sobrepresión interior es medir la producción diaria de biogás y, más concretamente, de metano. Con esta secuencia de toma de muestra (primero la fase gaseosa y después la líquida) se pretende evitar la alteración en la fase gaseosa que podría tener lugar si se hiciese en el orden inverso.

El medio de nutrientes estaba formado por

Macronutrientes ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ):  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (250),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (280),  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (111),  $\text{CaCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (20), y extracto de levadura (20).

Micronutrientes ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ):  $\text{FeCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (2 000),  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (350),  $\text{ZnCl}_2$  (50),  $\text{CuCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (38),  $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (500),  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (50),  $\text{AlCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (90),  $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (2 000),  $\text{NiCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (92),  $\text{Na}_2\text{SO}_3\cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (164), EDTA (1 000), Resazurina (200) y HCl ( $1\ \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

Se añadió  $\text{NaHCO}_3$  a razón de  $0,5\ \text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  DQO y, para eliminar el oxígeno disuelto, se añadió  $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ , en concentración de  $100\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . El pH en las botellas se ajustó a  $7,0\pm 0,1$ , empleando para ello disoluciones de HCl y NaOH. Finalmente, se hizo pasar una mezcla  $\text{N}_2/\text{CO}_2$  (70:30) durante 5 minutos para retirar el oxígeno y para crear una atmósfera que permita aumentar la capacidad tampón del sistema. Las botellas se mantuvieron en una cámara termostataada a  $37\text{-}38\ \text{°C}$  para operar en rango mesófilo.

Todos los ensayos se hicieron por duplicado. Se utilizaron dos mezclas distintas de ácidos grasos volátiles (AGV) como sustrato (M1 y M2). Ambas mezclas contenían ácido acético (HAc), ácido propiónico (HPr) y ácido n-butírico (HBut), con una relación, en términos de DQO de 1:0,35:0,43 (M1) y 1:1:1 (M2) y con una

concentración total de DQO, de 3,8 y 2,0 g·L<sup>-1</sup>, respectivamente. En los ensayos para la determinación de la actividad sulfurogénica, junto con el sustrato M2 se añadieron 4 g·L<sup>-1</sup> de sulfato para obtener una relación DQO/sulfato de 0,5. Se realizaron dos adiciones para cada ensayo.

### **3.2.3. Ensayos abióticos y de biodegradabilidad**

Estos ensayos se llevaron a cabo por triplicado. Los ensayos de biodegradabilidad anaerobia (B1-B5) se llevaron a cabo siguiendo el mismo procedimiento empleado para los ensayos de actividad. En este caso el único sustrato fue el formaldehído, en concentraciones que oscilaron entre 0-10 mM (0-300 mg·L<sup>-1</sup>).

Los ensayos abióticos se llevaron a cabo para determinar la fracción de formaldehído que podría ser eliminada por volatilización, adsorción o por reacción química. Para este propósito, el ensayo F1 se llevó a cabo sin lodo, y el ensayo F2 se llevó a cabo con lodo estéril, previamente sometido a 120 °C durante 2 horas en un autoclave. Estos ensayos se llevaron a cabo con una concentración inicial de formaldehído de 6,67 mM (200 mg·L<sup>-1</sup>).

### **3.2.4. Ensayos de toxicidad**

Estos ensayos se llevaron a cabo siguiendo los mismos procedimientos descritos para los ensayos de actividad, empleándose concentraciones de formaldehído comprendidas entre 0 y 6,67 mM (0-200 mg·L<sup>-1</sup>). Las mezclas de AGV M1 y M2 fueron usadas como cosustrato, con una concentración inicial de 3,75 y 2,0 g DQO·L<sup>-1</sup>, respectivamente. Se realizaron dos series de experimentos, una con la mezcla M1 (T1-T5) y otra con la mezcla M2 (T6-T9).

### **3.2.5. Análisis**

#### **Metanol**

La concentración de metanol en las muestras se determina mediante un cromatógrafo Hewlett-Packard, modelo 5890A, dotado de un detector de ionización de llama. La columna utilizada es de vidrio, de 2,27 m de longitud, con 100/120 de malla y de 1/8'' de diámetro externo. La columna es de uso comercial, rellena de Chromosorb

W-AW, impregnada con WPGA al 25 % y ácido fosfórico al 2 %. Se usa un inyector automático Hewlett- Packard, modelo 7673A.

Las temperaturas del inyector y detector son 260 y 280 °C, respectivamente. La temperatura de la columna es 75 °C, aplicándosele una rampa ascendente de 10 °C·min<sup>-1</sup>, hasta llegar a los 140 °C. El gas portador es nitrógeno con un caudal de 24 mL·min<sup>-1</sup>, saturado con ácido fórmico antes de entrar al inyector. Como gas auxiliar se utiliza el aire y el hidrógeno con caudales de 400 y 30 mL·min<sup>-1</sup>, respectivamente. Los análisis se realizan empleando ácido trimetil acético (ácido piválico) como patrón interno.

### **Formaldehído**

El formaldehído (FA) se determina por espectrofotometría siguiendo una metodología basada en la reacción de Hantzsch (Nash, 1953). El formaldehído en disolución acuosa reacciona, en presencia de iones amonio (acetato amónico 20% peso-volumen<sup>-1</sup>) y acetilacetona (0,4 % peso-volumen<sup>-1</sup>), tras una digestión de 15 minutos a 40 °C, produciendo diacetilhidrolutidina, que tiene un máximo de absorbancia a 412 nm. La determinación se realiza mediante un espectrofotómetro Hitachi, modelo U2000.

La medida de Ácidos Grasos Volátiles, Carbono Orgánico Total, Sólidos en Suspensión Volátiles, presión en las botellas y composición del biogás están descritos en el Capítulo 2.

### **3.2.6. Cálculos**

#### **Determinación de actividades**

En este trabajo se calcula la actividad de degradación de AGV, actividad metanogénica (o de generación de metano) y la actividad relativa a la degradación de formaldehído.

La metodología usada ha sido la misma en todos los casos: una vez que se tienen todos los perfiles de concentración, se calculan las pendientes utilizando para ello los puntos experimentales situados en las regiones de máxima pendiente. No obstante

hay que tener en cuenta algunas salvedades. Una de ellas es que para calcular la actividad de degradación de AGV, el rango de puntos experimentales elegidos debe ser tal que se haya producido al menos un 50 % de degradación, en términos de concentración de DQO debida a estos ácidos. Por otra parte para ser coherentes y, ya que la mayor parte del metano producido va a proceder de la degradación de los AGV, ya que su concentración es sensiblemente mayor que la del otro sustrato que se degrada, deben elegirse los mismos puntos correlativos para calcular la actividad metanogénica, y así poder comparar ambos valores.

### **Modelización de la degradación de formaldehído**

Para poder modelar la degradación de formaldehído se utilizó el modelo de Monod, basado en la Ec. 3.1.

$$\mu = \frac{\mu_m \cdot S}{K_s + S} \quad [3.1]$$

en donde  $\mu$  es la velocidad de crecimiento específico de los microorganismos ( $h^{-1}$ );  $\mu_m$  es la velocidad de crecimiento específico máximo ( $h^{-1}$ ),  $S$  es la concentración de sustrato (mM) y  $K_s$  la constante de saturación (mM).

Teniendo en cuenta que la cinética de degradación de sustrato en discontinuo puede escribirse según la Ec. 3.2.

$$v_s = \frac{dS}{dt} = \frac{X}{Y_{xs}} \cdot \frac{\mu_m \cdot S}{K_s + S} \quad [3.2]$$

en donde:

$v_s$  es la velocidad de desaparición de sustrato ( $mM \cdot h^{-1}$ ),  $Y_{xs}$  es el rendimiento celular ( $g \text{ SSV} \cdot mol^{-1} \text{ sustrato}$ ) y  $X$  la concentración de microorganismos ( $g \text{ SSV} \cdot L^{-1}$ ).

La velocidad de consumo específico máximo de sustrato (o actividad específica máxima) se define como  $A_{c_m} = \mu_m / Y_{xs}$  (mol sustrato·g<sup>-1</sup> SSV·h<sup>-1</sup>). Considerando que el crecimiento bacteriano es muy bajo, la concentración de microorganismos puede considerarse aproximadamente constante durante los ensayos. Por ello, el modelo puede ser expresado tal y como se muestra en la Ec. 3.3.

$$v_s = X_o \cdot A_{c_m} \cdot \frac{S}{K_s + S} \quad [3.3]$$

Para obtener los parámetros cinéticos se aplicó la metodología de velocidades iniciales; para ello sólo se consideraron los valores de la concentración en las primeras horas del proceso de degradación.

El método de las velocidades iniciales se basa en el cálculo de la velocidad de desaparición de sustrato a tiempo de reacción cero, momento en el que se puede despreciar la influencia de otros compuestos intermedios o finales de degradación, lo que simplifica el modelo; esta velocidad inicial se correlaciona con la concentración inicial de sustrato. Para el cálculo de las velocidades de degradación del FA, una vez obtenidos los valores de concentración en función del tiempo, con la ayuda de un programa informático (Table Curve Windows v1.0) se busca una ecuación matemática que permita reproducir, con la mayor precisión posible, la trayectoria de los puntos; el valor de la derivada de esta función corresponde a la velocidad de degradación del FA en ese punto.

## **Balances**

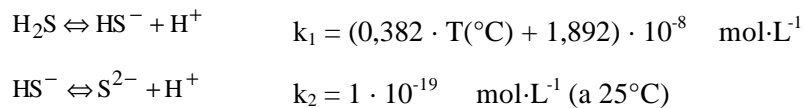
### ***Balances globales***

Durante cada uno de los ensayos se determinó el balance global de materia en términos de DQO. Así, se relacionaron en cada momento del transcurso de cada experimento la cantidad de DQO existente en fase líquida (en forma de formaldehído, AGV o metanol) con la cantidad de metano producido y presente tanto en la fase gaseosa como en la fase líquida (a partir de la constante de Henry).

### ***Determinación del sulfuro total disuelto y del sulfuro de hidrógeno libre***

A partir de la composición del biogás, de la temperatura y el pH, considerando condiciones de equilibrio, se pueden calcular el contenido en sulfuro de hidrógeno libre ( $\text{H}_2\text{S}$ ) y el sulfuro total disuelto en el medio líquido (Omil *et al.*, 1995). El equilibrio entre el  $\text{H}_2\text{S}$  presente en el biogás y en el líquido está regulado por la ley de Henry, cuya constante a  $37^\circ\text{C}$  es de  $0,375 \text{ atm H}_2\text{S} \cdot (\text{g H}_2\text{S} \cdot \text{L}^{-1})^{-1}$ .

El  $\text{H}_2\text{S}$  es un ácido débil, cuyas reacciones de disociación son:



donde  $k_1$  y  $k_2$  son las constantes de equilibrio.

A pH 7-8 sólo el primer equilibrio es significativo. La concentración de sulfuro total disuelto ( $\text{H}_2\text{S} + \text{HS}^- + \text{S}^{2-}$ ) puede entonces calcularse a partir de la concentración de sulfuro libre ( $\text{H}_2\text{S}$ ) obtenida mediante la ley de Henry, y la fracción  $f$ ; obtenida a partir de  $k_1$  y el pH (Isa *et al.*, 1986):

$$f = \frac{1}{\left(1 + \frac{k_1}{10^{-\text{pH}}}\right)} \quad [3.4]$$

### ***Porcentaje de DQO usado por las bacterias sulfato reductoras***

El porcentaje de DQO usado por las Bacterias Sulfato Reductoras (BSR) puede obtenerse a partir de la cantidad de sulfato reducido y de la DQO eliminada. La DQO del sulfuro de hidrógeno es  $64 \text{ gO}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$ ; por lo tanto, son necesarios 64 g de DQO para cada mol de sulfato reducido. La cantidad de sulfato reducido se calculó a partir de la producción de sulfuro medida tanto en el biogás como en el medio líquido.

### 3.3. Resultados

#### 3.3.1. Caracterización de la biomasa

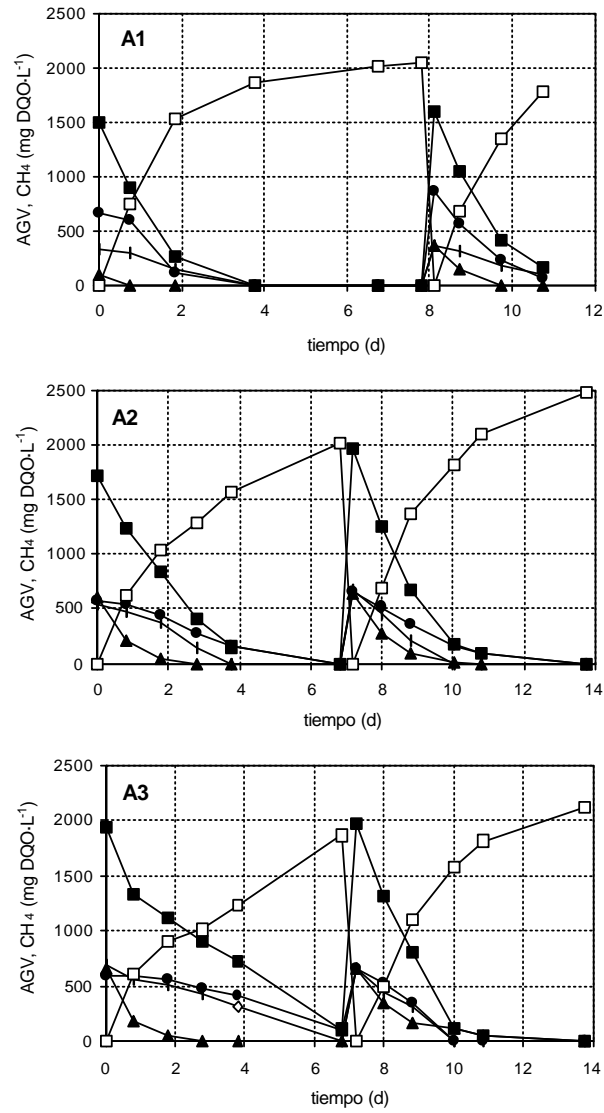
En la Tabla 3.1 se muestran las condiciones experimentales para proceder a la caracterización del lodo.

**Tabla 3.1.** Condiciones experimentales para la caracterización del lodo.

Ensayo	AGV	AGV	SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	Adición
	HAc:HPr:HBut	g DQO·L <sup>-1</sup>		
A1	2,5:1:1	2	-	1, 2
A2	1:1:1	2	-	1, 2
A3	1:1:1	2	+	1, 2

La actividad específica máxima calculada en la primera y segunda adición fue 0,75 y 0,88 g DQO<sub>AGV</sub>·g<sup>-1</sup> SSV·d<sup>-1</sup>, respectivamente. El uso de un medio con mayor proporción de ácidos propiónico y butírico (ensayos A2) produjo un descenso en la actividad (0,32 g DQO<sub>AGV</sub>·g<sup>-1</sup> SSV·d<sup>-1</sup>), que aumentó sensiblemente en la segunda adición (0,64 g DQO<sub>AGV</sub>·g<sup>-1</sup> SSV·d<sup>-1</sup>). En los ensayos llevados a cabo en presencia de sulfato (ensayo A3) se alcanzó una actividad muy baja en la primera adición (0,25 g DQO<sub>AGV</sub>·g<sup>-1</sup> SSV·d<sup>-1</sup>), aunque ésta fue mayor en la segunda adición (0,53 g DQO<sub>AGV</sub>·g<sup>-1</sup> SSV·d<sup>-1</sup>). La presencia de sulfato originó la generación de sulfuro, con unas concentraciones de sulfuro libre y total, disuelto por encima de 50 y 122 mg·L<sup>-1</sup>, respectivamente, lo que indica que la DQO utilizada por las bacterias SRB supuso el 6 y el 12% de la DQO total, en la primera y segunda adiciones, respectivamente.





**Figura 3.1.** Valores de concentración de AGV (■), HAc (●), HPr (○), HBut (△) y CH<sub>4</sub> (□), en términos de DQO, para los ensayos A1, A2 y A3 (Condiciones experimentales en la Tabla 3.1).

En la Figura 3.1 se muestra la evolución de estos ensayos durante las dos adiciones efectuadas y en la Tabla 3.2 se resumen los valores de actividades determinados para estos ensayos. La actividad de degradación de AGV es prácticamente igual a la de generación de metano (como cabe esperar, dado que los AGV son el único sustrato presente en los ensayos), a excepción del ensayo A1, en la primera adición. En este caso, no se realizó un lavado del lodo previo, por lo cual había carbono orgánico adicional al de los AGV al comenzar el experimento; esto fue confirmado por la medida de COT que fue superior a la que cabría esperar a partir de la concentración inicial de AGV.

**Tabla 3.2.** Valores de las actividades específicas de degradación de AGV y de generación de metano (en  $\text{g DQO}\cdot\text{g}^{-1}\text{ SSV}\cdot\text{d}^{-1}$ ).

Ensayo	1ª Adición		2ª Adición	
	AGV	CH <sub>4</sub>	AGV	CH <sub>4</sub>
A1	0,75	0,99	0,88	0,88
A2	0,32	0,33	0,64	0,63
A3	0,25	0,26	0,53	0,46

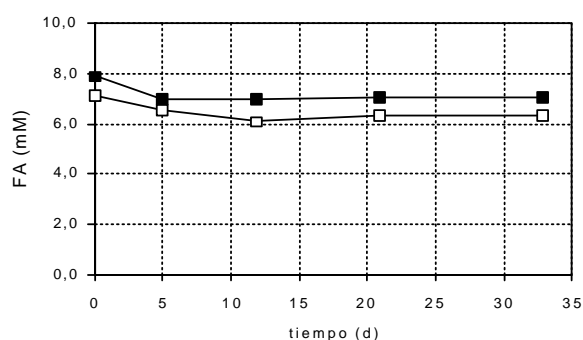
### 3.3.2. Ensayos abióticos y de biodegradabilidad

El diseño experimental de estos ensayos se muestra en la Tabla 3.3.

Los ensayos llevados a cabo en ausencia de lodo (F1) mostraron que la fracción de formaldehído que desapareció por procesos abióticos, tales como volatilización o descomposición química, fue del 10-11%, teniendo lugar durante el primer día de operación. Cuando se empleó lodo estéril (ensayo F2) no hubo aumento significativo en los valores de formaldehído transformado observados en el ensayo F1 (Figura 3.2).

**Tabla 3.3.** Diseño experimental de los ensayos abióticos y de biodegradabilidad.

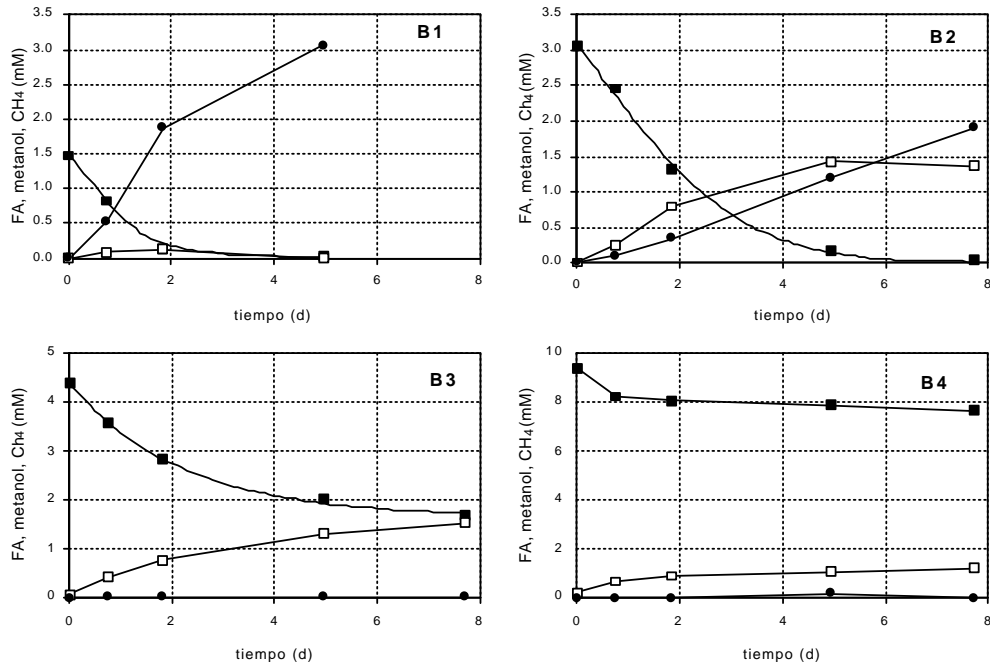
Ensayo	Lodo	FA mM	Adición
F1	----	6,67	1
F2	estéril	6,67	1
B1	Activo	1,67	1
B2	Activo	3,33	1
B3	Activo	5,00	1
B4	Activo	6,67	1



**Figura 3.2.** Evolución de formaldehído en los ensayos abióticos F1 (□) y F2 (■) (Condiciones experimentales en la Tabla 3.3).

Los resultados de los ensayos de biodegradabilidad (Fig. 3.3) muestran que el formaldehído puede degradarse sin fuentes adicionales de carbono. En el ensayo de control, llevado a cabo sin formaldehído (B0), se detectó generación de metano debida a la entrada en fase endógena del lodo (2,0-2,4 mM de metano). Este hecho también ocurrió en el ensayo B1, en el cual, a pesar de que había una fuente de carbono, la cantidad de metano generado fue sensiblemente superior a la que cabría

esperar de la degradación del formaldehído. En este caso el metano generado estuvo en torno a 3 mM.



**Figura 3.3.** Evolución de la concentración de formaldehído (■), metanol (□) y metano (●) para los ensayos B1-B5 (Condiciones experimentales en la Tabla 3.3).

En los ensayos B1 y B2, el FA se degradó completamente, generándose metanol que, mientras que en el ensayo B1 también se degradó, en el ensayo B2 se acumuló en el medio. En el ensayo B1 se alcanzó una completa conversión del FA en metano, detectándose metanol en pequeñas concentraciones. En el ensayo B2, a pesar de la completa conversión del FA, solamente un 62% se transformó en metano, siendo el metanol acumulado el 44% del FA inicial. Podría considerarse entonces, que el metanol acumulado corresponde a la fracción de FA no metanizada.

Cuando se emplearon concentraciones iniciales de FA mayores (ensayos B3 y B4) no hubo generación de metano y la conversión del FA fue baja (62 y 19%, respectivamente). El metanol generado supone el 35 y 13% del FA inicial, respectivamente.

### 3.3.3. Ensayos de toxicidad

En la Tabla 3.4 se muestra el diseño experimental realizado para determinar la velocidad de degradación de una mezcla de AGV en presencia de diferentes cantidades de formaldehído, determinándose de esta forma el posible efecto tóxico que esta sustancia puede ejercer sobre una población anaerobia.

**Tabla 3.4.** Diseño experimental de los experimentos de toxicidad anaerobia de formaldehído en la degradación de los AGV.

Medio	Ensayo	AGV		FA mM	Adición
		HAc:HPr:HBut	g DQO·L <sup>-1</sup>		
M1	T1	2,8 : 1 : 1,2	3,75	0	1
	T2	2,8 : 1 : 1,2	3,75	1,67	1
	T3	2,8 : 1 : 1,2	3,75	3,33	1
	T4	2,8 : 1 : 1,2	3,75	5,00	1
	T5	2,8 : 1 : 1,2	3,75	6,67	1
M2	T6	1 : 1 : 1	2	1,67	1, 2
	T7	1 : 1 : 1	2	3,33	1, 2
	T8	1 : 1 : 1	2	5,00	1, 2
	T9	1 : 1 : 1	2	6,67	1, 2
M2	T10	1 : 1 : 1	2	1,67	1, 2*
	T11	1 : 1 : 1	2	3,33	1, 2*
	T12	1 : 1 : 1	2	5,00	1, 2*
	T13	1 : 1 : 1	2	6,67	1, 2*

NOTAS: 2\*: sin formaldehído.

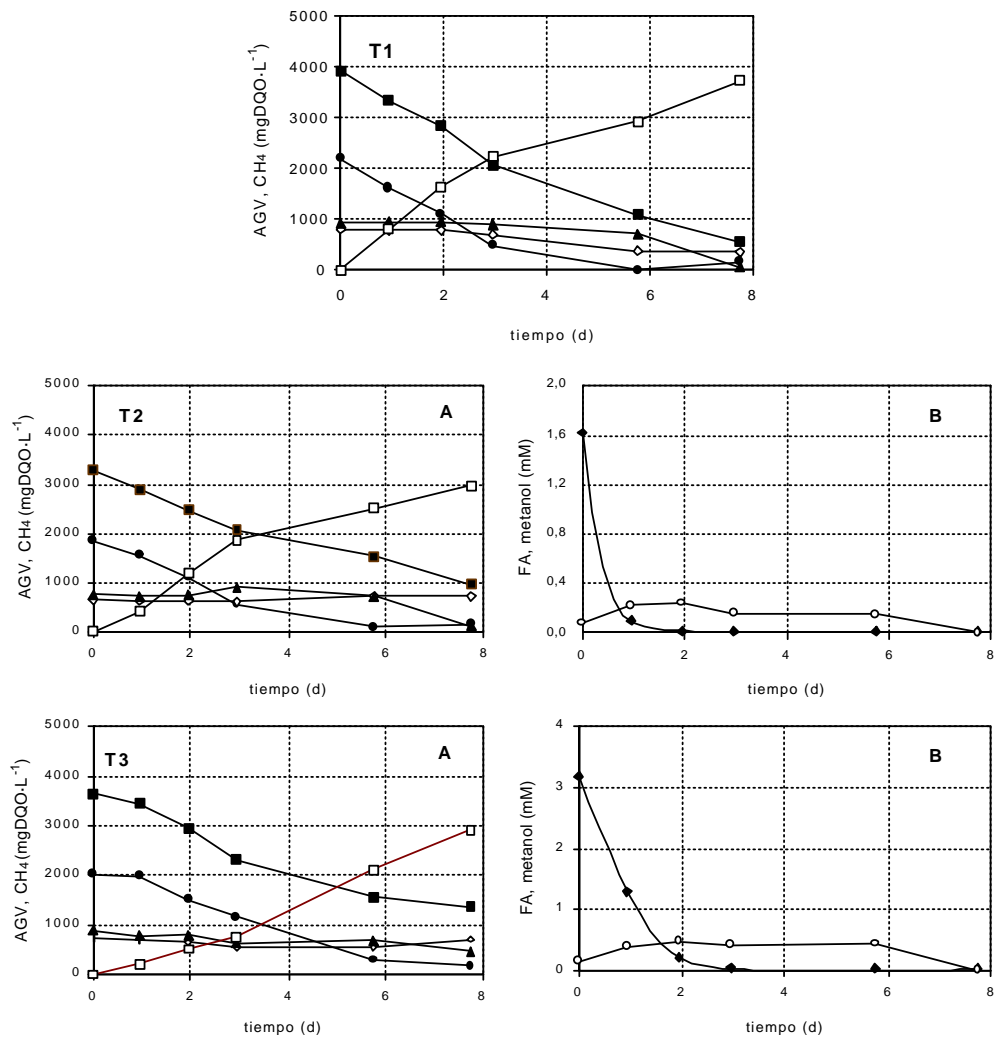
En la Fig. 3.4 se muestran los valores medidos para los ensayos con el medio M1 (alta proporción de HAc).

En el ensayo control (T1) se obtuvieron resultados similares a los obtenidos en el ensayo A1, alcanzándose una actividad de degradación de AGV prácticamente igual (Tabla 3.5). El HAc se degradó rápidamente, mientras que HPr y HBut empezaron a degradarse cuando la concentración de HAc era prácticamente nula (día 6). Mientras que el HBut se degradó rápidamente (dos días), la degradación del HPr fue más lenta.

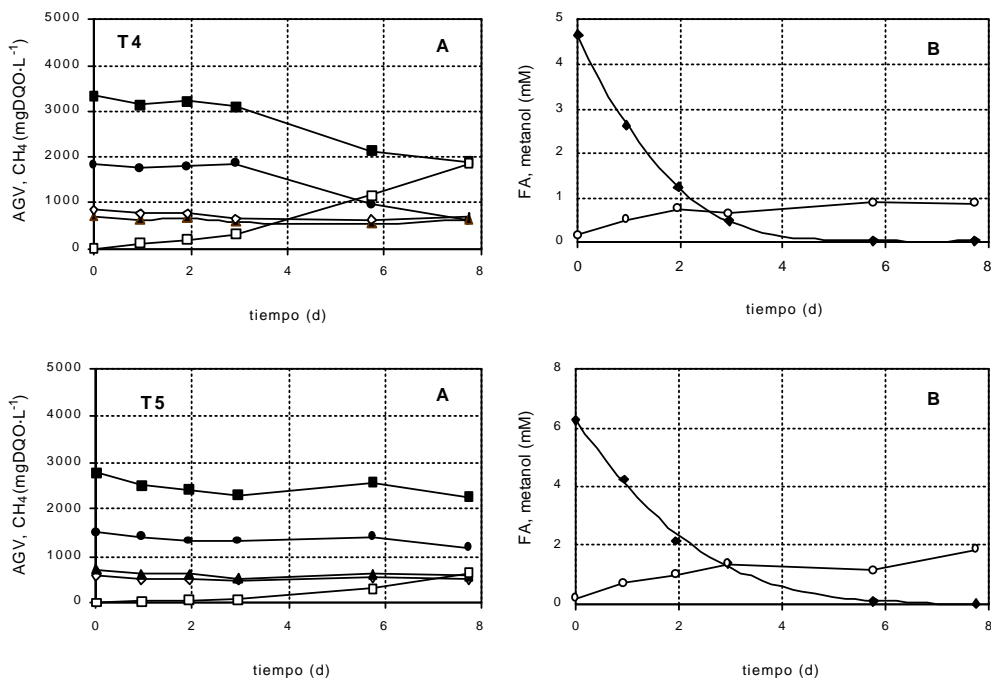
Cuando la concentración inicial de FA fue 1,67 mM, el FA y el HAc fueron los primeros sustratos en degradarse, después lo hizo el HBut, mientras que el HPr permaneció en el medio sin cambios. La degradación del FA fue rápida (alrededor del 90% en el primer día de operación). Se generó metanol que permaneció en el medio hasta el octavo día de operación. En el ensayo T3 (3,33 mM de FA) el comportamiento es similar, si bien, el HAc no se degradó totalmente y las concentraciones de HPr y HBut no cambiaron significativamente. El FA se degradó rápidamente originando metanol que, de nuevo, se degradó al final del experimento.

En el ensayo T4 con una concentración inicial de FA de 5 mM, se produjo una fase de latencia de tres días durante los cuales no se degradó ninguno de los AGV presentes en el medio. Por el contrario, el FA se degradó de manera continua, generándose metanol que, en este caso, permaneció en el medio (0,87 mM en el día 8). El HAc comenzó a degradarse a partir del día 3, teniéndose el día 8 una concentración de HAc de 593 mg DQO·L<sup>-1</sup>. En el día 3 la concentración de FA y metanol suponían el 10 y 14% del FA inicial, respectivamente; presumiblemente, el resto del FA se había convertido en metano.

En el ensayo T5, con una concentración inicial de FA de 6,67 mM, la degradación de AGV fue muy baja (19% en el día 8), mientras que la degradación de FA fue más lenta (se necesitaron seis días para la degradación completa). El metanol suponía el 30% del FA inicial en el día 8, mientras que el metano generado fue equivalente al FA y AGV convertidos.



**Figura 3.4.** Concentración de HAc (●), HPr (○), HBut (△), CH<sub>4</sub> (□) y DQO<sub>AGV</sub> (■), en mg DQO·L<sup>-1</sup> (A) y de FA (○) y Metanol (●) en mM (B) para los ensayos T1-T5 (condiciones experimentales en la Tabla 3.4).



**Figura 3.4 (continuación).** Concentración de HAc (●), HPr (○), HBut (△), CH<sub>4</sub> (□) y DQO<sub>AGV</sub> (■), en mg DQO·L<sup>-1</sup> (A) y de FA (◆) y Metanol (○) en mM (B) para los ensayos T1-T5 (condiciones experimentales en la Tabla 3.4).

Los ensayos con mayor concentración inicial de FA (T4 y T5) se analizaron todavía hasta el día 30 de operación. En dicho día el metanol, HAc y HBut fueron totalmente degradados, mientras que el HPr únicamente se degradó en el ensayo T4 (alrededor de un 85%).

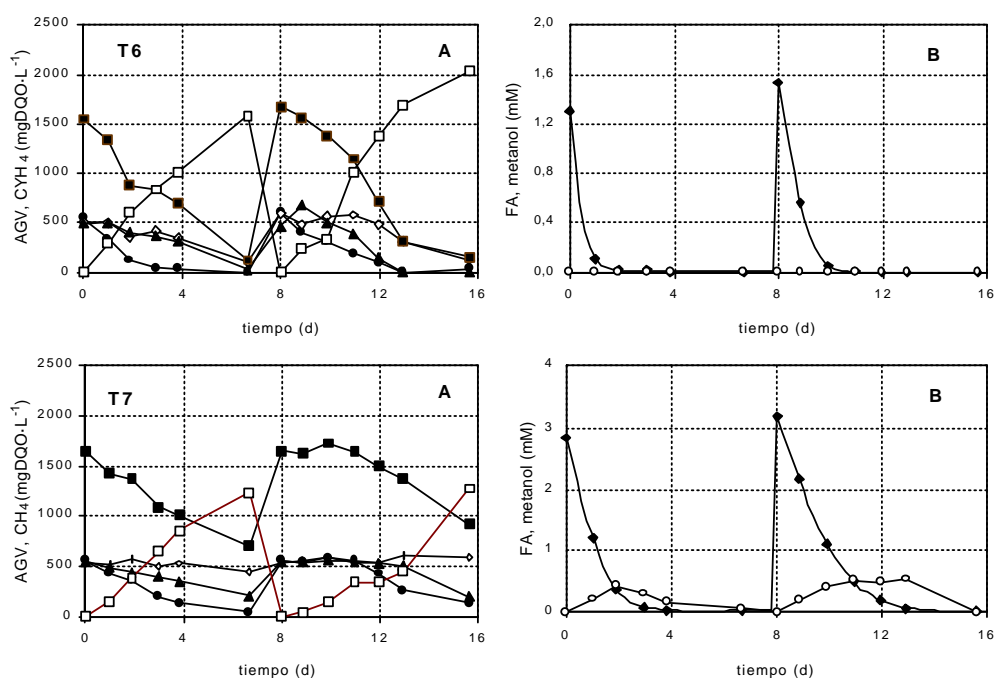
En la Fig. 3.5 se muestra el resultado de los ensayos llevados a cabo con el medio M2 (T6-T9), en los que se emplearon las mismas concentraciones iniciales de FA que las empleadas con el medio M1. En este caso se realizaron dos adiciones.

En el ensayo T6 (concentración inicial de FA de 1,67 mM) el FA se degradó rápidamente (dos días) sin que se apreciara la generación de metanol. Esta

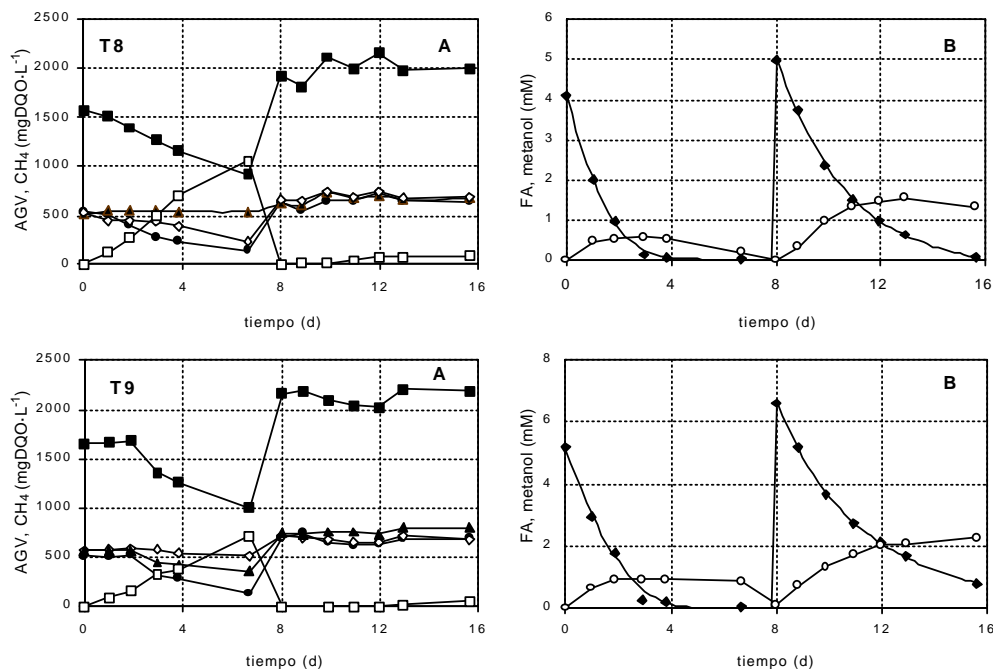


degradación fue más lenta en la segunda adición. La degradación de AGV se produjo de manera continua, degradándose primero el HAc y después el HBut, mientras que el HPr no se degradó en su totalidad.

En el ensayo T7 se vuelve a apreciar un descenso en la velocidad de degradación de FA en la segunda adición. En este ensayo se detectó la presencia de metanol, siendo mayores las concentraciones de este compuesto en la segunda adición, degradándose al final del experimento, cuando las concentraciones de HAc en el medio eran bajas. En la segunda adición se apreció un descenso en la degradación de AGV, siendo su concentración prácticamente constante durante los cuatro primeros días de operación (días 8-12).



**Figura 3.5.** Valores de concentraciones de HAc (●), HPr (○), HBut (△), CH<sub>4</sub> (□) y DQO<sub>AGV</sub> (■), en mg DQO·L<sup>-1</sup> (A) y de FA (◆) y Metanol (○) en mM (B) para los ensayos T6-T9 (condiciones experimentales en la Tabla 3.4)



**Figura 3.5 (continuación).** Valores de concentraciones de HAc (●), HPr (○), HBut (△), CH<sub>4</sub> (□) y DQO<sub>AGV</sub> (■), en mg DQO·L<sup>-1</sup> (A) y de FA (◆) y Metanol (○) en mM (B) para los ensayos T6-T9 (condiciones experimentales en la Tabla 3.4).

En los ensayos con mayor concentración inicial de FA el comportamiento fue muy similar, observándose que durante la segunda adición los AGV no se degradaron y, como consecuencia de ello, la generación de metano fue nula. También se apreció un acusado descenso en la velocidad de degradación de FA durante la segunda adición, que, en el caso del ensayo T9 originó que en el día 16 de operación permaneciera un 12% del FA inicial en el medio. La concentración de metanol en el medio fue mayor en la segunda adición.

En la Tabla 3. 5 se muestran los valores de la actividad y de velocidad de degradación calculados en cada uno de estos ensayos de toxicidad (T1-T9).

Los valores obtenidos en los ensayos en los cuales se realizó una segunda adición (T6-T9) indican que la velocidad de degradación de FA es menor en la segunda adición y también lo es la actividad de degradación de AGV y de generación de metano.

**Tabla 3.5.** Valores de actividad máxima de degradación de AGV, de generación de metano (en  $\text{mg DQO}\cdot\text{g}^{-1}\text{ SSV}\cdot\text{d}^{-1}$ ) y de degradación de FA (en  $\text{mM}\cdot\text{g}^{-1}\text{ SSV}\cdot\text{d}^{-1}$ ) en los ensayos T1-T9 (condiciones experimentales en la Tabla 3.4).

Ensayo	1ª Adición				2ª Adición			
	(FA) <sub>0</sub>	Act <sub>AGV</sub>	Act <sub>CH<sub>4</sub></sub>	Act <sub>FA</sub>	(FA) <sub>0</sub>	Act <sub>AGV</sub>	Act <sub>CH<sub>4</sub></sub>	(v <sub>0</sub> ) <sub>FA</sub>
T1	--	0,69	0,69					
T2	1,62	0,43	0,40	1,66				
T3	3,18	0,40	0,37	2,36				
T4	4,66	0,21	0,23	2,15				
T5	6,26	0,03	0,08	2,41				
T6	1,31	0,23	0,26	1,29	1,54	0,28	0,30	1,39
T7	2,83	0,17	0,22	1,88	3,18	0,11	0,16	1,47
T8	4,09	0,10	0,17	2,05	4,99	0,05	0,03	1,31
T9	5,19	0,11	0,10	1,89	6,63	0,01	0,00	0,93

En los ensayos T10-T13 se empleó el medio M2, realizándose dos adiciones, la segunda de las cuales no contenía FA. En la Tabla 3.6 se muestran los valores de actividades de degradación de AGV y de generación de metano y puede observarse que, para concentraciones iniciales de FA en torno a 1,67 y 3,33 mM, la actividad del lodo aumenta sensiblemente en la segunda adición, cuando el FA no está presente en el medio. Sin embargo, cuando las concentraciones iniciales de FA fueron mayores (ensayos T12 y T13) la actividad del lodo fue nula en la primera adición y el lodo no se recuperó del efecto tóxico causado por el FA, siendo también nula en la segunda adición.

**Tabla 3.6.** Valores de la actividad máxima de degradación de AGV y de generación de metano (en mg DQO·g<sup>-1</sup> SSV·d<sup>-1</sup>) en los ensayos T10-T13 (condiciones experimentales en la Tabla 3.4).

Ensayo	1ª Adición			2ª Adición	
	(FA) <sub>0</sub>	Act <sub>AGV</sub>	Act <sub>CH<sub>4</sub></sub>	Act <sub>AGV</sub>	Act <sub>CH<sub>4</sub></sub>
T10	1,67	0,19	0,25	0,75	0,73
T11	3,62	0,16	0,18	0,31	0,29
T12	4,96	0,00	0,00	0,01	0,00
T13	6,86	0,00	0,00	0,00	0,00

### 3.4. Discusión

#### 3.4.1. Caracterización de la biomasa

Los resultados obtenidos en los ensayos de actividad mostraron que el lodo empleado presentó una actividad metanogénica moderadamente alta en presencia de un sustrato rico en HAc (ensayo A1), si bien esta actividad disminuyó cuando se empleó un medio con una mayor proporción de HPr y HBut (ensayo A2). De todos modos, el grado de aclimatación de este lodo fue grande, a la vista de los valores de actividad metanogénica obtenidos en la segunda adición. En este sentido, cabe destacar el incremento de la actividad que tuvo lugar en la segunda adición del ensayo llevado a cabo con presencia de sulfato en el medio, indicando el desarrollo de actividad sulfato-reductora, como lo confirma el sulfuro de hidrógeno detectado en el biogás generado.

#### 3.4.2. Efecto de los cosustratos en la degradación de formaldehído

Los ensayos de biodegradabilidad mostraron que la degradación de FA generó metanol. Para concentraciones de FA bajas (1,67-3,33 mM), éste se convirtió completamente en metanol y metano. Sin embargo, para concentraciones iniciales de

FA mayores (5-6,67 mM) no se observó generación apreciable de metano, siendo la suma del metanol generado y el FA residual equivalente a la masa inicial de FA.

En presencia de AGV el comportamiento del sistema fue similar. A excepción del ensayo T5 (1,67 mM, medio M2) el metanol se detectó en el medio y se degradó en los ensayos con bajas concentraciones iniciales de FA (cuando la concentración inicial de FA fue 5 mM o mayor el metanol generado no se degradó). En todos los casos se alcanzó la total degradación (o conversión del formaldehído), incluso cuando la concentración inicial fue 6,67 mM, aunque la degradación de los AGV se vio afectada cuando la concentración inicial de FA fue superior a 3,33 mM. Cuando se realizó una segunda adición, la velocidad de degradación del FA disminuyó hasta el punto de que para una concentración inicial de 6,67 mM no se alcanzó la eliminación completa del FA en un período de operación similar al de la primera adición.

En la Fig. 3.6 se muestran los valores de velocidades iniciales de degradación de FA en ausencia de cosustrato (ensayos B1-B4) y en presencia de cosustrato (ensayos T5-T8, dos adiciones). Se puede observar que la presencia de los AGV aumenta el valor de la velocidad inicial, si bien, en la segunda adición, en la cual la degradación del cosustrato fue nula a partir de concentraciones de FA mayores de 3,2 mM, la velocidad disminuye, aproximándose a la obtenida sin cosustrato, para las concentraciones iniciales más elevadas. Estas velocidades se ajustaron al modelo cinético de Monod, obteniéndose los valores de la actividad específica máxima ( $A_{c_m}$ ) y de la constante de afinidad ( $K_s$ ) que se muestran en la Tabla 3.7.

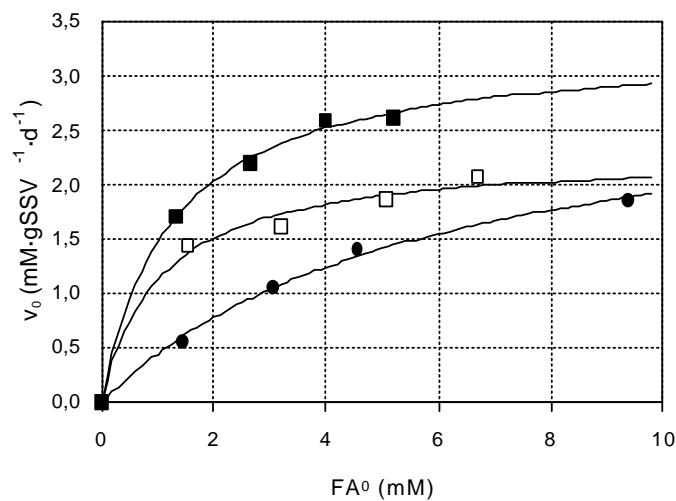
### **3.4.3. Toxicidad del formaldehído en la degradación de los AGV**

El FA ejerce un efecto tóxico sobre la degradación de los AGV, especialmente en el HPr y HBut (comparar Figuras 3.1, 3.4A y 3.5A) lo que sugiere una inhibición selectiva de las bacterias hidrogenotróficas, resultado coincidente con el obtenido por Hickey *et al.* (1987). Solamente se detectó la degradación del HBut a bajas concentraciones iniciales de FA (1,67-3,33 mM), mientras que en el caso del HPr en ningún caso se alcanzaron niveles significativos. El HAC se degradó completamente

cuando se emplearon concentraciones de FA bajas, pero el proceso se vio afectado con una concentración inicial de 3,33 mM.

**Tabla 3.7.** Valor de los parámetros cinéticos calculados en los ensayos B1-B4 y T5-T8 (condiciones experimentales en las Tablas 3.3 y 3.4).

	1ª Adición			2ª Adición		
	$Ac_m$ mmol·g <sup>-1</sup> SSV·d <sup>-1</sup>	$K_S$ mM	$r^2$	$Ac_m$ mmol·g <sup>-1</sup> SSV·d <sup>-1</sup>	$K_S$ mM	$r^2$
B1-B4	3,1	5,9	0,992			
T5-T8	3,3	1,2	0,998	2,3	1,0	0,989

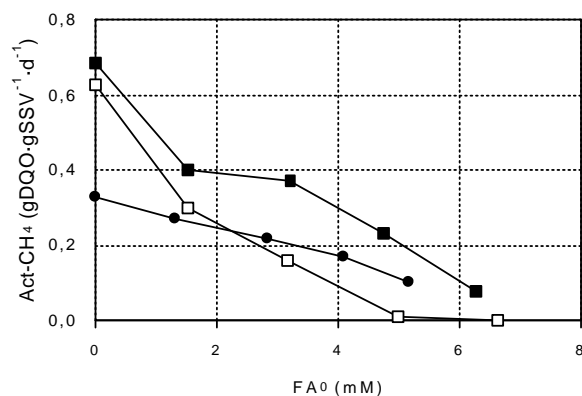


**Figura 3.6.** Velocidad inicial de degradación de formaldehído para distintas concentraciones, en los ensayos B1-B4 (●) y T6-T9 para la 1ª (■) y 2ª (□) adición (condiciones experimentales en las Tablas 3.3 y 3.4).

En la Fig. 3.7 se muestran los valores de actividad metanogénica, en términos de DQO en función de las distintas concentraciones iniciales de formaldehído, para las

mezclas de AGV empleadas (M1 y M2) en sus distintas adiciones. Se puede observar que la concentración de FA que causa un 50% de inhibición en la actividad específica del lodo ( $IC_{50}$ ) ronda los 3,2 mM para el ensayo con la mezcla M1 y los 4,1 mM para la mezcla M2; sin embargo, una segunda adición con el medio M2 disminuye el valor de la  $IC_{50}$  hasta 1,5 mM. Otros autores, operando con sacarosa como cosustrato, obtuvieron valores en torno a 8 mM ( $240 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) usando lodo procedente de una planta de tratamiento de aguas residuales de una industria petroquímica, que disponía de biomasa aclimatada (Todini y Hulshoff Pol, 1992). A pesar de que estos autores sugirieron que el hidrógeno procedente de la degradación acidogénica de sustratos como ácido propiónico o butírico podía favorecer la degradación de formaldehído, en este trabajo no se observó este efecto y el empleo de un medio con alta relación de dichos compuestos (medio M2) provocó una ligera disminución en la velocidad de eliminación de FA. En ensayos llevados a cabo previamente en presencia y ausencia de HPr y HBut se obtuvo el mismo comportamiento (Vidal *et al.*, 1999).

Respecto a la posible reversibilidad del efecto tóxico provocado por el formaldehído, en los ensayos en los que se efectuó una segunda adición de un sustrato formado únicamente por AGV sobre un lodo expuesto a FA (ensayos T10-T13), se comprobó que para concentraciones de FA bajas (que no causan un gran efecto tóxico, 1,67-3,33 mM), la actividad de un lodo se recupera; sin embargo, concentraciones mayores causan gran toxicidad y la actividad no se recupera durante 30 días de operación. En consonancia con estos resultados, González *et al.* (2000) comprobaron que el formaldehído produce la inhibición de la metanogénesis y, a pesar de que a concentraciones de formaldehído inferiores a 1,67 mM la producción de metano se recupera, esta recuperación no es total. Así, encontraron que el grado de irreversibilidad era proporcional a la concentración inicial de biomasa, aunque era independiente de la actividad acetoclástica inicial de la biomasa.



**Figura 3.7.** Actividad metanogénica en función de la concentración inicial de FA para los ensayos con medio M1(T1-T5) (■) y M2 (T6-T9) en su 1<sup>a</sup> (●) y 2<sup>a</sup> adición (□).

#### 3.4.4. Mecanismo de degradación anaerobia del formaldehído

En base a los resultados obtenidos se puede formular la hipótesis de que el formaldehído se transforma, por procesos biológicos anaerobios, en metanol e hidrógeno, que a su vez, dependiendo de la concentración inicial de FA, puede transformarse en metano. Esa hipótesis está en consonancia con trabajos previos en los que se observó que el hidrógeno era un intermedio importante en la degradación del FA (Hickey *et al.*, 1987; Winner y Gottsohalk, 1989). González *et al.* (1999) también proponen que la degradación anaerobia de formaldehído se produce a través de la formación de metanol e hidrógeno molecular.

En los ensayos sin cosustrato hubo siempre presencia de metanol, acumulándose en el medio cuando la concentración inicial de FA fue superior a 3,33 mM. La rápida conversión a metano y las bajas concentraciones de metanol detectados en el ensayo B1 (1,67 mM FA) sugieren que el hidrógeno generado en la conversión del FA fue consumido por la metanización directa y por la formación de metan (reacciones 6 y 2, Tabla 3.8). Como se observó en los ensayos B3 y B4 (no hubo producción de metano) la generación de metanol puede estar favorecida por concentraciones



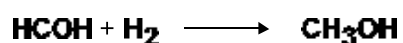
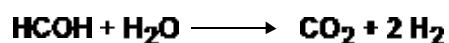
iniciales de FA más altas. En la Tabla 3.8 se muestran las dos posibles reacciones de conversión del FA (reacciones 1 y 2), ambas dependen de la concentración de hidrógeno. A pesar de que la reacción de degradación vía metanol está favorecida termodinámicamente en condiciones estándar, la mineralización del FA por esta vía implica la acción sinérgica de las bacterias metanogénicas metilotróficas (reacción 3, Tabla 3.8), lo cual sugiere una competición entre las reacciones 3 y 6 (Tabla 3.8). De este modo, cuando las bacterias metanogénicas autotróficas están inhibidas y la concentración de hidrógeno empieza a aumentar en el medio, la generación de metanol se hace más favorable, tal y como como confirmaron experimentalmente Todini y Hulshoff Pol (1992).

**Tabla 3.8.** Energías libre de diversas reacciones biológicas relacionadas con la degradación anaerobia de formaldehído, metanol y ácidos grasos volátiles (37 °C).

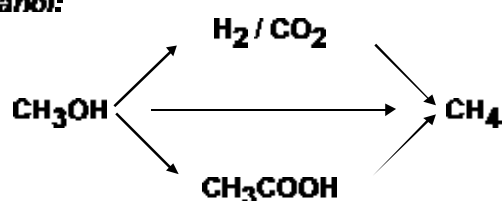
Nº	Reacciones	DG° (kJ)
<b>Formaldehído</b>		
1	$\text{HCOH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{H}_2 + \text{CO}_2$	-27,8
2	$\text{HCOH} + \text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{OH}$	-44,0
<b>Metanol</b>		
Metanogénesis		
3	$4\text{CH}_3\text{OH} \rightarrow 3\text{CH}_4 + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}$	-314,6
Generación de hidrógeno		
4	$\text{CH}_3\text{OH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 3\text{H}_2 + \text{CO}_2$	+23,0
Acetogénesis		
5	$4\text{CH}_3\text{OH} + 2\text{HCO}_3^- \rightarrow 3\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + 4\text{H}_2\text{O}$	-221,6
<b>Hidrógeno y AGV</b>		
6	$4\text{H}_2 + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + 3\text{H}_2\text{O}$	-135,6
7	$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{HCO}_3^-$	-31,0
8	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + 3\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{HCO}_3^- + 3\text{H}_2 + \text{H}^+$	+76,0
9	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^- + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{CH}_3\text{COO}^- + 2\text{H}_2 + \text{H}^+$	+48,1

En presencia de cosustrato (AGV), la velocidad de eliminación del FA se hace mayor, especialmente con el medio M1 (enriquecido en ácido acético), lo que sugiere que este efecto puede estar causado por el HAc, ya que el HPr y el HBut se degradaron muy poco en los ensayos T2-T5 (Figura 5.5). El efecto que ejerce el HAc en la degradación del FA puede estar relacionado con la generación de carbono inorgánico, que permite a las bacterias autotróficas generar metano a partir de hidrógeno bajo condiciones más favorables (reacción 6, Tabla 3.8).

**Formaldehído:**



**Metanol:**



**Figura 3.8.** Posibles rutas de degradación del formaldehído y metanol.

A pesar de que se ha observado que el metanol es el intermedio clave en todos los ensayos, las concentraciones más altas de metanol en el medio se alcanzaron en los ensayos sin presencia de cosustrato (compárense las Figuras 3.3, 3.4 y 3.5). Según estos resultados, parece claro que el metanol se degrada solamente cuando las bacterias metanogénicas no se han visto afectadas por el FA. Según los estudios de Florencio *et al.* (1994), en las condiciones experimentales de estos ensayos (bajas

concentraciones de ácidos grasos volátiles no disociados y metanol), la conversión directa de metanol a metano por parte de las bacterias metanogénicas metilotróficas (reacción 3, Tabla 3.8) debería ser el mecanismo más favorable para la degradación del metanol, en competición con las bacterias acetogénicas (reacción 5, Tabla 3.8), mientras que la vía de generación de metano a través de la formación de hidrógeno no es favorable (ver valores termodinámicos de la Tabla 3.8). Por lo tanto, tanto la conversión directa de metanol a metano como su transformación a acético son las principales vías por las cuales se consume el metanol, ya que ninguna de las dos depende de la concentración de hidrógeno en el medio. En la Fig. 3.8 se resume gráficamente las diferentes vías contempladas.

### 3.5. Referencias

- Bhattacharya S.K. and Parkin G.F. (1988) Fate and effect of methylene chloride and formaldehyde in methane fermentation systems. *Journal of Water Pollution Control Federation*, **60**(4), 531-36.
- Botte H.F. (1991). Anaerobic dihydroxyacetone production from formaldehyde by methanotropic bacteria. *Fac. Landbouwwet. Rijksuniv. Gent.*, **56**, 1769-1775.
- Chou W. (1977). Methane production from the anaerobic treatment of petrochemical wastewater. NSF/GI43864, AER 7413977-AOI, Final report prepared National Science Foundation.
- De Bekker P., Jans T. and Piscaer P. (1983). Anaerobic treatment of formaldehyde containing wastewater. *Anaerobic Waste Water Treatment European Symposium Papers*, 449-463.
- Florencio M., Field J.A. and Lettinga G. (1994). The importance of cobalt for individual trophic groups in an anaerobic methanol degrading consortium. *Applied and Environmental Microbiology*, **60**, 227-234.
- González-Gil G., Kleerebezem R. and Lettinga G. (2000). Formaldehyde toxicity in anaerobic systems. *Water Science and Technology*, **42**(5-6), 223-229.

- González-Gil G., Kleerebezem R., van Aestl A., Zoutberg G.R., Versprille A.I. and Lettinga G. (1999). Toxic effects of formaldehyde. *Water Science and Technology*, **42**(5-6), 223-229.
- Hickey R.F., Vanderwielen J. and Switzenbaum M.S. (1987) The effects of organic toxicants on methane production and hydrogen gas levels during the anaerobic digestion of waste activated sludge. *Water Research*, **21**(11), 1417-1427.
- Hovious J.C. (1973). Identification and control of petrochemical pollutants inhibitory to anaerobic proceses. EPA-R2-73-194, U.S.EPA Washington, D.C.
- Isa Z., Grusenmeyer S. and Verstraete W. (1986). Sulfate reduction relative to methane production in high-rate anaerobic digestion: Technical aspects. *Applied and Environmental Microbiology*, **51**, 572-579.
- Mosey F.E., Swanwick J.D. and Hugues D.A. (1971). Factors affecting the avaliabtility of heavy metals to inhibit anaerobic digestion. *Water Pollution Control*, **70**, 668-680.
- Nash T. (1953)The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzch reaction. *Biochemical Journal*, **55**, 416-421.
- Omil, F., Méndez, R. and Lema, J.M. (1995). Anaerobic treatment of saline wastewaters under high sulphide and ammonia content. *Bioresource Technology*, **54**, 269-278.
- Parkin G.F. and Speece R.E. (1983) Attached versus suspended growth anaerobic reactors: response to toxic substances. *Water Science and Technology*, **15**(8-9), 261-589.
- Parkin G.F., Speece R.E.; Yang, C.H. and Kocher W.M. (1983). Response of methane fermentation systems to industrial toxicants. *Journal of Water Pollution Control Federation*, **55**(1), 44-53.
- Qu M. and Bhattarya S.K. (1997). Toxicity and biodegradation of formaldehyde in anaerobic methanogenic culture. *Biotechnology and Bioengineering*, **55**, 727-736.

- Todini O. and Hulshoff Pol L. (1992). Anaerobic degradation of benzaldehyde in methanogenic granular sludge: the influence of additional substrates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **38**(3), 417-20.
- Veiga M.C., Méndez R. and Lema J.M. (1994). Anaerobic filter and DSFF reactors in anaerobic treatment of tuna processing wastewaters. *Water Science and Technology*, **30**(12), 425-432.
- Vidal G. Jiang Z.P., Omil F., Thalasso F. Mendez R. and Lema J.M. (1999). Continuous anaerobic treatment of waste-waters containing formaldehyde and urea. *Bioresource Technology*, **70**(3), 283-291.
- Winner C. and Gottsohalk G. (1989). H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> production from methanol and formaldehyde by the methanogenic bacterium strain Göl treated with 2-bromoethanesulfonic acid. *FEMS Microbiology Letters*, **65**, 259-264.

## Capítulo 4

### Tratamiento bacteriano de Poly R-478

#### 4.1. Introducción

El tratamiento de efluentes industriales coloreados presenta múltiples problemas, debido fundamentalmente a la variedad y complejidad de las sustancias químicas. Aunque pueden utilizarse técnicas biológicas convencionales para la eliminación de la fracción orgánica biodegradable de estos vertidos (anaerobio, aerobio), en general la eficacia en la eliminación del color es pequeña, debido a que esta propiedad es normalmente consecuencia de la presencia de pequeñas concentraciones de compuestos de naturaleza compleja.

La generación de corrientes residuales coloreadas es común en ciertos sectores industriales, tales como el de refinado de azúcar, textil, imprenta o fotográfica. Los colorantes usados en estos sectores son generalmente resistentes al agua, a los detergentes, a la luz y agentes oxidantes, por lo que su posterior degradación es difícil (Fewson, 1988). El carácter recalcitrante característico de estas sustancias tiene relación con su estructura y peso molecular, siendo los compuestos más difíciles de degradar aquellos que presentan pesos moleculares más elevados y complejas estructuras químicas.

El diseño de un proceso de tratamiento que recoja los principios enunciados en el Capítulo 1 acerca de conseguir una minimización global de su impacto en el medio, junto con una mayor eficacia energética (Fig. 1.1), implica el desarrollo de sistemas de tratamiento específico para cada tipo de corrientes.

En el caso de los efluentes coloreados, esto supondría que antes de proceder a su vertido final, estas corrientes fuesen tratadas en pequeñas unidades situadas cerca de los puntos de emisión. Por ejemplo, mediante un sistema de membranas podría

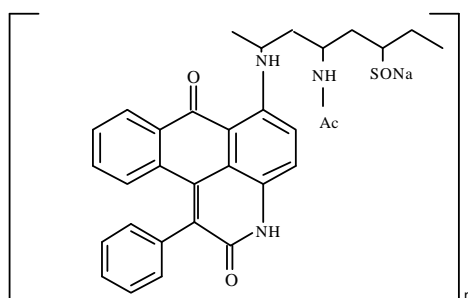
llevarse a cabo la separación de los tintes presentes para generar así una corriente de pequeño caudal altamente concentrada en estas sustancias. La otra corriente, tendría una concentración de colorante lo suficientemente baja como para no requerir ningún tratamiento específico en la estación depuradora final de la factoría.

### **Decoloración de compuestos poliaromáticos: Poly R-478**

Dentro de los tintes poliaromáticos, algunos de los más estudiados son el Poly B-411, Poly R-478 y Poly Y-606, que se han utilizado como sistemas alternativos para la identificación de las rutas de degradación de lignina (Glenn y Gold, 1983). En especial, se ha relacionado la velocidad de degradación del Poly R-478 con la degradación de compuestos xenobióticos, encontrándose que la decoloración de este compuesto es un buen indicador de la transformación inicial que sufre este amplio grupo de sustancias por parte de la enzima peroxidasa, producida por hongos (Field *et al.*, 1993). Adicionalmente, también se han utilizado los estudios referentes a la decoloración del Poly R-478 para evaluar y estimar la capacidad de bioblanqueo de algunos hongos de putrefacción blanca (Moreira *et al.*, 1997).

Por ello se ha elegido el Poly R-478, compuesto poliantrapiridónico, aniónico y de color violeta (Fig. 4.1), para la realización de una serie de ensayos en los que se ha estudiado la decoloración de un tinte industrial, usando, dada su gran complejidad, una tecnología conjunta de tratamiento con hongos y bacterias.

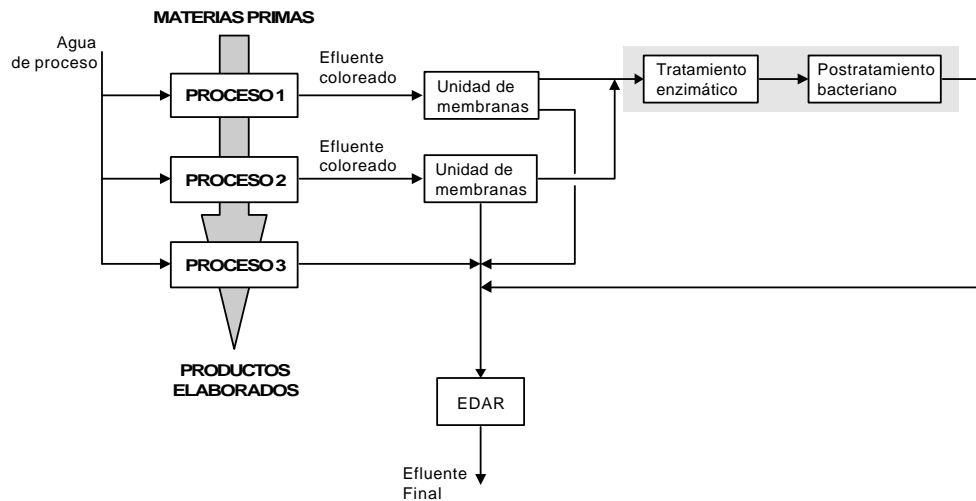
Esta aproximación está justificada en trabajos anteriores, en donde se muestra que las tecnologías de tratamiento anaerobio aplicadas directamente a efluentes con lignina y otros compuestos de alto peso molecular sólo consiguen degradaciones reducidas (en torno a un 50%) (Sierra Álvarez *et al.*, 1991) sin alcanzarse una decoloración significativa. Sin embargo, se ha mostrado que el tratamiento anaerobio de los efluentes industriales generados durante la fabricación de pasta Kraft mejora significativamente si se realiza tras una etapa de pretratamiento en donde se pongan en contacto estos efluentes con micelio y líquido extracelular de *Phanerochaete chrisosporium*. Las degradaciones alcanzadas de esta manera llegan al 79%, observándose asimismo una reducción del color tras el pretratamiento con hongos, algo que no se produce durante el tratamiento anaerobio (Feijoo *et al.*, 1995).



**Figura 4.1.** Estructura química del Poly R-478.

La Fig. 4.2 muestra un esquema de una posible propuesta de tratamiento para aguas residuales que contienen compuestos con una estructura compleja, considerando un tratamiento conjunto con hongos y bacterias. Así, tras la separación de los compuestos coloreados en unidades de membrana, las corrientes concentradas generadas se tratarían en primer lugar en una unidad de tratamiento enzimático, en donde es posible eliminar el color (Moreira *et al.*, 2001) generándose un efluente con concentraciones todavía importantes de materia orgánica ya que contiene los metabolitos generados durante la ruptura de la molécula de tinte. Posteriormente, estos efluentes podrán ser tratados de forma específica en una unidad de tratamiento bacteriano, o bien ser finalmente mezclados con el resto de aguas residuales de la factoría para su tratamiento final en una planta de depuración aerobia convencional con eliminación simultánea de nitrógeno.





**Fig. 4.2.** Tratamiento secuencial “*on site*” de los efluentes coloreados en un reactor con enzimas inmovilizados y procesos bacterianos.

## 4.2. Materiales y Métodos

### 4.2.1. Biomasa y reactivos

En los ensayos bajo condiciones anaerobias se utilizó biomasa procedente de los lodos generados en un reactor anaerobio, a escala piloto, que poseía una factoría dedicada a la fabricación de tableros de madera (TAFISA) y que trataba parte del efluente generado por esta actividad industrial. Este efluente contenía compuestos ligninocelulósicos sin presencia alguna de tintes, por lo cual el lodo utilizado no estaba aclimatado a este tipo de compuestos. Sus características físicas eran las propias de un lodo granular.

En los ensayos llevados a cabo bajo condiciones aerobias, se empleó biomasa procedente de los lodos generados en el tanque aerobio de una planta de tratamiento

de las aguas residuales generadas en la Refinería que la empresa REPSOL tiene en A Coruña.

El Poly R-478 fue proporcionado por Sigma (Madrid, España).

#### **4.2.2. Ensayos en discontinuo en condiciones anaerobias**

Los ensayos se realizaron en botellas de 500 mL de volumen total, con unos 250 mL de volumen útil. Previamente, se pesaron todas las botellas vacías y llenas de agua, con lo cual, por diferencia de pesadas pueden obtenerse los volúmenes de las fases líquida y gaseosa, durante el transcurso del experimento.

Las botellas utilizadas se cerraron con tapones de goma herméticos, a través de los cuales se realizó la toma de muestra de las fases líquida y gaseosa. Las botellas sólo se abrieron al final del experimento.

La concentración de biomasa estuvo en torno a  $1,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de sólidos en suspensión volátiles (SSV). Se añadió un medio de nutrientes para obtener las siguientes concentraciones finales:

Macronutrientes ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ):  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (230),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (37),  $\text{MgSO}_4$  (6),  $\text{CaCl}_2$  (6).

Micronutrientes ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ):  $\text{FeCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (2 000),  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (350),  $\text{ZnCl}_2$  (50),  $\text{CuCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (38),  $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (500),  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (50),  $\text{AlCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (90),  $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (2 000),  $\text{NiCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (92),  $\text{Na}_2\text{SO}_3\cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (164), EDTA (1 000), Resazurina (200) y HCl ( $1 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

Se añadió igualmente  $\text{NaHCO}_3$ , a razón de 1 g: g DQO y, para eliminar el oxígeno disuelto, se añadió  $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$  en concentración de  $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . El pH en las botellas se ajustó a  $7,0\pm 0,1$ , empleando para ello disoluciones de HCl y NaOH. Se hizo pasar una corriente de  $\text{N}_2/\text{CO}_2$  (70:30) a través del espacio libre de las botellas durante 5 minutos para eliminar cualquier traza de oxígeno y aumentar la capacidad tampón del sistema.

La secuencia de operación fue siempre la misma a lo largo de los experimentos: primero se pesan las botellas y se mide la sobrepresión; a continuación se realiza la toma de muestra y, de inmediato, el análisis de la fase gaseosa. Finalmente se hace la

toma de muestra de la fase líquida y se despresurizan las botellas. El objetivo de eliminar la sobrepresión es medir la producción diaria de biogás y, más concretamente de metano. Con esta secuencia de toma de muestra (primero la fase gaseosa y después la líquida) se pretende evitar la alteración en la fase gaseosa que podría tener lugar si se hiciese en el orden inverso.

Se mantuvo la temperatura de operación en el rango mesófilo, esto es, en 37°C, para lo cual se mantuvieron las botellas en una cámara termostaticada. Los ensayos se llevaron a cabo por duplicado.

#### **4.2.3. Ensayos en continuo en condiciones anaerobias**

Los ensayos en continuo, en condiciones anaerobias se llevaron a cabo en tres reactores de vidrio de 135 mL de volumen útil.

Para la alimentación de los reactores se utilizaron bombas Ismatec, modelo MS-CA2 860, con gomas Masterflex 07624-34 de 1,42 mm de diámetro interno, que proporcionan un caudal aproximado de 6 mL·min<sup>-1</sup>. El funcionamiento de las bombas se temporizó para conseguir un TRH de 2 días.

La cantidad de biomasa utilizada en la inoculación de cada reactor fue la precisa para conseguir una concentración de lodo en torno a los 15 gSSV·L<sup>-1</sup>. En los reactores que operaron con medio sintético, la concentración de nutrientes y de bicarbonato en la alimentación fue la misma que la descrita para los ensayos anaerobios en discontinuo. Asimismo, en todos los casos, el pH de la alimentación se ajustó a 7,0.

#### **4.2.4. Ensayos en discontinuo en condiciones aerobias**

Estos ensayos se llevan a cabo en un sistema de fermentador múltiple BIOSTAT® Q (Braun Biotech.). Este equipo posee un sistema de medida y control digital de temperatura, nivel de espuma, nivel del líquido, pH, agitación, potencial redox y porcentaje de oxígeno disuelto. En este caso, el equipo se operó conectado a un PC, desde donde se ejecutaron las órdenes de control y se monitorizaron los parámetros de operación mantenidos.

Los componentes básicos de este sistema son:

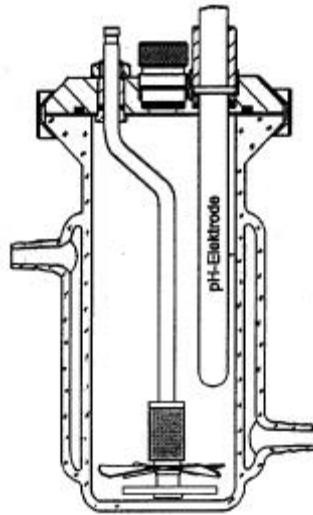
- **Tanques de cultivo**, con un volumen total de 0,5 L y un volumen de trabajo de 0,33 L. Fabricados en vidrio borosilicatado. Todo el tanque está encamisado de forma que puede circular el agua del termostato, manteniendo en todo momento la temperatura fijada. En el equipo se puede trabajar hasta con cuatro tanques de cultivo simultáneamente.

La parte superior del vaso de cultivo está cerrada herméticamente por una tapa de acero inoxidable en donde están situados los puertos para la conexión de los tubos de inoculación y toma de muestra, sensores, entrada de gas al difusor, condensador y salida del efluente (Fig. 4.3).

- **Unidad impulsora**, que es la unidad sobre la que se ubican los tanques de cultivo y las botellas de almacenamiento de las soluciones ácida y básica de regulación de pH. Incluye el soporte y motor para la agitación magnética del medio de cultivo de los tanques.
- **Unidad compacta**, que consta de un sistema de monitorización digital y de una unidad de control digital (DCU).

También consta de un termostato con un sistema de refrigeración de agua, presurización de aire, un sistema de purga de agua, un calentador eléctrico, con una potencia de 1 kW y una bomba que aporta agua caliente (60 °C máximo), para el sistema de control de temperatura, así como un sistema de mezcla de gas que permite un control más preciso del nivel de aireación.

El sistema de control digital (*Digital Control Unit*, DCU) permite la medida y control de la temperatura, velocidad de agitación, nivel de espuma y de medio de cultivo, pH, potencial redox y concentración de oxígeno disuelto. Este sistema de control almacena en memoria todos los parámetros ajustables por el operador, tanto los puntos de consigna como los parámetros de operación; si bien, al estar conectado a un PC, las órdenes de control se introdujeron desde éste y los parámetros se almacenaron en la memoria del PC.



**Figura 4.3.** Esquema de los tanques de cultivo del BIOSTAT® Q.

Todos los lazos del sistema de medida y control actúan como controles DDC (*Digital Direct Control*) mediante un convertidor digital de datos. Los controladores de cada una de las variables anteriores son controladores PID. Los accesorios del sistema de control se resumen en la Tabla 4.1. En la Fig. 4.5 puede verse una fotografía de este equipo.

Los accesorios adicionales del equipo son los siguientes:

- **Bombas.** El equipo dispone de tres bombas peristálticas para la adición de ácido, base y antiespumante. El modo de operación de las bombas es mediante la conversión de los tiempos de dosificación en volúmenes teniendo en cuenta el periodo de impulsión de las mismas y su calibración, en función del diámetro de la tubería empleada.
- **Medidor de pH.** El electrodo de pH (INGOLD, Alemania, P/N 10 405 4480, 405-DPAS-SC-K8S/200) emplea un electrolito que es un gel, de modo que se puede regular la presión en su sección, lo cual le da muchas ventajas para

su utilización en medios de cultivo con presiones de operación de hasta 2,5 bares.

Tabla 4.1 Sistema de control y sensores del biorreactor BIOSTAT® Q.

Sistema de control	Sensor
Temperatura	Termómetro, Sonda Pt-100
Nivel de espuma	Sonda de espuma
Nivel de medio de cultivo	Sonda de nivel
PH	Electrodo de pH, INGOLD
Potencial de redox	Electrodo de redox, INGOLD
Presión parcial de oxígeno	Electrodo de oxígeno disuelto, INGOLD

- **Sistema de toma de muestra.** El biorreactor BIOSTAT® Q está dotado de un dispositivo manual de toma de muestra que consiste en un tubo de muestra con un soporte y una jeringa a la que se le puede adaptar un filtro estéril para evitar cualquier contaminación del exterior.
- **Medidor de oxígeno disuelto.** Para la medida de oxígeno disuelto se emplea un electrodo polarográfico de O<sub>2</sub> esterilizable (INGOLD, P/N 34 100 1032,n O2-SENSOR-12/220). Consta de un ánodo de plata y un cátodo de platino que están separados del medio de cultivo por una membrana de polímero permeable al paso de gas. El ánodo y el cátodo están conectados entre sí, mediante un electrolito que forma una capa delgada entre la membrana y el ánodo. La permeabilidad de la membrana depende de la temperatura, sin embargo, para corregir un posible aumento en la corriente del electrodo cuando aumenta la temperatura del medio se incorpora un *termistor* integrado en el electrodo que compensa automáticamente este efecto.
- **Disolución de ácido y base.** Como disolución de ácido y base para la corrección del pH se emplearon soluciones de HCl y NaOH 1 M.

En la Figs. 4.4 y 4.5 se muestra un esquema y una fotografía del equipo.

### Condiciones de operación

La velocidad de agitación empleada fue de 129 rpm, el caudal de aireación  $0,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ , la temperatura de operación  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ , el pH  $7,0\pm 0,1$ , la concentración de lodo empleada fue de  $5 \text{ gSSV}\cdot\text{L}^{-1}$ .

El medio de nutrientes fue (en  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ):  $\text{NH}_4\text{SO}_4$  (280),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (280),  $\text{NaCl}$  (140),  $\text{CaCl}_2\cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (196) y  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (140), siendo estas las cantidades de cada sustancia presentes en el medio de reacción.

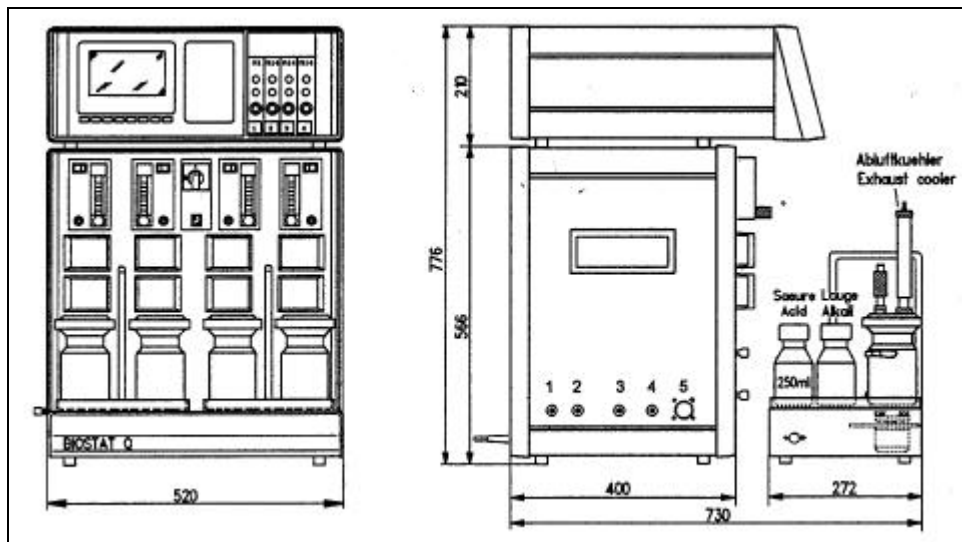


Figura 4.4. Esquema del BIostat® Q.



**Figura 4.5.** Foto del BIostat® Q.



#### **4.2.5. Medida de color**

Uno de los problemas inherentes a la medida de la pérdida de color debida a una degradación biológica es que puede tener lugar simultáneamente una adsorción física de la sustancia coloreada, con lo cual los resultados podrían verse alterados. El Poly R-478 presenta dos máximos de absorbancia en su espectro UV-VIS característico, uno a 520 nm (causante del color) y otro a 350 nm. Glenn y Gold (1983) observaron que tras una absorción de este compuesto sobre unos pellets, la absorbancia en ambas longitudes de onda disminuía en igual proporción, mientras que si se produce una degradación biológica se produce un descenso notable en la absorbancia a 520 nm, manteniéndose prácticamente constante la absorbancia a 350 nm.

Por ello, el color se mide como el valor de la absorbancia de la muestra, tras ser centrifugada durante 10 minutos a 8 000 rpm, a 520 nm, si bien, en los casos en los que se detecte un descenso en este valor, se compara también el valor de la relación de absorbancias  $A_{520}/A_{350}$  para comprobar si se trata o no de una degradación biológica.

### **4.3. Resultados**

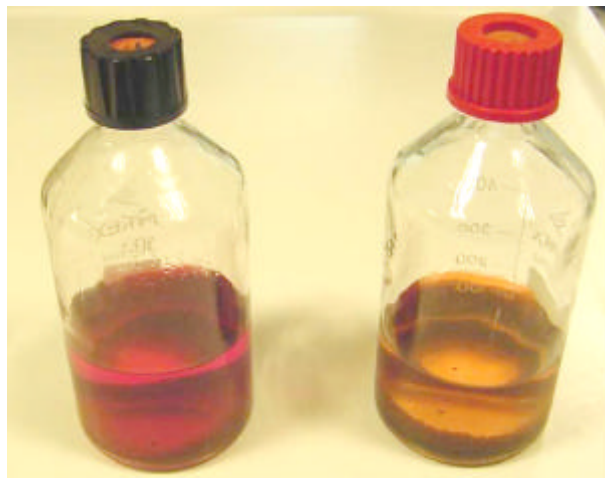
#### **4.3.1. Ensayos en discontinuo en condiciones anaerobias**

Se realizaron ensayos tanto con Poly R-478 como con el efluente de un reactor de tratamiento con hongos que trataba este compuesto, estando parcialmente decolorado. En la Fig. 4.6 puede verse la apariencia de ambos medios.

En los ensayos que se llevaron a cabo directamente con Poly R-478 se empleó una concentración inicial de  $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , usándose glucosa como cosustrato, con una concentración de  $2800 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . En los ensayos llevados a cabo con el tinte ya parcialmente decolorado no se añadió glucosa ya que el efluente tenía una cierta concentración de este compuesto. La dilución del efluente del reactor de hongos en las botellas en las que se llevaron a cabo los ensayos fue de 1:3.

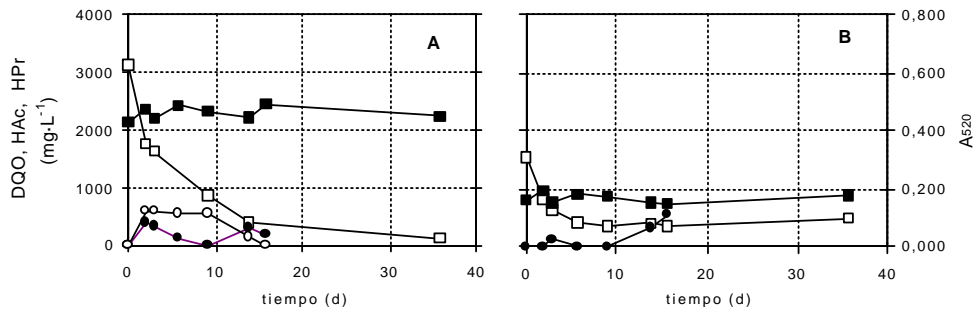
Como se muestra en la Fig. 4.7, en ninguno de estos dos tipos de ensayos se consiguió decolorar el Poly R-478, a pesar de la larga duración de los ensayos. En la

Fig. 4.8 se puede apreciar que la absorbancia de las muestras a 520 nm no varía, a pesar de que la absorbancia en la zona ultravioleta sufre variaciones. Así, por ejemplo, el pico de absorbancia que hay hacia los 230 nm en el día 16 tiene menor absorbancia que en el día 0. Asimismo, en el ensayo con Poly R previamente tratado, el pico de absorbancia a 350 nm no aparece en el día 16 (Fig. 4.8B).

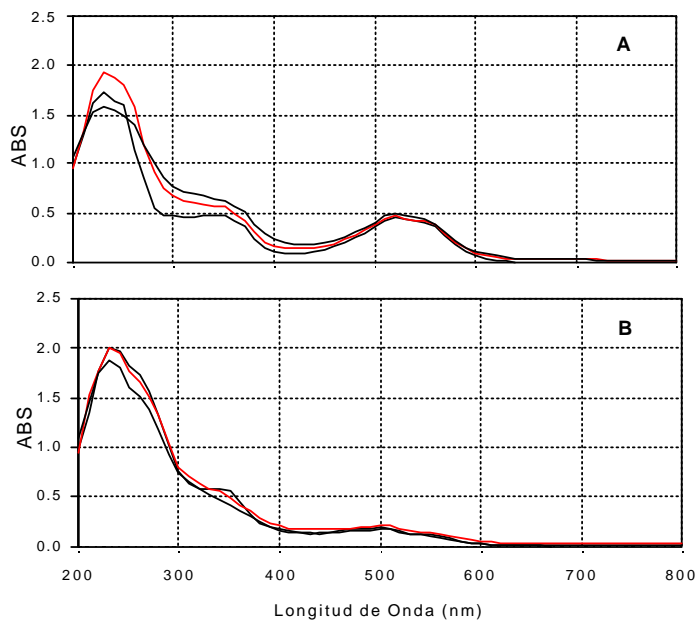


**Figura 4.6.** Imagen de un ensayo anaerobio con Poly R-478 (izquierda) y con efluente de un reactor de tratamiento con hongos (derecha).

El Poly R-478, sin embargo, no parece ejercer un efecto tóxico importante sobre la actividad metabólica de las células ya que, en el caso del ensayo con Poly R-478 los ácidos grasos volátiles generados de la degradación de la glucosa se consumieron tras 16 días. En el ensayo llevado a cabo con efluente de hongos, sin embargo, permanece una DQO residual de  $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  que, junto con el Poly R-478 no degradado, también puede corresponder a los productos generados en la decoloración de una fracción del Poly R-478, o a alguna otra sustancia proveniente del metabolismo de los hongos.



**Figura 4.7.** Valores de color (■) y concentración de DQO (□), ácido acético (●) y ácido propiónico (○) para el ensayo con Poly R-478 (A) y el ensayo con efluente parcialmente decolorado (B).



**Figura 4.8.** Espectros de absorción UV-VIS para las muestras tomadas en los días 0 ( ), 9 ( ) y 16 (—) en el ensayo con Poly R-478 (A) y en el ensayo con efluente previamente tratado mediante hongos (B).

En base a este último punto, se realizó un nuevo ensayo con el efluente del reactor de tratamiento de Poly R-478 con hongos en el cual, una vez consumida la DQO biodegradable, se volvió a alimentar glucosa para obtener una concentración similar a la que había al principio del ensayo. Puede verse en la Fig. 4.9 que, en este ensayo, la desaparición de DQO biodegradable fue más rápida en las sucesivas adiciones, por lo que también se puede descartar cualquier efecto tóxico producido por el efluente del reactor de hongos. En este ensayo tampoco hubo eliminación de color por parte de las bacterias anaerobias.

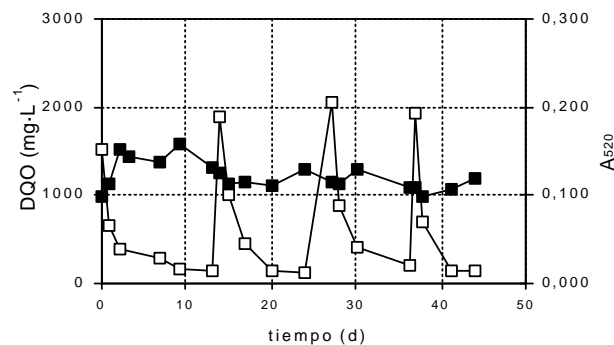
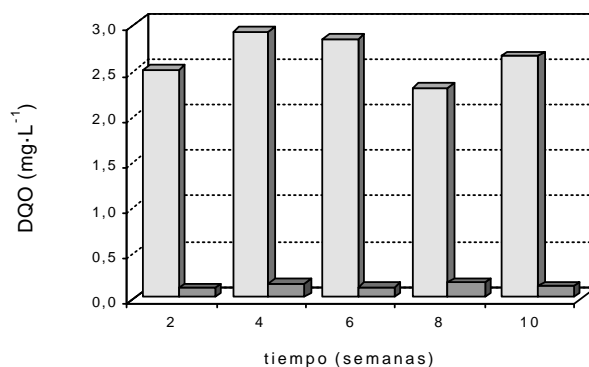


Figura 4.9. Valores de color (■) y concentración de DQO (□).

#### 4.3.2. Ensayos en continuo en condiciones anaerobias

El primer reactor (R1) operó con un influente de  $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de Poly R y  $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de glucosa, y un tiempo de residencia en torno a 2 días. Se obtuvieron unos niveles de eliminación de DQO siempre por encima del 95% (Fig. 4.10). Comparando esta eficacia con la obtenida en un reactor empleado como blanco, que operó en las mismas condiciones que el reactor R1, pero sin alimentar Poly R-478, y que estuvo en torno al 98%, puede considerarse que no hubo efecto tóxico del Poly R-478, ya que la pequeñísima diferencia que hubo en los porcentajes puede considerarse debida a la DQO aportada por el tinte.

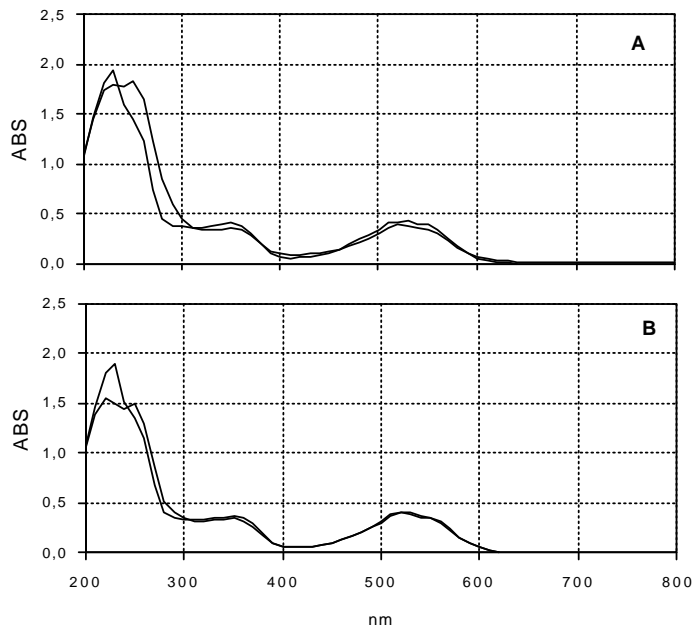


**Figura 4.10.** Valores medios de concentración de DQO para las corrientes de entrada (□) y salida (■) del reactor R1.

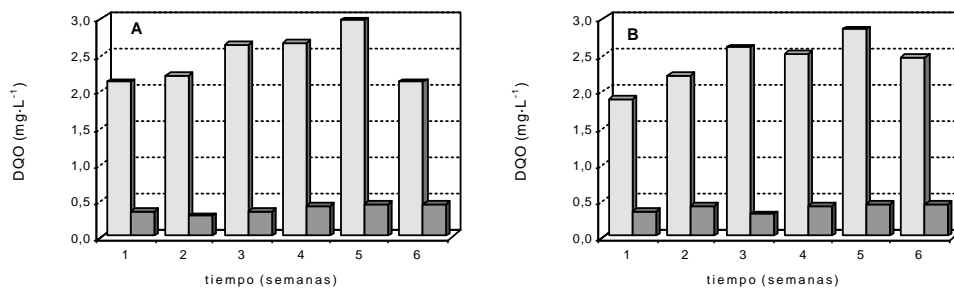
Los valores de color obtenidos durante los 80 días de operación de este reactor muestran que no se produjo la decoloración del Poly R-478. Por ejemplo, los espectros de absorción UV-VIS correspondientes a los días de operación 29 y 34 (Fig. 4.11) muestran que no se altera el pico de máxima absorbancia correspondiente al visible (480 nm).

En otros dos reactores (R2, R3) se trabajó con el efluente proveniente de un reactor de tratamiento con hongos, en donde se había eliminado una fracción de color de un 40%. Durante la operación en ambos reactores se alcanzaron valores de eliminación de DQO de entre un 80-85% (Figs. 4.12).

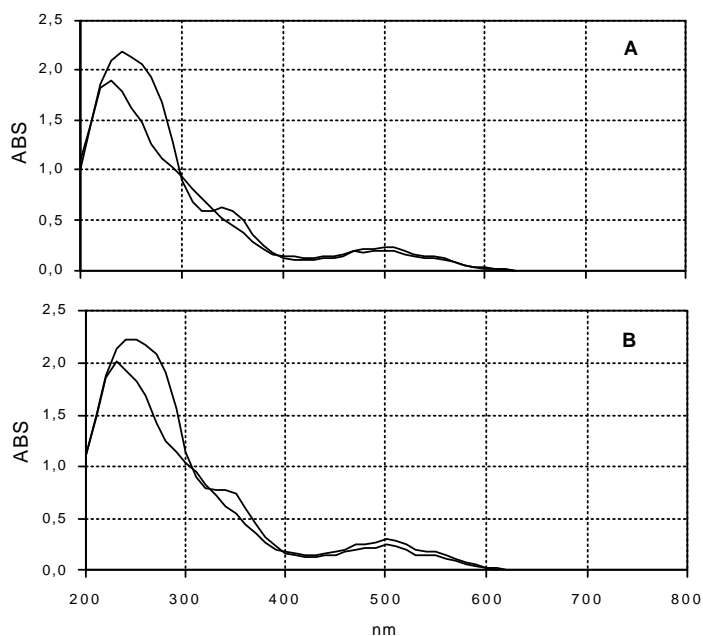
En las Figuras 4.13 y 4.14 pueden observarse los espectros de absorción UV-VIS correspondientes al influente y efluente, en distintos días de operación de estos reactores. En ambos casos se aprecia que la absorbancia de las muestras de efluente por debajo de los 400 nm es bastante inferior a la de las muestras de influente, desapareciendo el pico de absorbancia de los 350 nm. Sin embargo, no se aprecia eliminación de color y, aunque en la Fig. 4.14A se aprecia un descenso de color en el



**Figura 4.11.** Espectros de absorción UV-VIS para las muestras de influente ( ) y efluente (—) del reactor R1 tomadas los días 29 (A) y 34 (B) de operación.



**Figura 4.12.** Valores de concentración de DQO para las corrientes de entrada ( ) y salida ( ) de los reactores R2(A) y R3 (B).

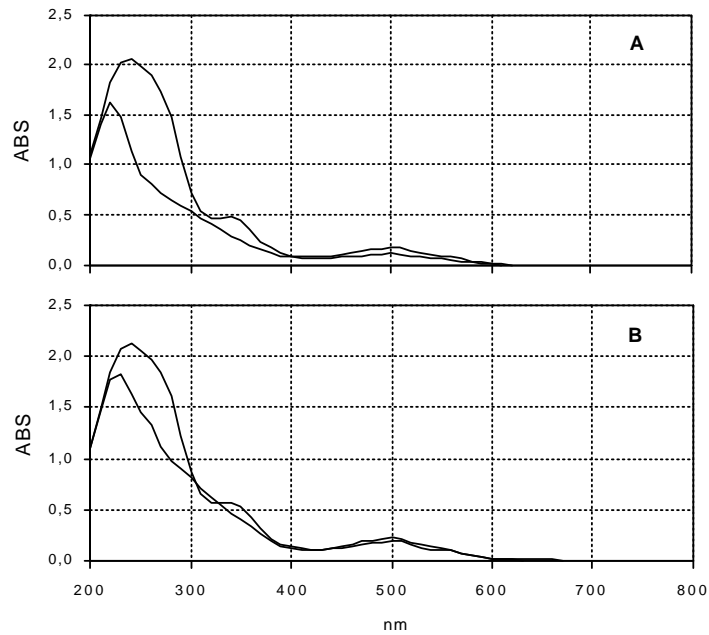


**Figura 4.13.** Espectros de absorción UV-VIS para las muestras de influente( ) y efluente (—) del reactor R2 tomadas los días 27 (A) y 40 (B) de operación.

efluente, no se trata de una tendencia que se mantenga, como se puede observar en la Fig. 4.15B.

#### 4.3.3. Ensayos en discontinuo en condiciones aerobias

Estos ensayos se llevaron a cabo en los cuatro fermentadores descritos previamente. En dos de ellos se trabajó con una disolución de  $50 \text{ mg:L}^{-1}$  de Poly R-478, mientras que en los otros dos se empleó efluente de un reactor de tratamiento con hongos, en el cual el Poly R-478 estaba parcialmente decolorado. Una vez eliminada la DQO biodegradable, se detenía la operación, dejando decantar el lodo y retirando el sobrenadante con una trompa de vacío, para realizar una nueva adición, según una técnica SBR (*Sequencing Batch Reactor*).



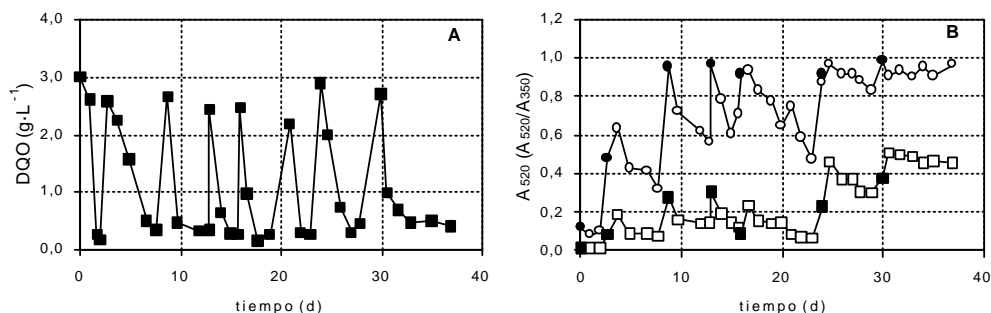
**Figura 4.14.** Espectros de absorción UV-VIS para las muestras de influente( ) y efluente (—) del reactor R3 tomadas los días 28 (A) y 39 (B) de operación.

En los ensayos con tinte no tratado, se emplearon  $2,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de glucosa como cosustrato. En estos ensayos la DQO se degradó rápidamente en 2-3 días, quedando un valor de residual en el medio de  $0,2\text{-}0,4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Fig. 4.15A). Con respecto al color, hay que decir que en las dos primeras adiciones el tinte se adsorbió sobre la biomasa, por lo cual el color resultante fue prácticamente nulo. A partir de la cuarta adición podría considerarse que el lodo estaba saturado ya que en las sucesivas adiciones el valor alcanzado inmediatamente tras su inyección, en términos de relación de absorbancias, fue prácticamente constante. Sin embargo, atendiendo al valor de



absorbancia a 520 nm, éste siguió incrementándose en las sucesivas adiciones e, incluso en algunos casos alcanzaba su valor máximo un día después de la adición.

En la 4ª y 5ª adición se observa que hay una reducción de color. Según las hipótesis de Glenn y Gold (1983), los valores de  $A_{520}/A_{350}$  confirman que se trataría de un proceso de degradación. En las posteriores adiciones, los valores medidos permanecen relativamente estacionarios, si bien, los valores de absorbancia medidos a 520 nm son superiores a los alcanzados en las anteriores adiciones y son más acordes a los correspondientes a la concentración de  $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (ver Fig. 4.7A), lo cual podría indicar que en este punto se alcanzó la saturación en lo concerniente a la capacidad de adsorción del tinte sobre el lodo.

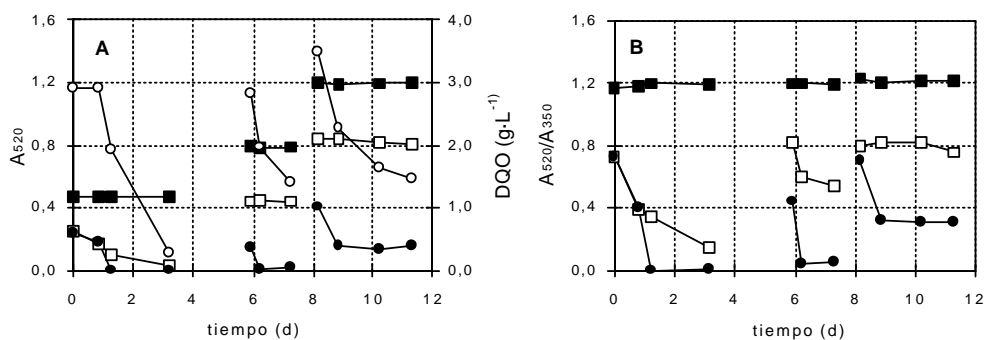


**Figura 4.15.** A: Valores de concentración de DQO (■). B: Medida de color como  $A_{520}$  (□) y  $A_{520}/A_{350}$  (○). Los puntos negros en la figura B corresponden a los valores tras la adición.

Para comprobar si las reducciones de color apreciadas en dichas adiciones se deben a un proceso de adsorción sobre el lodo, se realizó un ensayo en recipientes de 500 mL conectados a un circuito de aireación. Se llevaron a cabo tres ensayos distintos, en uno de ellos (ensayo PR1) se introdujo Poly R-478 en concentración de  $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , junto con el medio de nutrientes; en otro ensayo (ensayo PR2) se añadió además lodo aerobio en la misma concentración que la empleada en los ensayos en los fermentadores; en el tercer ensayo (ensayo PR3), además del Poly R-478, los nutrientes y el lodo, se añadió glucosa en concentración de  $2,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , de manera que

las condiciones de este ensayo fueron las mismas que las llevadas a cabo en dos de los fermentadores.

La Fig. 4.16 muestra los resultados de estos ensayos. Mientras que en el ensayo que contenía solamente Poly R-478 (ensayo PR1) no hubo ninguna variación de color, en el ensayo con lodo sin glucosa hubo adsorción del tinte en la primera adición, si bien, en las dos siguientes ya no hubo adsorción, al menos, según el valor medido de absorbancia a 520 nm. En el caso del ensayo con presencia de lodo y glucosa (ensayo PR2), en las tres adiciones hubo reducción de color, que coincide en el tiempo con el momento en el cual la degradación de la DQO es mayor. Podría considerarse entonces que, la reducción de color es debida a la adsorción sobre el lodo, ya que en el caso de añadir glucosa, ésta se degrada rápidamente permitiendo así el crecimiento de los microorganismos con el consiguiente aumento de la superficie de adsorción. Esto contrasta con el ensayo en el que no hay glucosa ya que, en este caso, al no haber crecimiento bacteriano por la ausencia de sustrato biodegradable, la saturación de la superficie de adsorción se produce en la primera adición y en las siguientes no hay variación de color.



**Figura 4.16.** Valores de absorbancia a 520 nm (A) y de la relación de absorbancias  $A_{520}/A_{350}$  (B) para los ensayos PR1 (■), PR2 (□) y PR3 (●) y valores de DQO para el ensayo PRLG (○).

En el ensayo llevado a cabo en los otros dos fermentadores, se adicionó efluente de un reactor de tratamiento con hongos (dilución 1:3) en el cual el Poly R-478 estaba parcialmente decolorado (40% sobre una concentración inicial de  $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). No se añadió glucosa ni nutrientes ya que dicho efluente ya contenía cantidades suficientes de ambos.

La DQO se degradó rápidamente en 1-2 días, permaneciendo en el medio un valor residual de  $0,1-0,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Figura 4.17A). No se produjo descenso apreciable en los valores de color, medidos como absorbancia a 520 nm.

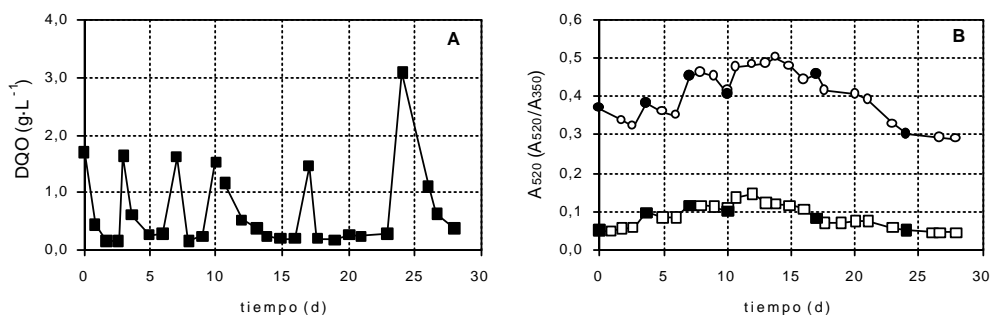
## **4.4. Discusión**

### **4.4.1. Ensayos en discontinuo en condiciones anaerobias**

En estos ensayos no se produjo eliminación de color. Puede apreciarse en la Fig. 4.8 que el espectro de absorción en la zona del visible no varía, ni siquiera cuando se utilizó el efluente del reactor de hongos, con una fracción de Poly R-478 parcialmente fraccionado en compuestos de menor peso molecular (Palma *et al.*, 1999). Sin embargo, en este caso, pese a no observarse reducción de color, puede producirse algún cambio estructural en el Poly R, ya que el pico de absorbancia a 350 nm, característico de este compuesto, desaparece (Fig. 4.8B).

Pese a no ser degradado, el Poly R-478 no ejerce toxicidad sobre los microorganismos anaerobios, ya que la DQO al final del ensayo con Poly R estaba en torno a los  $120 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . En el ensayo con efluente parcialmente decolorado, la DQO al final del ensayo estaba en torno a  $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . La concentración de glucosa de este efluente estaba en torno a  $2\,500-3\,000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , que tras aplicar una dilución 1:3 para realizar el ensayo se quedan en  $800-1\,000 \text{ mg DQO}\cdot\text{L}^{-1}$ . La DQO restante, hasta completar los  $1\,500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  iniciales, debe estar proporcionada tanto por el Poly R que no se ha degradado, como por compuestos de menor peso molecular resultantes de la degradación e, incluso algún compuesto generado en el proceso metabólico de los hongos. Esta fracción de DQO parece que permanece invariable, en torno a  $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (Fig. 4.7B), sin embargo, en un ensayo realizado posteriormente, con

adiciones sucesivas de glucosa, se alcanzaron niveles de DQO en el medio de sólo  $150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (Fig. 4.9). Esto indica que tampoco hay toxicidad en el caso de trabajar con un efluente de tratamiento con hongos.



**Figura 4.17.** (A) Valores de concentración de DQO (■) y (B) B: Medida de color como  $A_{520}$  (□) y  $A_{520}/A_{350}$  (○). Los puntos negros en la figura B corresponden a los valores tras la adición.

#### 4.4.2. Ensayos en continuo en condiciones anaerobias

Al tratar Poly R en sistemas anaerobios en continuo tampoco se apreció eliminación de color y el espectro de absorción UV-VIS no sufrió variaciones en la zona del visible (360-800 nm) (Fig. 4.11). La eliminación de DQO, en cambio, fue alta, manteniéndose en valores en torno al 95%.

Cuando se operó con efluente parcialmente decolorado, resultante del tratamiento de Poly R en un reactor de hongos, tampoco se apreció eliminación de color. Observando los espectros de absorción UV-VIS (Figs. 4.13 y 4.14), hay alteraciones en la parte correspondiente a la zona ultravioleta (200-360 nm), desapareciendo el pico de absorbancia característico del Poly R a 350 nm. La concentración de DQO a la salida de los reactores, cuando operaron con efluente del reactor de hongos, se mantuvo entre  $0,4-0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Esto implica que no hay eliminación de la DQO aportada por otros compuestos distintos de la glucosa.

#### 4.4.3. Ensayos en discontinuo en condiciones aerobias

En los ensayos llevados a cabo con el efluente del reactor de hongos, atendiendo exclusivamente a los valores medidos de color ( $A_{520}$ ), no hubo ningún descenso significativo en ninguna de las adiciones. La DQO descendió rápidamente, después de cada adición, estabilizándose en valores en torno a 0,2-0,3 g·L<sup>-1</sup>.

Por lo que respecta a los ensayos con Poly R, se produjo una eliminación de color, aunque es difícil poder discernir entre mecanismos físicos y biológicos. En las primeras adiciones los valores medidos de color fueron muy bajos, debido a que el tinte se adsorbió sobre el lodo. El principal problema es saber cuando se ha saturado toda la superficie de adsorción para poder, a partir de ese momento, considerar la posibilidad de una eliminación biológica. Si se toma como referencia el valor de la absorbancia del Poly R a 520 nm, para una concentración aproximada de 50 mg·L<sup>-1</sup>, que es de 0,45-0,50 (Fig. 4.7A), se puede considerar que, cuando se alcanza este valor, todo el Poly R que se añade al medio (50 mg·L<sup>-1</sup>) se encuentra disuelto. Este valor se alcanza después de la 7ª adición (ver Fig. 4.17B), en la cual, dicho valor permanece constante en el transcurso del tiempo.

Esta última observación parece indicar que todas las reducciones en el color después de las distintas adiciones se deben a procesos de adsorción y no a una eliminación biológica. De todos modos, el crecimiento bacteriano de los microorganismos aerobios aumenta la superficie de adsorción. Este crecimiento, a la vista de la evolución de la DQO en las distintas adiciones, se produciría en todas ellas, incluida la 7ª, por lo cual también debería haberse producido un descenso en el color.

Si la eliminación de color fuese la consecuencia de un proceso de adsorción, esto iría en dirección opuesta a lo observado por Glenn y Gold (1983), según los cuales la relación de absorbancias  $A_{520}/A_{350}$  es la que define cuando estamos ante una eliminación biológica o física. Sin embargo, en estas experiencias también se produce una reducción de dicha relación.

En los ensayos complementarios PR1-PR3, cuando hay Poly R, el color permanece constante, sumándose en las sucesivas adiciones, y el valor de  $A_{520}/A_{350}$  es constante. Cuando hay lodo, en la primera adsorción se adsorbe prácticamente todo el Poly R,

saturando la superficie disponible, ya que en la siguiente adición el valor obtenido para el color es el correspondiente a  $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  y permanece constante. Cuando se adiciona también glucosa, el Poly R desaparece en las dos primeras adiciones, reduciendo su valor a la mitad en la tercera. Esta disminución va acompañada de la degradación de la DQO y, en consecuencia, el crecimiento microbiano y el aumento en la superficie de adsorción. Quizás el hecho de que el valor de color se estanque y no siga disminuyendo, puede inducir a pensar que se trata de una adsorción y no una degradación biológica.

Estos resultados también ponen en duda los postulados de Glem y Gold (1983) acerca de la utilidad de la relación  $A_{520}/A_{350}$  para determinar si la decoloración es debida a una degradación biológica o a una adsorción, ya que, por ejemplo en el ensayo PR2, en el cual no se adicionó sustrato biodegradable para favorecer la actividad exógena de los microorganismos, atendiendo a los valores obtenidos para la relación  $A_{520}/A_{350}$ , en las dos primeras adiciones debería de haberse producido una decoloración biológica según estos postulados, teniendo en cuenta que, incluso en la segunda adición no hubo descenso en la absorbancia a 520 nm, resulta difícil mantener este postulado, al menos bajo la óptica de estos resultados experimentales.

#### 4.5. Referencias

- Feijoo G., Vidal G., Moreira M.T., Méndez R. and Lema J.M. (1995). Degradation of high molecular weight compounds of Kraft pulp mill effluents by a combined treatment with fungi and bacteria. *Biotechnology Letters*, **11**, 1261-1266.
- Fewson C.A. (1988). Biodegradation of xenobiotic and other persistent compounds: the causes of recalcitrance. *Trends in Biotechnology*, **6**, 148-153.
- Field J.A., de Jong E., Feijoo-Costa G. and de Bont J.A.M. (1993). Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotic. *Trends in Biotechnology*, **11**, 44-49.

- Glenn J.K. and Gold M.H. (1983). Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, **45**(4), 1741-1747.
- Moreira M.T., Feijoo G., Sierra R., Lema J. and Field J. (1997). Biobleaching of oxygen delignified Kraft pulp by several white rot fungal strains. *Journal of Biotechnology*, **53**, 237-251.
- Moreira M.T., Palma C., Mielgo I., Feijoo G. and Lema J.M. (2001). In vitro degradation of polymeric dye (Poly-R) by manganese peroxidase. *Biotechnology and Bioengineering*, **75**(3), 362-368.
- Palma C., Moreira M.T., Mielgo I., Feijoo G. and Lema J.M. (1999). Use of fungal bioreactor as a pretreatment or post-treatment step for continuous decolorization of dyes. *Water Science and Technology*, **40**(8), 131-136.
- Sierra Álvarez R., Kortekaas S., van Eekert and Lettinga, G. (1991). The anaerobic biodegradability and methanogenic toxicity of pulping waste-waters. *Water Science and Technology*, **24**, 113-125.

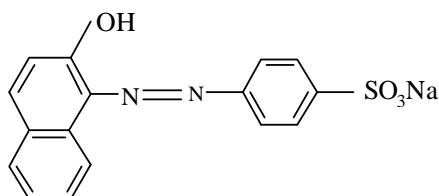
## Capítulo 5

### Biodegradación anaerobia de l tinte azo

#### *Acid Orange 7* en discontinuo

##### 5.1. Introducción

El *Acid Orange 7* (C.I. 15510), también conocido como Orange II, [1-(4'-sulfofenilazo)-2-naftol], es un tinte azo (Fig. 5.1) muy conocido desde hace muchos años, barato pero sólo moderadamente rápido en el proceso de tinción. Como tinte para lanas pasó a tener un papel secundario, sin embargo se siguió usando en otras áreas tales como la tinción de pieles o de papel. También se empleó como colorante en alimentos, así, un estudio reciente llevado a cabo en Honk Kong reveló que el *Acid Orange 7* se encontraba en algunos alimentos (comida vegetariana, productos de repostería) a pesar de estar prohibido para tal fin desde 1994 (Food and Environmental Hygiene Department HKSAR, 2000).



**Figura 5.1.** Estructura del *Acid Orange 7* (AO7).

El tratamiento anaerobio del AO7 provoca la rotura del enlace azo, generándose aminas aromáticas. Dada la estructura del AO7 las aminas resultantes serían el Ácido Sulfanílico (AS) y el 1-Amino-2-naftol (1A2N).



Hay numerosos estudios sobre la degradación de este compuesto, en discontinuo, tanto biológica como no biológica.

En referencia a estudios sobre la eliminación de AO7 mediante métodos químicos, Bandar *et al.* (1997) estudiaron los parámetros que influían en el proceso de oxidación fotoasistida, basada en la reacción de Fenton, del AO7. Los agentes químicos usados para llevar a cabo esta reacción son el peróxido de hidrógeno y el tricloruro de hierro. Con pH inferior a 5, consiguieron mineralizar el 88% del AO7 en 40 minutos bajo irradiación de luz.

Liakou *et al.* (1997) estudiaron la oxidación de AO7 usando ozono, consiguiendo la eliminación de  $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de AO7 en 100 minutos. Los productos identificados como intermedios generados en el proceso de oxidación fueron oxalato, formiato y bencenosulfonato.

Existen varios precedentes en el tratamiento biológico bacteriano del AO7, especialmente en condiciones anóxicas y anaerobias. En estas condiciones el enlace azo del AO7 se rompe generándose aminas aromáticas.

Wuhrmann *et al.* (1980) eligieron varios tintes derivados de la estructura 1-fenilazonaftol (entre los cuales estaba el AO7) para estudiar cómo afectaban a su velocidad de reducción distintos factores, tales como temperatura, pH, tipo y concentración de cosustrato o presión parcial de oxígeno. Para ello, usaron cultivos de *Bacillus cereus* aislados de un lodo, y otras bacterias aerobias o facultativas, bajo estrictas condiciones de anoxia. Tras llevar a cabo ensayos con extracto celular y comprobar que las velocidades de degradación de los tintes eran muy superiores a las alcanzadas con las células enteras, así como que la velocidad de degradación era muy similar para todos los tintes empleados (a diferencia de lo que ocurría al emplear células enteras), postularon que se confirmaban las hipótesis de Gingell y Walker (1971) en las que se decía que la reducción de los compuestos azo era un proceso intracelular, no enzimático, producido por el efecto de los flavin nucleótidos reducidos. En base a esto, la etapa limitante de la velocidad de reducción de los tintes azo sería la difusión de los mismos a través de la membrana celular. Por ello la presencia de grupos

sulfónicos como sustituyentes en las estructuras aromáticas de los tintes produciría un efecto inhibitorio en la difusión.

En relación con la permeabilidad de los tintes a través de la membrana celular, Mechsner y Wuhrmann (1982) permeabilizaron las células de *Bacillus cereus*, y de otros cultivos bacterianos, con tolueno. De este modo compararon las velocidades de reducción de varios tintes emparejando los que tenían la misma estructura con la única diferencia de la sustitución de un grupo carboxílico en lugar de un grupo sulfónico. Así, de las tres parejas de tintes estudiadas, en dos de ellas, mientras que con células no permeabilizadas la velocidad de reducción del tinte con el grupo carbonilo era mayor, al trabajar con células permeabilizadas la velocidad de reducción aumentaba y se invertía la situación, siendo en este caso el tinte con el grupo sulfónico el que más rápido se reducía. A partir de estos resultados postularon que la baja permeabilidad de las membranas celulares al paso de compuestos azo con grupos sulfónico es un factor limitante en la velocidad de reducción de éstos.

Bragger *et al.* (1997) usaron cultivos de *Bacteroides fragilis* para estudiar la reducción de varios tintes azo, entre los cuales estaba el AO7. La velocidad de degradación de cada uno de los tintes se correlacionó con el potencial redox en el medio, de manera que cuanto menor era el potencial redox de una disolución 0,1 mM del tinte, mayor era la velocidad de reducción del mismo.

Van der Zee *et al.* (2000) estudiaron la decoloración del AO7 comparando los resultados obtenidos con lodo granular y mediante sulfuro como agente reductor. Para una concentración inicial de AO7 similar, la velocidad de decoloración en presencia del lodo era muy superior.

## **5.2. Materiales y Métodos**

### **5.2.1. Biomasa y reactivos**

La biomasa empleada en estos experimentos procede un reactor anaerobio a escala piloto, instalado en una factoría dedicada a la fabricación de tableros de fibra de madera (TAFISA) (Fernández *et al.* 2001). Estos efluentes industriales contienen

compuestos lignocelulósicos pero ningún tinte, por lo cual la biomasa utilizada no estaba aclimatada a este tipo de compuestos. Su característica física más importante es su constitución granular.

La concentración de lodos utilizada fue aproximadamente de  $1-1,5 \text{ g SSV}\cdot\text{L}^{-1}$  en todos los ensayos, tal y como se recomienda para los ensayos de actividad realizados sin agitación (Field *et al.*, 1988).

El *Acid Orange 7* (85-95%) y el Ácido Sulfanílico (99,9%) fueron suministrados por Sigma (Madrid, España). El 1-Amino-2-naftol hidrocloreuro (90%) fue suministrado por Aldrich Chemical Company (Madrid, España).

### 5.2.2. Ensayos sin cosustrato

Los ensayos se llevaron a cabo en botellas cerradas de 500 mL (de los cuales 250 fueron ocupados por la fase líquida) sin agitación y con  $1,0-1,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de sólidos en suspensión volátiles (SSV). Se añadió un medio de nutrientes para obtener las siguientes concentraciones finales,

Macronutrientes ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ):  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (230),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (37),  $\text{MgSO}_4$  (6),  $\text{CaCl}_2$  (6).

Micronutrientes ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ):  $\text{FeCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (2 000),  $\text{H}_2\text{BO}_3$  (350),  $\text{ZnCl}_2$  (50),  $\text{CuCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (38),  $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (500),  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (50),  $\text{AlCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (90),  $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (2 000),  $\text{NiCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (92),  $\text{Na}_2\text{SO}_3\cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (164), EDTA (1 000), Resazurina (200) y HCl ( $1 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

También se añadió  $\text{NaHCO}_3$  a razón de 1 g: g DQO y, para eliminar el oxígeno disuelto, se añadió  $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$  en concentración de  $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . El pH en las botellas se ajustó a 7,0, empleando para ello disoluciones de HCl y NaOH. Se hizo pasar una corriente de  $\text{N}_2/\text{CO}_2$  (70:30) a través del espacio libre de las botellas durante 5 minutos para eliminar cualquier traza de oxígeno y aumentar la capacidad tampón del sistema. Las botellas se mantuvieron en una cámara termostaticada a  $37-38 \text{ }^\circ\text{C}$  para operar en rango mesófilo.

Todos los ensayos se hicieron por duplicado. Se emplearon concentraciones de AO7 comprendidas entre 0,06 y 0,65 mM (20 y  $227 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

### **5.2.3. Ensayos con cosustrato**

Estos ensayos se llevaron a cabo por duplicado y se siguió el mismo procedimiento empleado en los ensayos sin cosustrato.

Los cosustratos empleados en estos ensayos fueron: una mezcla de AGV, compuesta por ácidos acético, propiónico y butírico (1 500, 350 y 350 mg·L<sup>-1</sup>, respectivamente); ii) ácido propiónico (1 000 mg·L<sup>-1</sup>); iii) glucosa (500-2 500 mg·L<sup>-1</sup>).

### **5.2.4. Ensayos abióticos**

Estos ensayos se realizaron por triplicado. En primer lugar se hicieron experimentos en ausencia de lodos, sin y con cosustrato (ensayos A y AS, respectivamente). Posteriormente, se realizaron ensayos con lodo estéril, también sin cosustrato y con cosustrato (ensayos E y ES, respectivamente).

El medio empleado en estos ensayos fue el mismo que el empleado en los ensayos con lodo activo. En los ensayos E y ES el medio se esterilizó, junto con el lodo, en un autoclave a 120°C durante 2 horas, añadiéndose el AO7 en el momento de comenzar los experimentos.

### **5.2.5. Cálculos**

En este trabajo se calcularon actividades metanogénicas a partir de la producción de metano, así como referentes a la velocidad de degradación de AO7.

Para calcular la actividad metanogénica, una vez que se tienen todos los perfiles de concentración de metano, se toman los puntos que proporcionan una pendiente máxima, calculando esta pendiente. No obstante, los puntos elegidos para el cálculo de la pendiente deben suponer, al menos, el 50% del metano total generado.

Para el cálculo de las velocidades de degradación del AO7, una vez obtenidos los valores de concentración en función del tiempo se busca una ecuación matemática que reproduzca con la mayor precisión posible la trayectoria de los puntos con la ayuda de un programa informático (Table Curve Windows v1.0). El valor de la derivada de esta función da la velocidad de degradación del AO7 en cada punto.

## 5.3. Resultados

### 5.3.1. Ensayos abióticos

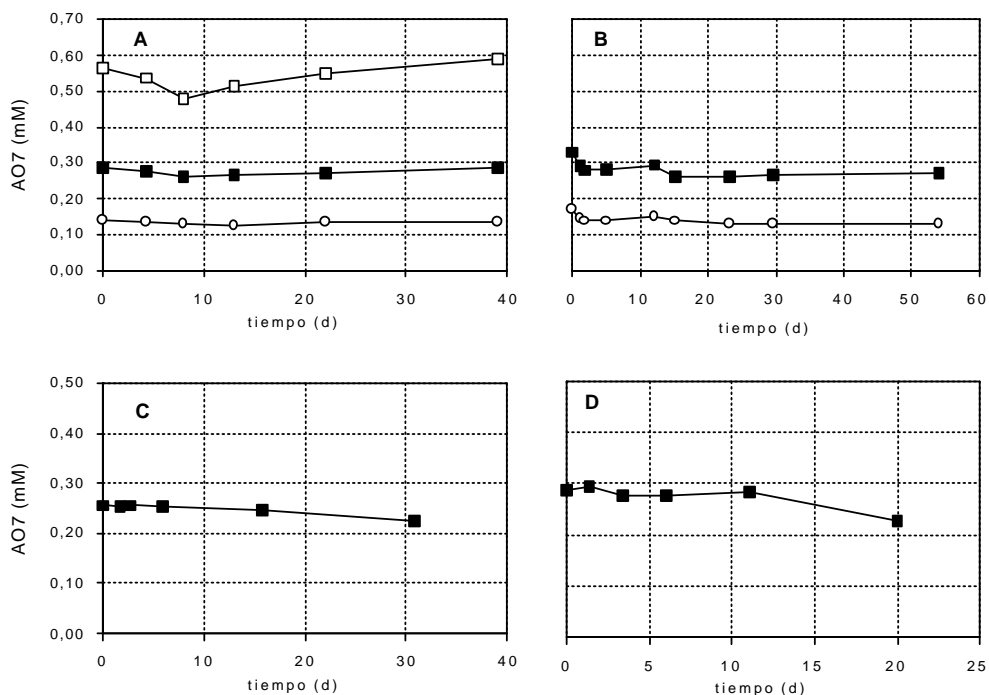
El objetivo de estos ensayos fue comprobar si había degradación de AO7 por otros mecanismos no biológicos, como podrían ser adsorción sobre la biomasa, precipitación o reducción química (el medio contiene sulfuro, que es un agente reductor). En la Tabla 5.1 se muestra el diseño experimental correspondiente a estas experiencias.

**Tabla 5.1.** Diseño experimental y nomenclatura de los ensayos abióticos.

Ensayo	Biomasa	Cosustrato	[AO7] <sub>0</sub> (mM y mg·L <sup>-1</sup> )		
			0,14	0,29	0,57
			50	100	200
<b>A</b>	-	-	<b>A1</b>	<b>A2</b>	<b>A3</b>
<b>E</b>	+ (estéril)	-	<b>E1</b>	<b>E2</b>	
<b>AS</b>	-	+		<b>AS2</b>	
<b>ES</b>	+ (estéril)	+		<b>ES2</b>	

Durante el período de tiempo que duraron los ensayos no se produjeron variaciones apreciables en la concentración de AO7, a excepción del ensayo ES en el cual, entre el día 11 y el 20 hubo una eliminación de AO7 en torno al 20% (Fig. 5.2), posiblemente debida a la pérdida de la esterilidad del medio, ya que, si esta eliminación fuese debida a mecanismos no biológicos debería haberse producido al comenzar el experimento.

Por lo tanto, se puede concluir que, bajo las condiciones estudiadas y en ausencia de actividad biológica, no se produce la degradación del AO7.



**Figura 5.2.** Evolución de la concentración de AO7 para distintas concentraciones iniciales ( $\square$ ) 0,14 mM, ( $\blacksquare$ ) 0,29 mM, ( $\circ$ ) 0,57 mM para los ensayos A (A), E (B), AS (C) y ES (D) (condiciones experimentales en la Tabla 3.1).

### 5.3.2. Ensayos en ausencia de cosustrato

Aunque diversas referencias bibliográficas recomiendan la presencia de un cosustrato para la degradación anaerobia de los tintes azo, ya que éste actúa como donante de electrones para la reducción del enlace azo (Carliell *et al.*, 1995), se ha pretendido evaluar la viabilidad de la degradación anaerobia de AO7 sin añadir otra fuente de carbono.

En la Tabla 5.2 se muestra el diseño de experimentos para estos ensayos.

**Tabla 5.2.** Concentraciones iniciales de AO7 en los ensayos realizados en ausencia de cosustrato.

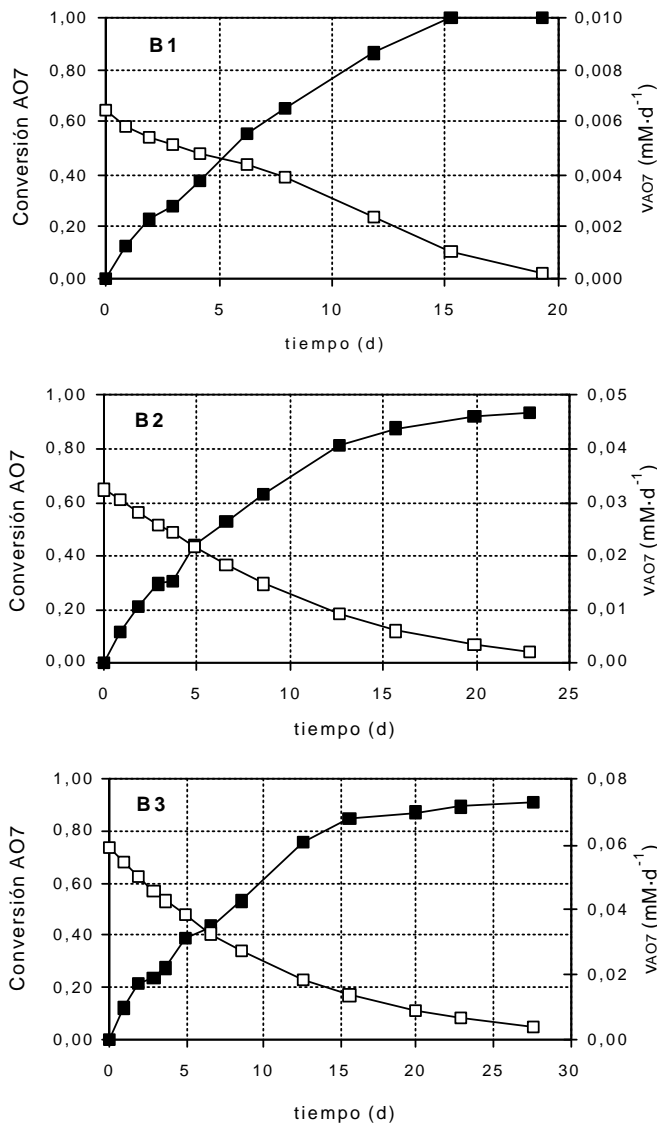
Ensayo	[AO7] <sub>o</sub> mM	[AO7] <sub>o</sub> mg·L <sup>-1</sup>
<b>B1</b>	<b>0,06</b>	<b>21</b>
<b>B2</b>	<b>0,32</b>	<b>112</b>
<b>B3</b>	<b>0,65</b>	<b>227</b>

En estos ensayos (B1, B2 y B3) se consiguió eliminar totalmente el AO7 (Fig. 5.3), si bien el tiempo necesario para alcanzar esta degradación varió en función de la concentración inicial. La velocidad máxima de eliminación coincidió en los tres ensayos con la velocidad inicial y aumentó proporcionalmente al aumento en la concentración inicial de AO7 (Tabla 5.3).

Los valores de Carbono Orgánico Total (COT) obtenidos en estos tres ensayos muestran que probablemente no hay una mineralización del AO7, ya que en los tres ensayos la concentración de este parámetro permaneció prácticamente constante (Fig. 5.4).

**Tabla 5.3.** Valores de los parámetros cinéticos calculados.

Ensayo	[AO7] <sub>0</sub> mM	v <sub>0</sub> mM·d <sup>-1</sup>	v <sub>m</sub> mM·d <sup>-1</sup>
B1	0,06	0,006	0,004
B2	0,32	0,032	0,017
B3	0,65	0,059	0,033



**Figura 5.3.** Valores de Conversión (■) y de velocidad de degradación (□) de AO7 para los ensayos B1 (0,06 mM), B2 (0,32 mM) y B3 (0,65 mM).



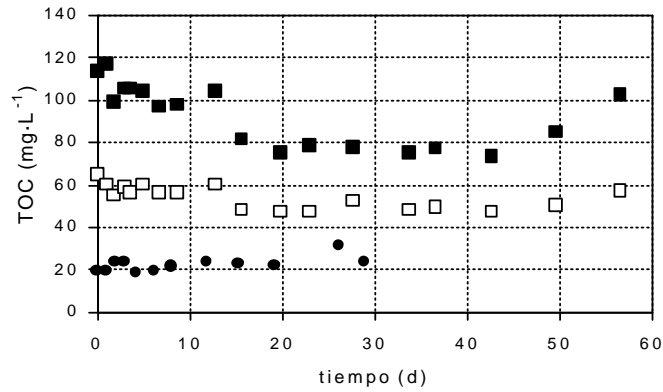


Figura 5.4. Valores de COT para los ensayos B1 (●), B2 (□) y B3 (■).

### 5.3.3. Ensayos con presencia de cosustrato

Una vez que comprobado que en ausencia de cosustrato el AO7 se elimina totalmente, aunque de manera lenta, se realizaron ensayos con una fuente de carbono adicional para determinar si esto modificaba la velocidad de degradación del tinte.

En primer lugar se realizó un estudio con distintos cosustratos para determinar el más idóneo para conseguir altas velocidades de degradación de AO7. Luego se probaron distintas concentraciones iniciales y una vez que se encontró una concentración inicial óptima de cosustrato, se emplearon distintas concentraciones iniciales de AO7 para ver su efecto sobre la degradación.

#### Ensayos con Ácidos Grasos Volátiles

En estos ensayos se usaron dos cosustratos distintos, el primero fue una mezcla de Ácidos Grasos Volátiles (AGV), que contenía ácidos acético (HAc), propiónico (HPr) y n-butírico (HBu). El segundo cosustrato contenía únicamente ácido propiónico. En la Tabla 5.4 se muestran las concentraciones de cosustrato empleadas en cada ensayo.

La concentración inicial de AO7 empleada estuvo en torno a 0,30 mM (100 mg·L<sup>-1</sup>).

**Tabla 5.4.** Concentraciones de los cosustratos empleados.

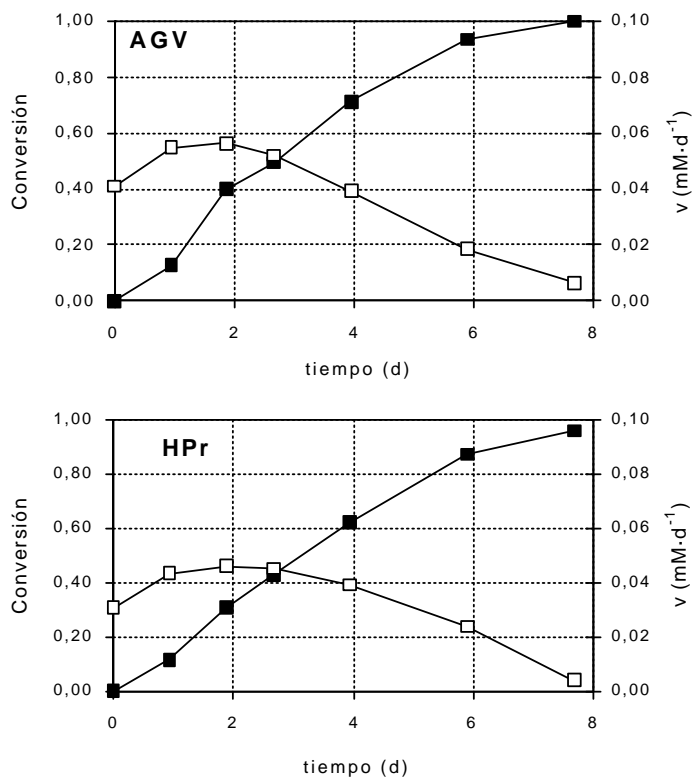
<b>Cosustrato</b>	<b>Ac. acético</b> mg·L <sup>-1</sup>	<b>Ac. Propiónico</b> mg·L <sup>-1</sup>	<b>Ac n-butírico</b> Mg·L <sup>-1</sup>
AGV	1 500	350	350
HPr	-	1 000	-

La degradación de AO7 fue muy similar en los dos ensayos (Figura 5.5). Aunque con el uso como cosustrato de AGV se logra una velocidad de degradación ligeramente superior, alcanzándose un valor de velocidad máxima de 0,056 mM·d<sup>-1</sup>, mientras que en el ensayo con ácido propiónico ésta fue de 0,046 mM·d<sup>-1</sup> (Tabla 5.5). En ambos casos la velocidad máxima no se alcanzó a tiempo cero (como cabría esperar de una degradación que sigue una cinética de primer orden), sino que la velocidad aumenta a partir del instante inicial, decreciendo cuando la conversión se aproxima a la unidad.

En el ensayo con AGV se necesitaron 20 días para degradar el 90% de la DQO biodegradable, mientras que con HPr fueron necesarios 30 días. En un blanco realizado en las mismas condiciones que el ensayo con AGV, pero sin AO7, se necesitaron 17 días para alcanzar este porcentaje de eliminación de DQO (datos no mostrados). Estos datos evidencian una baja actividad del lodo empleado.

**Tabla 5.5.** Valores de velocidad inicial ( $v_0$ ), máxima ( $v_{\max}$ ) y media ( $v_m$ ) para cada ensayo.

<b>Ensayo</b>	<b><math>v_0</math></b> mM·d <sup>-1</sup>	<b><math>v_{\max}</math></b> mM·d <sup>-1</sup>	<b><math>v_m</math></b> mM·d <sup>-1</sup>
AGV	0,041	0,056	0,044
HPr	0,031	0,046	0,038



**Figura 5.5.** Conversión (■) y velocidad de degradación (□) de AO7 para los ensayos AGV y HPr (condiciones experimentales en la Tabla 5.4).

### Ensayos con glucosa

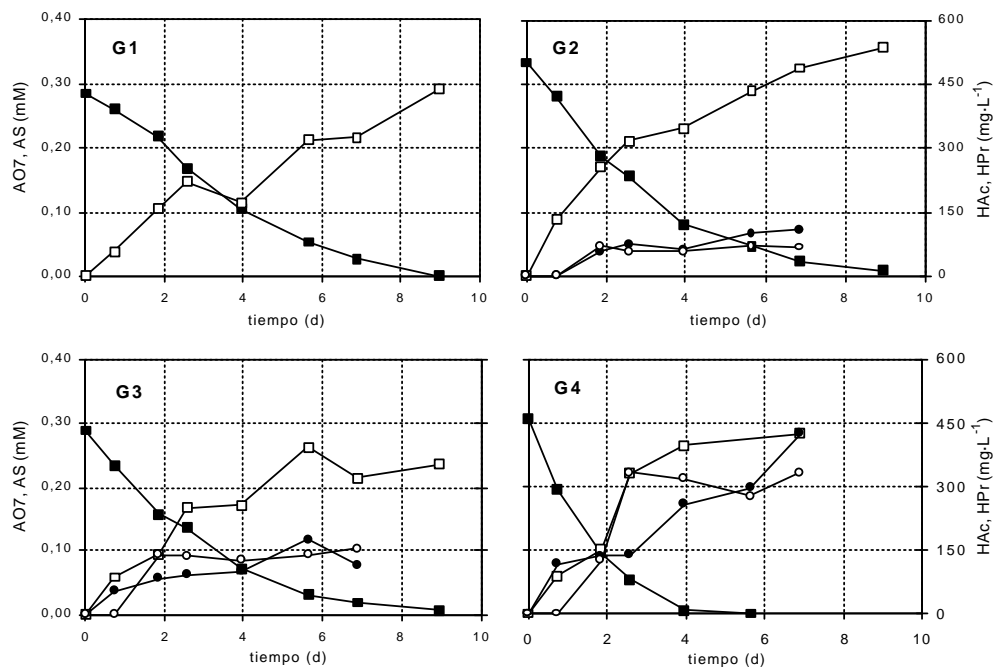
Se realizaron ensayos con glucosa como cosustrato, empleando distintas concentraciones iniciales, para determinar su posible influencia sobre la velocidad de degradación del AO7. En la Tabla 5.6 se muestran las concentraciones iniciales de glucosa empleadas. Las concentraciones iniciales de AO7 estuvieron en torno a 0,30 mM.

**Tabla 5.6.** Concentraciones iniciales de glucosa y de AO7.

<b>Ensayo</b>	<b>Glucosa</b> mg·L <sup>-1</sup>	<b>AO7</b> mM	<b>AO7</b> mg·L <sup>-1</sup>
G1	0	0,29	100
G2	600	0,34	117
G3	1 200	0,29	101
G4	1 800	0,31	107

En todos los ensayos el AO7 se degrada totalmente, generándose Ácido Sulfanílico (AS) en concentraciones estequiométricas (Fig. 5.6). La glucosa se degradó rápidamente en todos los ensayos que la contenían (2 días, datos no mostrados) generándose pequeñas acumulaciones de ácidos acético y propiónico. La velocidad con la que se degradó el AO7 en los ensayos G1 y G2 fue bastante similar, siendo superior en el ensayo G3, aunque la mayor velocidad de degradación se obtuvo cuando se utilizó la mayor concentración inicial de glucosa, en el ensayo G4 ya que tras cuatro días no se apreciaba la presencia de AO7 en el medio.

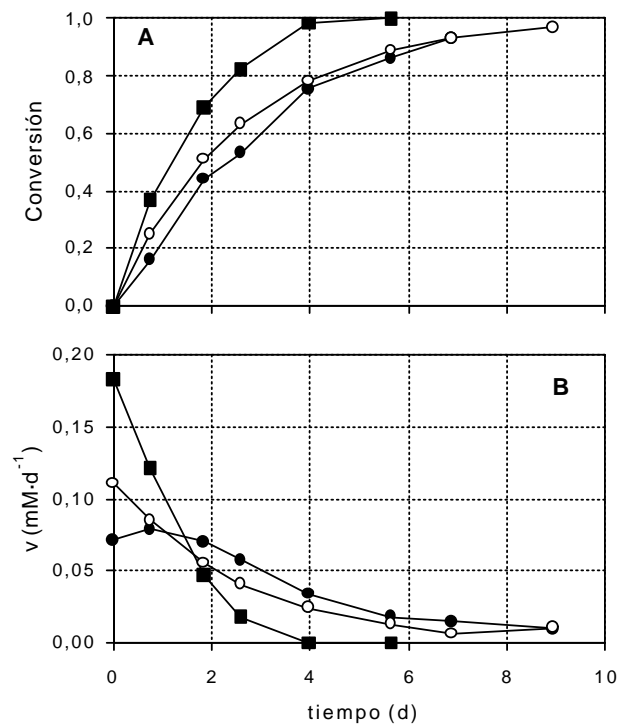
A partir de un gráfico comparativo de los ensayos G2-G4 (Fig. 5.7) se puede ver que las conversiones de los ensayos G2 y G3 siguen una trayectoria similar. En cuanto a la velocidad de degradación, mientras que en los ensayos G3 y G4 ésta es descendente desde el inicio del experimento, en los ensayos G0 (datos no mostrados) y G1 la velocidad alcanza su valor máximo el día 1 de operación, teniéndose un valor de velocidad muy similar durante los dos o tres primeros días de operación (Tabla 5.7).



**Figura 5.6.** Concentración de AO7 (■) y AS (□), en mM; ácido acético (●) y ácido propiónico (○), en  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ; para los ensayos G1, G2, G3 y G4 (condiciones experimentales en Tabla 5.6).

**Tabla 5.7.** Valores de las velocidades inicial ( $v_0$ ), máxima ( $v_{\max}$ ) y media ( $v_m$ ) para los ensayos G1-G4.

Ensayo	$v_0$ $\text{mM}\cdot\text{d}^{-1}$	$v_{\max}$ $\text{mM}\cdot\text{d}^{-1}$	$v_m$ $\text{mM}\cdot\text{d}^{-1}$
G1	0,009	0,054	0,034
G2	0,071	0,079	0,049
G3	0,111	0,111	0,048
G4	0,183	0,183	0,092



**Figura 5.7.** Valores de conversión (A) y de velocidad de degradación (B) de AO7 para los ensayos G2 (●), G3 (○) y G4 (■).

### Empleo de diferentes concentraciones iniciales de AO7

En este experimento se trata de determinar el efecto que tiene la concentración inicial de AO7 sobre la velocidad de degradación. Se empleó glucosa ( $2\ 000\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) como cosustrato.

En la Tabla 5.8 se muestran los distintos ensayos realizados con las respectivas concentraciones iniciales de AO7.

**Tabla 5.8.** Concentraciones iniciales de AO7 usadas con 2 g·L<sup>-1</sup> de glucosa como cosustrato.

Ensayo	AO7	AO7	Ensayo	AO7	AO7
	mM	mg·L <sup>-1</sup>		mM	mg·L <sup>-1</sup>
G5	0,06	22	G8	0,58	197
G6	0,14	49	G9	0,77	288
G7	0,31	110	G10	0,90	314

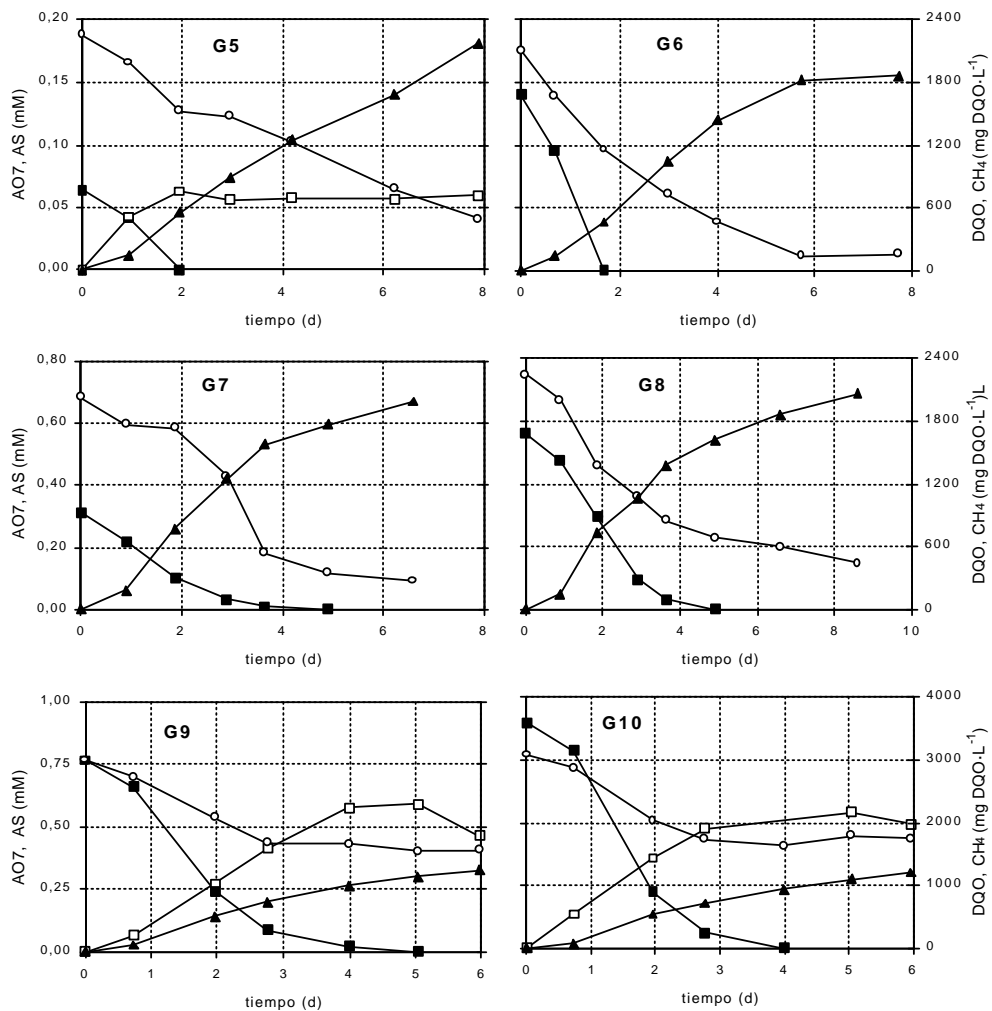
En la Fig. 5.8 se muestran los valores de la evolución de la concentración de AO7, AS (sólo en algunos ensayos), DQO total y metano generados en términos de concentración de DQO.

En los ensayos con menor concentración de AO7 (G5 y G6), hubo una total degradación tras dos días. En el resto de los ensayos el tiempo necesario para completar la degradación fue cuatro días. La concentración inicial de glucosa estuvo en torno a los 2 000 mg·L<sup>-1</sup>, si bien, en los ensayos G9 y G10 fue ligeramente superior. Precisamente fue en estos dos últimos ensayos en los cuales, durante los seis primeros días de ensayo no se degradó la mayor parte de la DQO y como consecuencia de ello, el metano generado apenas superó los 1 000 mg DQO·L<sup>-1</sup>.

En la Fig. 5.9 se puede apreciar la eliminación de color alcanzada en el ensayo G7, transcurridos cinco días.

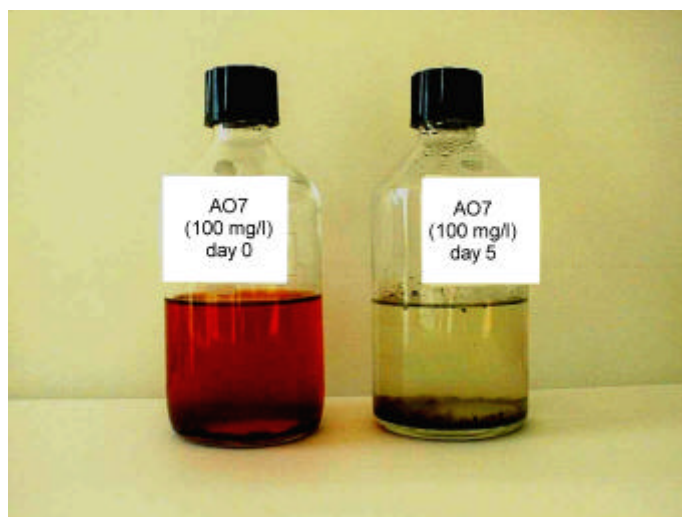
Con respecto al AS, mientras que en el ensayo G5 se generó una concentración equimolar al AO7 eliminado, en los ensayos G9 y G10, la concentración de AS fue sensiblemente inferior a la que cabría esperar.

Si se comparan los resultados obtenidos para varias concentraciones iniciales (Fig. 5.10 A), se observa que cuando la concentración inicial es baja (0,06 mM) la conversión total se completa rápidamente. Sin embargo, para concentraciones iniciales de 0,31 mM o superiores, a pesar de su similar comportamiento, la evolución es más lenta, obteniéndose en el tercer día de operación una conversión superior a 0,8 en todos los casos.



**Figura 5.8.** Evolución de AO7 (■) y AS (□), en mM; DQO (○) y metano (▲), en mg DQO·L<sup>-1</sup>, para los ensayos G5-G10 (condiciones experimentales en Tabla 5.8).



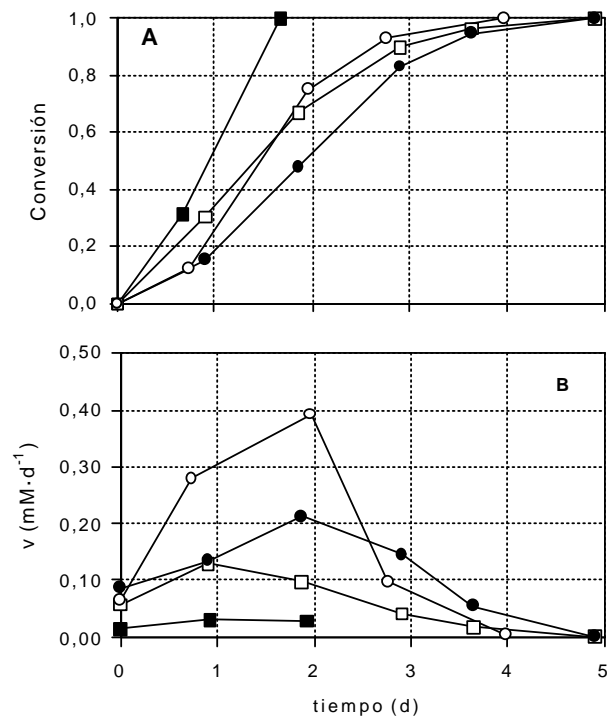


**Figura 5.9.** Muestra de la decoloración alcanzada en el ensayo G7, para una concentración inicial de  $0,32 \text{ mM}$  ( $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), tras 5 días.

La velocidad de degradación aumenta a medida que aumenta la concentración inicial de AO7 (Fig. 5.10 B). Esta tendencia, sin embargo, no se hace tan notoria en el instante inicial, ya que en los ensayos G7 y G10 la velocidad inicial es similar, y en el ensayo G8 es ligeramente superior. Es en los valores de la velocidad máxima y de la velocidad media (Tabla 5.9) donde más se aprecia la influencia de la concentración inicial en la velocidad.

#### **5.3.4. Toxicidad de AO7**

En primer lugar se llevaron a cabo ensayos anaerobios para determinar posibles efectos tóxicos del tinte bajo estas condiciones. En la Tabla 5.10 se muestran las actividades metanogénicas calculadas para los ensayos G5-G10, así como la concentración de DQO biodegradable al comienzo de cada ensayo y el porcentaje de metanización de esta DQO en el sexto día de operación.



**Figura 5.10.** Valores de conversión (A) y de velocidad de degradación (B) de AO7 para los ensayos G5 (■) (0,06 mM), G7 (□) (0,31 mM), G8 (●) (0,58 mM) y G10 (○) (0,90 mM).

Los valores de actividad metanogénica máxima no fueron muy altos en ninguno de los ensayos, obteniéndose valores similares independientemente de la concentración inicial de AO7. Sin embargo, en los ensayos G9 y G10 el porcentaje de metanización fue inferior al alcanzado en los otros ensayos. Dado que en estos ensayos la concentración inicial de DQO biodegradable fue superior, teniendo en cuenta la evolución del conjunto de los parámetros, la inferior metanización puede achacarse a un insuficiente período de evaluación más que a un posible efecto tóxico del AO7.

Para determinar la toxicidad del AO7 en condiciones aerobias se realizaron ensayos de respirometría, empleando ácido acético ( $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) como fuente de carbono y concentraciones de AO7 de manera que la relación HAc : AO7 variase entre 0 y 0,5. Se obtuvieron valores de actividad de consumo de oxígeno entre 0,58 y 0,53  $\text{g DQO}\cdot\text{g SSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ , sin que hubiera aparentemente ningún efecto tóxico del AO7.

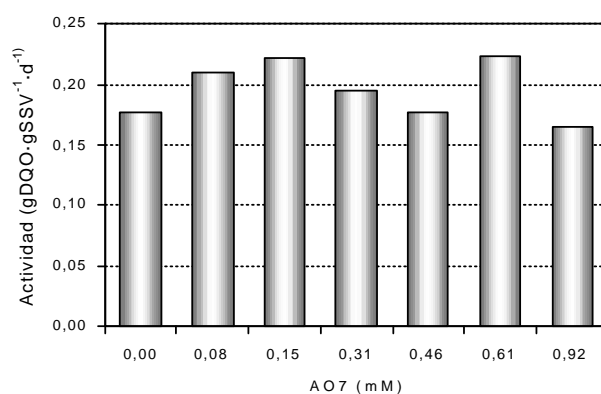
**Tabla 5.9.** Parámetros cinéticos calculados para diferentes valores de concentración inicial de AO7.

Ensayo	[AO7] <sub>0</sub> mM	v <sub>0</sub> mM·d <sup>-1</sup>	v <sub>max</sub> mM·d <sup>-1</sup>	v <sub>m</sub> mM·d <sup>-1</sup>
G5	0,06	0,016	0,033	0,024
G6	0,14	0,050	0,082	0,0
G7	0,31	,060	0,129	0,082
G8	0,58	0,089	0,212	0,127
G9	0,77	0,084	0,311	0,153
G10	0,90	0,068	0,392	0,209

**Tabla 5.10.** Valores de actividad metanogénica y de porcentaje de metanización para ensayos con distinta concentración inicial de AO7.

Ensayo	[AO7] <sub>0</sub> mM	[DQO] <sub>0</sub> mg·L <sup>-1</sup>	Act Metanogénica g DQO·g SSV <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>	% Metanización (6 días)
G5	0,06	2 200	0,26	75%
G6	0,14	2 050	0,26	89%
G7	0,31	1 900	0,31	95%
G8	0,58	1 950	0,29	95%
G9	0,77	2 650	0,25	49%
G10	0,90	2 600	0,21	46%

Posteriormente se realizó otro ensayo con concentraciones de AO7 más altas y la misma concentración de HAc ( $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Aunque en este ensayo la actividad del lodo fue más baja, a pesar de las elevadas concentraciones de AO7 no se observó efecto tóxico (Fig. 5.11).



**Figura 5.11.** Actividad obtenidos en un ensayo de respirometría, para distintas concentraciones iniciales de AO7, con  $2000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de glucosa como fuente de carbono.

Finalmente se realizaron ensayos de toxicidad utilizando un método general basado en la emisión de luz de organismos luminiscentes como el Microtox. Se usó tanto el AO7 como con los intermedios generados en su reducción (AS y 1A2N). Los resultados de  $EC_{50}$  (15 minutos) obtenidos para el AO7, AS y 1A2N fueron  $0,033$  (11),  $2,312$  (400) y  $0,058$  (11)  $\text{mM}$  ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), respectivamente.

### 5.3.5. Metabolitos generados en la reducción del AO7

Se ha detectado, en la mayoría de los ensayos, una presencia de AS en condiciones estequiométricas a la reacción del AO7. En un ensayo efectuado empleando distintos cosustratos (glucosa, AGV) se comprobó el carácter recalcitrante al tratamiento anaerobio de este compuesto, por lo que, debería de descartarse un sistema de

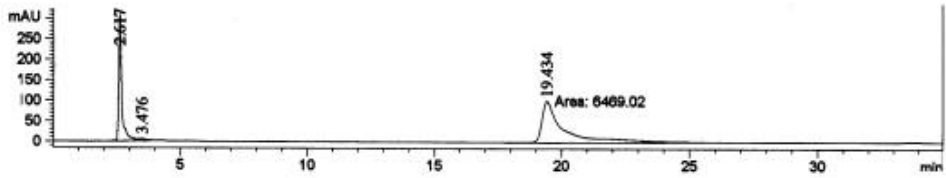
tratamiento que contemplase una mayor duración en vistas de su posible degradación.

El otro compuesto, el 1A2N, no ha podido ser detectado en los distintos ensayos debido a su carácter inestable. En la Fig. 5.12A se presenta un cromatograma de una muestra obtenida en el ensayo de degradación en el que se empleaba una mezcla de AGV como cosustrato, y en la que se tomó la precaución de evitar el contacto con oxígeno. Se observan dos picos, a 2,6 minutos, correspondiente al AS, y a los 20 minutos, aproximadamente, cuyo espectro de absorción UV-VIS se muestra en la Fig. 5.12B. Este espectro resulta muy similar al obtenido en el análisis espectrofotométrico de una muestra de 1,2-Naftoquinona.

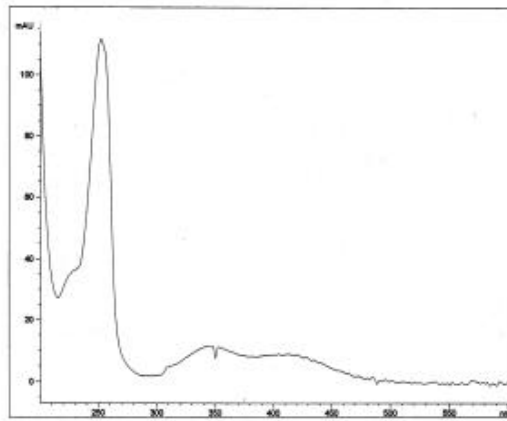
En la Fig. 5.13 se muestra el cromatograma de la misma muestra, tras ser sometida a una exposición al aire. Se comprueba la completa desaparición del pico con un tiempo de retención de 20 minutos.

Se preparó una disolución de 1A2N (1-amino-2-naftol-hidrocloruro) borboteando el medio con  $N_2$ , para evitar la presencia de oxígeno en el medio (Fig. 5.14A). Tras 5 horas se dejó de borbotear  $N_2$  (Fig. 5.14B). A las seis horas, la disolución, que inicialmente era transparente, empezó a adquirir tonalidad amarilla. A las 24 horas la disolución era totalmente amarilla, con aparición de un precipitado en el fondo (Fig. 5.14C). Se observa un pico con un tiempo de retención de 20 minutos que se impurifica a medida que el medio se va oxidando. El espectro de absorción UV-VIS correspondiente a este pico se muestra en la Fig. 5.15, observándose que, en el instante inicial (Fig.5.15A), el espectro es similar al observado para el pico que aparecía a los 20 minutos en la muestra de AO7 degradado (Fig. 5.12B) y al observado con una disolución de 1,2-Naftoquinona.

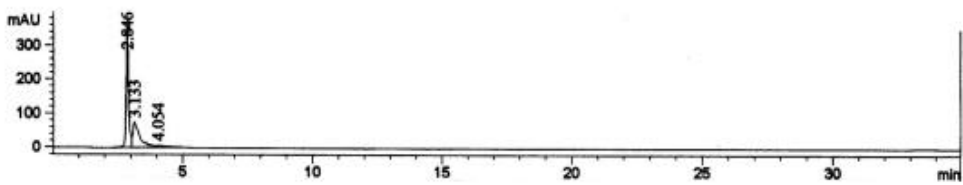
A



B

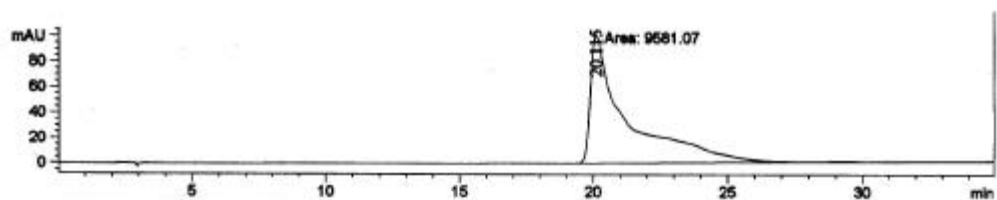


**Figura 5.12.** Cromatograma de HPLC para una muestra del ensayo con AGV sin exponerse al aire (A) y espectro de absorción UV-VIS correspondiente al pico con 20 minutos de tiempo de retención (B).

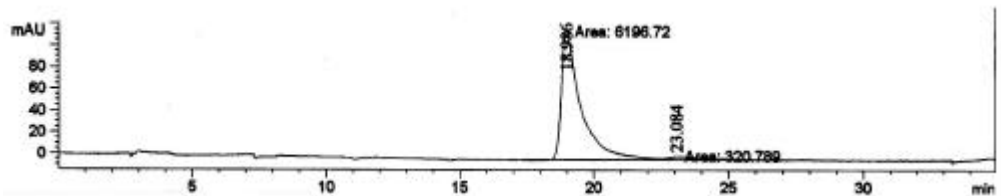


**Figura 5.13.** Cromatograma de HPLC para una muestra del ensayo con AGV expuesta al aire.

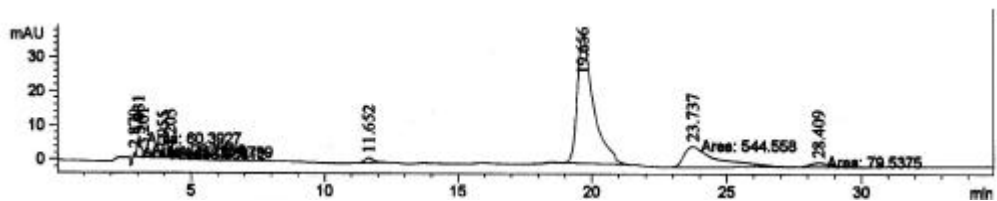
A



B

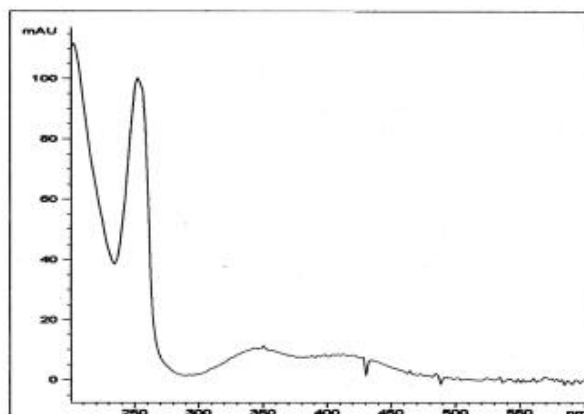


C

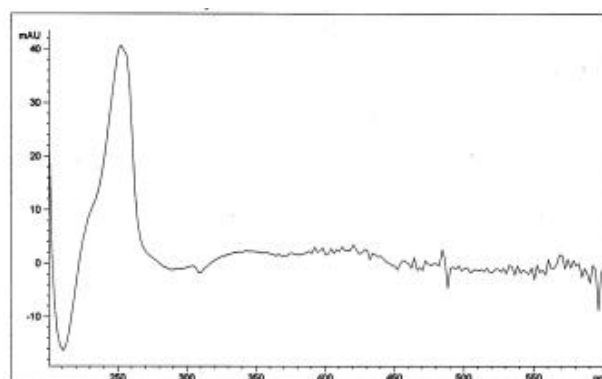


**Figura 5.14.** Cromatogramas resultantes del análisis por HPLC de las muestras obtenidas de una disolución de 1A2N cuando era borboteada con  $N_2$  (A), cuando se paró el borboteo de  $N_2$  4 horas después de su preparación (B) y 24 horas después de su preparación (C).

A



B



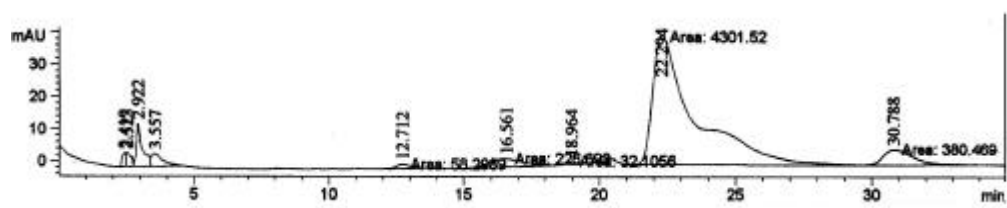
**Figura 5.15.** Espectros de absorción UV-VIS correspondientes al compuesto cuyo pico aparece con un tiempo de retención de 19-20 minutos, en las muestras de 1A2N analizadas cuando la solución se borboteaba con  $N_2$  (A) y a las 24 horas de ser preparada, 19 más tarde del borboteo con  $N_2$ . (B).

Por último se muestra el cromatograma correspondiente a la 1,2-Naftoquinona (Fig. 5.16A) en el que se observa un pico a 23 minutos, similar al encontrado en la

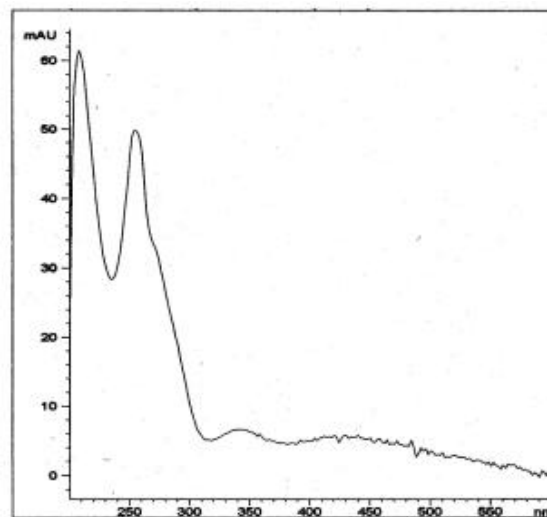


muestra de AGV y en la disolución de 1A2N y su espectro de absorción UV-VIS correspondiente a este pico (Fig. 5.16B) también es similar.

A



B



**Figura 5.16.** Cromatograma de HPLC para una muestra de una disolución de 12NQ (A) y espectro de absorción UV-VIS correspondiente al pico con 22 minutos de tiempo de retención (B).

## **5.4 Discusión**

### **5.4.1. Ensayos abióticos**

En los ensayos abióticos, a excepción del ensayo ES, no hubo variaciones significativas en la concentración de AO7 lo que permite descartar efectos físico-químicos en la transformación del AO7. En un ensayo con lodo inactivado se produjo, entre los días 11 y 22 de operación, un descenso de un 21% en la concentración de AO7 y de un 15% en el color. Dado que este descenso se produjo cuando el ensayo ya estaba muy avanzado y se trataba de un ensayo con cosustrato, es probable que este descenso se debiera a una actividad biológica derivada de la pérdida de esterilidad del medio.

### **5.4.2. Ensayos en ausencia de cosustrato**

En los ensayos con biomasa activa realizados en ausencia de cosustrato se alcanzó una eliminación prácticamente completa de AO7, si bien el tiempo transcurrido hasta alcanzar esta conversión total dependió de la concentración inicial de AO7. Así, cuando la concentración inicial fue 0,06 mM fueron necesarios 15 días para la conversión total, mientras que cuando la concentración inicial fue 0,59 mM se alcanzó un 90% de eliminación al cabo de 23 días.

Sin embargo, la eliminación del AO7 no estuvo acompañada de una disminución del carbono orgánico disuelto en el medio, con lo cual se puede concluir que no se produjo una mineralización del AO7, sino una biotransformación anaerobia que da como resultado la aparición de nuevos metabolitos en el medio.

La velocidad de degradación de AO7 descendió en los tres ensayos a medida que transcurrió el ensayo y la concentración de AO7 fue disminuyendo, y fue mayor cuánto mayor fue la concentración inicial de AO7. Esto, junto con el hecho de que la velocidad inicial aumentó de un ensayo a otro proporcionalmente a la concentración inicial, parece indicar una cinética de degradación de AO7 de primer orden, en concordancia con estudios previos acerca de la decoloración de tintes azo bajo condiciones anaerobias (Larsen *et al.*, 1976; Wuhrman *et al.*, 1980; Mechsner y

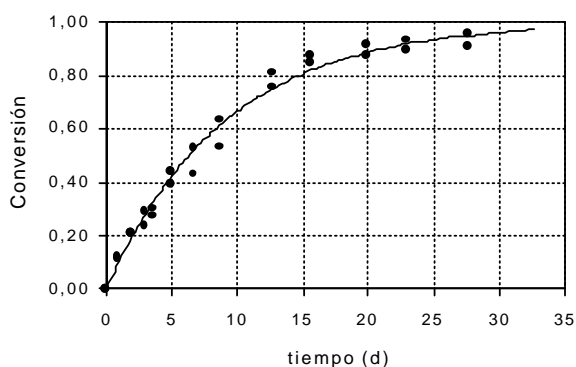
Wuhrman, 1982; Kremer, 1989 y Carliell *et al.*, 1995). Esta cinética está regida por la siguiente ecuación:

$$-\frac{dC}{dt} = kC \quad [5.1]$$

Integrando esta ecuación, tomando como condiciones iniciales  $t=0$  y  $C=C_0$ , se tiene:

$$\ln\left(\frac{C}{C_0}\right) = -kt \quad \Rightarrow \quad C = C_0 e^{-kt} \quad [5.2]$$

Empleando los resultados de los ensayos B2 y B3 (0.32 y 0.58 mM) y aplicando el modelo cinético de primer orden (Figura 5.17), se ha obtenido un valor de la constante cinética  $k$  de  $0,11 \text{ d}^{-1}$  (el valor del coeficiente de correlación  $r^2$  fue 0,99).



**Figura 5.17.** Conversión de AO7 en ensayos sin cosustrato. Datos experimentales (●), modelo cinético de primer orden (—).

### 5.4.3. Ensayos con presencia de cosustrato

La primera conclusión que se extrae de estos ensayos es que la presencia de un cosustrato asimilable permite aumentar sensiblemente la velocidad de eliminación de AO7. Este hecho también fue observado por Carliell *et al.* (1995) cuando estudiaron

la decoloración del *Reactive Red 141*, encontrando que, tras ajustar los valores a un modelo cinético de primer orden, la constante cinética incrementaba su valor unas 37 veces cuando se añadía otra fuente suplementaria de carbono.

En los ensayos en los que se empleó como cosustrato AGV y HPr las velocidades iniciales no fueron muy distintas a las alcanzadas en los ensayos sin cosustrato, con una concentración inicial de AO7 similar (comparar  $v_0$  en las Tablas 5.3 y 5.5). Sin embargo, tanto las velocidades máximas como las velocidades medias fueron sensiblemente superiores a las alcanzadas en el ensayo sin cosustrato.

Los ensayos con glucosa mostraron que este compuesto es el mejor cosustrato de los ensayados, ya que incluso con una concentración inicial de glucosa de  $600 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  las velocidades máxima e inicial de degradación de AO7 fueron superiores (ver Tablas 5.5 y 5.7). El efecto de la adición de glucosa como cosustrato sobre la velocidad de reducción de los tintes azo fue asimismo observado por otros autores (Wuhrman *et al.*, 1980; Haug *et al.*, 1991 y Carliell *et al.*, 1995), y se piensa que es debido a que permite aumentar la velocidad de formación de equivalentes reductores (flavin nucleótidos), que se reoxidan mientras se reduce el compuesto azo. Gingell y Walker (1971) publicaron que el principal factor limitante en la reducción del tinte azo *Red 2G* era la velocidad de formación de estas flavinas en forma reducida. Teniendo en cuenta que la respiración catabólica de estos sustratos por parte de las bacterias anaerobias es la responsable de la generación de las flavinas reducidas, no es de extrañar que la disponibilidad de un sustrato susceptible de ser respirado por las bacterias, tenga gran influencia en la velocidad de reducción de los compuestos azo.

De las tres concentraciones de glucosa empleadas, la de  $1800 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  fue la que favoreció en mayor medida la velocidad de degradación del AO7, si bien este dato no debe tomarse como algo concluyente ya que es la velocidad de respiración de la glucosa la que acelera la reducción del tinte azo, por lo que hay que considerar que concentraciones de glucosa inferiores a las citadas satisfacen los requerimientos de electrones necesarios para la reducción del AO7 en las concentraciones de trabajo. Así, Haugh *et al.* (1991) al estudiar la mineralización del tinte azo *Mordant Yellow 3*, con un tratamiento anaerobio-aerobio, determinaron que para una concentración

inicial de tinte en torno a 8 mM, en la etapa anaerobia solamente se consumió una pequeña parte de glucosa ( $68 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Del mismo modo, Wuhmann *et al.* (1980), al estudiar el efecto de diversos factores sobre la velocidad de degradación, en condiciones anaerobias, de varios tintes azo, entre los cuales estaba el AO7, determinó que una concentración de extracto de levadura de  $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  era suficiente para proporcionar los electrones necesarios para la reducción de los enlaces azo, a velocidades altas.

En los ensayos con distintas concentraciones iniciales de AO7 (G5-G10) se observó que la degradación de AO7 no tuvo lugar según un perfil de velocidad descendente, sino que la velocidad aumentó a medida que se empezó a degradar el AO7 y descendió cuando la concentración en el medio era baja. Esto puede indicar una cinética de degradación autocatalítica, expresada por ecuaciones del tipo de la Ec. 5.3.

$$-\frac{dC}{dt} = k_1C + k_2C(C_0 - C)^n \quad [5.3]$$

Tras ajustar los valores experimentales a esta ecuación, se comprobó un buen ajuste al emplear el factor  $n=1$ .

Al integrar la Ec. 5.3 para  $n=1$ , tomando como condiciones iniciales  $t=0$  y  $C=C_0$ , se obtiene la Ec. 5.4.

$$C = C_0 \frac{(k_1 + k_2 C_0)e^{-(k_1 + k_2 C_0)t}}{k_1 + k_2 C_0 e^{-(k_1 + k_2 C_0)t}} \quad [5.4]$$

Para calcular la velocidad máxima según este modelo cinético se iguala la derivada de la Ec. 5.4 a cero y se obtiene la ecuación de segundo orden, 5.5.

$$2k_2 C^2 - 3k_2(k_1 + k_2 C_0)C + (k_1 + k_2 C_0) = 0 \quad [5.5]$$

La resolución de esta ecuación permite encontrar los valores de concentración correspondientes a la velocidad máxima (Ec. 5.6).

$$C_1 = \frac{k_1 + k_2 C_0}{k_2} \quad C_2 = \frac{k_1 + k_2 C_0}{2k_2} \quad [5.6]$$

Dado que la solución  $C_1$  da un valor mayor que  $C_0$ , la solución correcta en este caso será la solución  $C_2$ , siempre y cuando el valor de  $k_2$  no sea demasiado pequeño, ya que, en ese caso, la relación entre  $k_1$  y  $k_2$  sería mayor que  $(C_0/2)$  y consecuentemente,  $C_2$  sería mayor que  $C_0$ . Si esto último no se cumpliera, la expresión para la velocidad máxima según este modelo cinético sería la indicada en la Ec. 5.7.

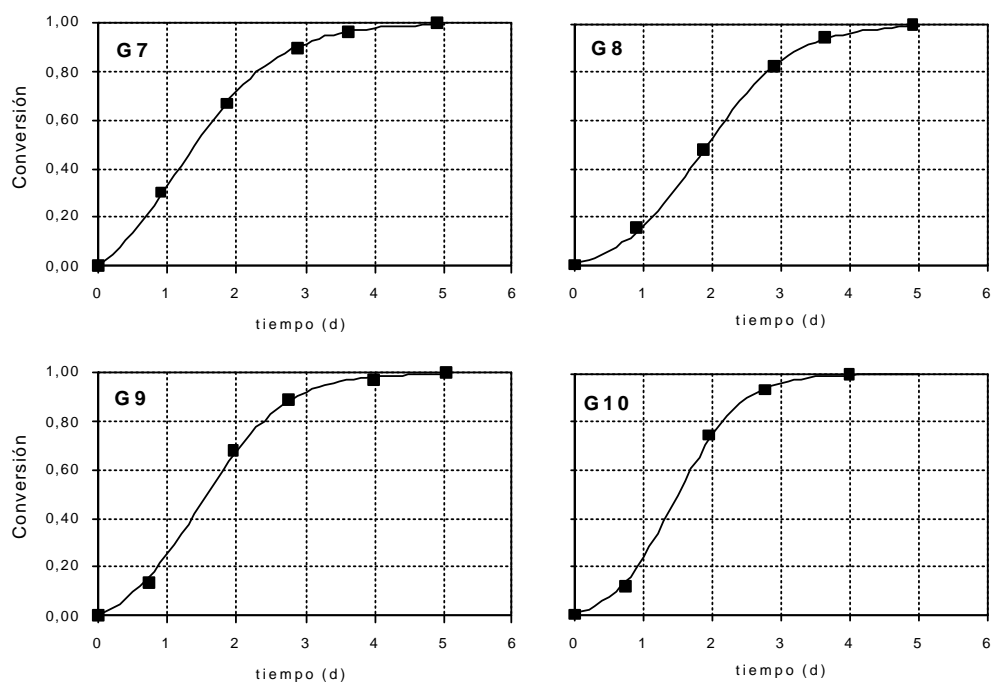
$$v_{max} = k_1 \frac{k_1 + k_2 C_0}{2k_2} + \frac{k_1 + k_2 C_0}{2} \left( C_0 - \frac{k_1 + k_2 C_0}{2k_2} \right) \quad [5.7]$$

En la Fig. 5.18 se puede observar el correcto ajuste de los datos experimentales a la Ec. 5.4. Las constantes cinéticas obtenidas con estos ajustes son, a excepción de las obtenidas para el ensayo G8, muy similares, estando  $k_1$  en torno a  $0,1 \text{ d}^{-1}$  y  $k_2$  en torno a  $2,0\text{-}2,7 \text{ mM}^{-1}\text{d}^{-1}$  (Tabla 5.11).

La  $k_1$  obtenida es muy similar a la obtenida en los ensayos sin cosustrato, lo que parece indicar que es el término autocatalítico el que acelera la degradación de AO7 con respecto a los ensayos con ausencia de cosustrato.

**Tabla 5.11.** Valores de las constantes cinéticas resultantes de los ajustes y de velocidades de degradación calculadas a partir del modelo.

Ensayo	$k_1$ $\text{d}^{-1}$	$k_2$ $\text{mM}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$	$v_0$ $\text{mM}\cdot\text{d}^{-1}$	$v_{max}$ $\text{mM}\cdot\text{d}^{-1}$	$r^2$
G7	0,25	3,49	0,07	0,13	1,000
G8	0,08	2,67	0,04	0,23	1,000
G9	0,13	1,98	0,10	0,35	0,999
G10	0,09	2,30	0,08	0,51	1,000



**Figura 5.18.** Conversión de AO7 en los ensayos G7-G10. Datos experimentales (●), ecuación 5.4 (—).

Van der Zee *et al.* (2000) estudiaron la decoloración biológica y química de varios tintes entre los que estaba el AO7, y comprobaron que mientras en los procesos biológicos una ecuación cinética de primer orden (Ec. 5.1) reproducía los procesos de decoloración de los distintos tintes, cuando se llevó a cabo la decoloración química con sulfuro, la mayoría de los tintes estudiados sufrían una desviación de la ecuación cinética de primer orden. Esta desviación se debía a que había una fase de latencia inicial y, cuando se había decolorado una pequeña fracción del tinte, la velocidad aumentaba. Esto les indujo a postular una ecuación cinética con un término que tenía en cuenta la cantidad de tinte reaccionado (ecuación análoga a la Ec. 5.3). Dicha ecuación reprodujo la decoloración de AO7 y se comprobó que el 1A2N

catalizaba la reacción. El papel catalizador del 1A2N lo explica en base a que este compuesto está en el medio en equilibrio con su aminoquinona (ver Capítulo 1, Fig. 1.6). Diversos estudios (Kudlich *et al.*, 1997; Bechtold *et al.*, 1999) han demostrado el aumento en la velocidad de reducción de varios tintes azo provocado por la presencia de quinonas, que actúan como transportadores de electrones, facilitando el paso de éstos desde la fuente donde se generan hasta el enlace azo.

Mientras que en los ensayos sin presencia de cosustrato no se observó el efecto catalítico, en los ensayos con cosustrato sí se apreció. Esto podría ser debido a que, en la degradación del cosustrato se genera un gran excedente de equivalentes reductores, siendo el transporte de estos equivalentes hacia el enlace azo la fase limitante en la velocidad de degradación del compuesto azo, en los ensayos sin cosustrato los equivalentes se generan a partir de procesos de lisis celular, con lo que podría ser igualmente limitante la fase de transporte de los equivalentes, o su generación.

La velocidad de degradación de AO7 aumenta a medida que lo hace la concentración inicial, lo que contrasta con otros estudios llevados a cabo con tintes azo. Así, Carliell *et al.* (1995) en sus estudios con el tinte azo *Reactive Red 141* observaron el efecto contrario, la velocidad disminuía al aumentar la concentración inicial de tinte, lo cual explicaron debido a efectos inhibitorios provocados por el tinte o sus intermedios. Análogo resultado encontró Hu (1998) cuando estudió la degradación del tinte azo RP<sub>2</sub>B con la enzima azoreductasa extraída de una cepa de *Pseudomas Luteola* proveniente del lodo de una planta de tratamiento de aguas residuales con tintes.

En este caso, al representar los valores de velocidad específica de degradación de AO7 (valores de velocidad inicial de la Tabla 5.9), frente a la concentración inicial, los valores se ajustan al modelo cinético de Haldane que tiene en cuenta el efecto de inhibición por sustrato. Su expresión matemática se indica en la Ec. 5.8.



$$\mu = \frac{\mu_m \cdot S}{\left( K_s + S + \frac{S^2}{K_i} \right)} \quad [5.8]$$

en donde  $\mu$  es la velocidad de crecimiento específico de los microorganismos ( $d^{-1}$ );  $\mu_m$  es la velocidad de crecimiento específico máximo ( $d^{-1}$ ),  $S$  es la concentración de sustrato (mM),  $K_s$  la constante de saturación (mM) y  $K_i$  la constante de inhibición (mM).

El modelo de Haldane predice que la velocidad de crecimiento específico de la biomasa aumenta con la concentración de sustrato, hasta que ésta comienza a ser inhibitoria para los microorganismos.

La cinética de degradación de sustrato en discontinuo puede seguir la Ec. 5.9.

$$v_s = \frac{dS}{dt} = \frac{X}{Y_{xs}} \cdot \frac{\mu_m \cdot S}{\left( K_s + S + \frac{S^2}{K_i} \right)} \quad [5.9]$$

en donde  $v_s$  es la velocidad de degradación de sustrato ( $mmol \cdot d^{-1}$ ),  $Y_{xs}$  el rendimiento celular ( $g \text{ SSV} \cdot mmol^{-1}$  sustrato) y  $X$  la concentración de microorganismos ( $g \text{ SSV} \cdot L^{-1}$ ).

La velocidad de consumo específico máximo de sustrato (o actividad específica máxima) se define como  $Ac_m = \mu_m / Y_{xs}$  ( $mmol \text{ sustrato} \cdot g^{-1} \text{ SSV} \cdot h^{-1}$ ). Considerando que la concentración de microorganismos puede considerarse constante durante los ensayos, el modelo puede expresarse según la Ec. 5.10.

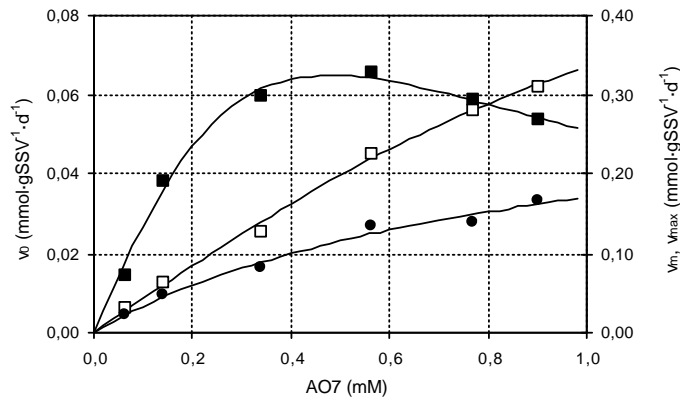
$$v_s = X_o \cdot Ac_m \cdot \frac{S}{\left( K_s + S + \frac{S^2}{K_i} \right)} \quad [5.10]$$

Definiendo la velocidad específica  $r_{es}$  como  $(r_s/X_0)$  ( $\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}\text{SSV}\cdot\text{d}^{-1}$ ), se obtiene la Ec. 5.11.

$$v_{es} = A_{c_m} \cdot \frac{S}{\left( K_s + S + \frac{S^2}{K_i} \right)} \quad [5.11]$$

Para obtener los parámetros cinéticos se aplicó la metodología de velocidades iniciales; para ello sólo se consideraron los valores de concentraciones de las primeras horas del proceso de degradación.

El ajuste de los datos experimentales a esta ecuación proporcionó unos valores de  $1.66 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}\text{SSV}\cdot\text{d}^{-1}$ ,  $5,87 \text{ mM}$  y  $0,04 \text{ mM}$  para  $A_{c_m}$ ,  $K_s$  y  $K_i$ , respectivamente. Para concentraciones iniciales superiores a  $0,50 \text{ mM}$ , la velocidad inicial comienza a descender (Fig. 5.19). Sin embargo, considerando la velocidad máxima o la velocidad media (Fig. 5.19, escala secundaria), no se observa, en el rango de concentraciones de trabajo, efecto inhibitorio.



**Figura 5.19.** Velocidades específicas inicial (■), máxima (□) y media (●) para distintas concentraciones iniciales de AO7 (ensayos G5-G10).

Los valores de velocidad de eliminación de AO7 son semejantes a los obtenidos por otros autores, empleando condiciones anaerobias y ensayos en discontinuo.

Van der Zee *et al.* (2000) lograron un 100% de decoloración de AO7 en dos días, para una concentración inicial de 0,3 mM, si bien la concentración de biomasa empleada fue 3g SSV·L<sup>-1</sup>, con lo cual, el valor de la velocidad específica sería inferior al obtenido en el ensayo G7. El cosustrato que empleaban era una mezcla de AGV de 2,0 gDQO·L<sup>-1</sup>. Mechsner y Wuhrmann (1982) con una concentración inicial de AO7 de 8 mg·L<sup>-1</sup> (0,02 mM), alcanzaron una velocidad de eliminación de AO7 de 0,45 mg AO7·g<sup>-1</sup> biomasa·h<sup>-1</sup>(0,03 mmol AO7·g<sup>-1</sup> biomasa·d<sup>-1</sup>) que es inferior al valor de velocidad media alcanzado en el ensayo G5 (0,06 mM de AO7). Sin embargo, cuando estos autores emplearon como biomasa células permeabilizadas, la velocidad que alcanzaron fue 3,29 mg AO7·g<sup>-1</sup> biomasa·h<sup>-1</sup> (0,23 mmol AO7·g<sup>-1</sup> biomasa·d<sup>-1</sup>). Como cosustrato empleaban 100 mg·L<sup>-1</sup> de extracto de levadura y 1 ìmol·L<sup>-1</sup> de FAD. Empleando también extracto de levadura (100 mg·L<sup>-1</sup>) como cosustrato, Wwhurmann *et al.* (1980) necesitaron 15 horas para eliminar 20 mg·L<sup>-1</sup> (0,06 mM) de AO7. La concentración de biomasa era 4,5 g·L<sup>-1</sup>, con lo cual la velocidad específica alcanzada fue 0,020 mmol AO7·g<sup>-1</sup> biomasa·d<sup>-1</sup>, que es similar al alcanzado en el ensayo G5 (0,06 mM de AO7).

#### **5.4.4. Toxicidad de AO7**

La toxicidad de los tintes azo sobre los microorganismos se asocia con fenómenos de estos compuestos en los pares de bases del ADN de las células microbianas (Ogawa *et al.*, 1988). Esto implica el paso de las moléculas de tinte a través de la membrana celular y su acoplamiento entre los pares de bases del ADN, lo cual es difícil debido a las complejas estructuras que poseen estos compuestos. Sin embargo, los compuestos intermedios generados en su degradación tienen estructuras menos complejas y podrían penetrar en las células con mayor facilidad. De hecho, la toxicidad microbiana producida por compuestos aromáticos generados en la degradación de tintes azo ha sido comprobada por varios investigadores (Chung, 1983; Ganesh *et al.*, 1994). También se ha publicado que con ciertos tintes la velocidad de decoloración disminuye cuando la mayor parte del tinte se ha reducido

(Wuhrmann *et al.*, 1980). Carliell *et al.* (1995) cuando estudiaron la degradación anaerobia del *Reactive Red 141*, encontraron efectos de inhibición a concentraciones altas de tinte (a partir de  $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), sin embargo, estos fenómenos de inhibición no se dieron con biomasa aclimatada.

En los ensayos llevados a cabo en este trabajo, los valores de actividad metanogénica obtenidos para las distintas concentraciones iniciales de AO7 (Tabla 5.10) no parecen indicar un efecto tóxico, no obstante, los porcentajes de metanización (Tabla 5.10), a concentraciones de AO7 superiores a  $0,58 \text{ mM}$  son ligeramente inferiores al 50%. En estos ensayos (G9 y G10) la DQO biodegradable inicial era algo superior y quizás sería necesario contabilizar el porcentaje de metanización en un período de tiempo superior a seis días. A este respecto también cabe añadir que en un ensayo control realizado paralelamente a los ensayos G9 y G10, con similar concentración inicial de DQO biodegradable, se obtuvo un porcentaje de metanización del 50%. Se puede considerar por lo tanto que no hay efecto tóxico del AO7, ni de sus intermedios, sobre la metanogénesis. Esta afirmación también la refrenda el hecho de que, una segunda adición de medio sin AO7 realizada en algunos ensayos (concentraciones iniciales de AO7 de  $0,07$  y  $0,43 \text{ mM}$ ) 40 días después de la primera adición, cuando el AO7 ya estaba totalmente degradado, no produjo ningún cambio en la actividad metanogénica con respecto a la primera adición.

Los ensayos respirométricos realizados con el AO7 tampoco indicaron ningún efecto tóxico de este compuesto sobre las bacterias aerobias empleadas.

Los ensayos de toxicidad de Microtox no indicaron una disminución de toxicidad de los intermedios generados en la reducción del AO7, con relación a la del propio compuesto. Así, el AS presenta menor toxicidad que el AO7, mientras que la toxicidad del 1A2N sobre las bacterias luminescentes es similar a la del AO7.

#### **5.4.5. Metabolitos generados en la reducción del AO7**

El ácido sulfanílico permaneció en el medio resultante de la degradación del AO7. Esto no resulta extraño ya que no se conocen referencias acerca de la degradación de este compuesto en condiciones anaerobias. El carácter recalcitrante de este

compuesto viene dado en parte por el grupo sulfónico. Leidner *et al.* (1980) estudiaron el efecto del grupo sulfónico en la biodegradabilidad de estructuras basadas en cadenas de alquilbenceno sulfonatos (que se empezaron a emplear en los detergentes en los primeros años sesenta) concluyendo que, mientras que los compuestos con grupo carboxílico se degradaban, sus análogos con grupo sulfonato permanecían estables. Por ello, la oxidación total de estos compuestos depende de la capacidad de los microorganismos para eliminar el grupo sulfónico. La presencia del grupo sulfónico como factor limitante en la degradación de tintes azo en condiciones anaerobias también ha sido tenido en cuenta por otros autores (Wuhrmann *et al.*, 1980; Mechsner y Wuhrmann, 1982).

Bajo condiciones aerobias existen referencias de la degradación del ácido sulfanílico. Brown y Hamburger (1987) alcanzaron una degradación del 100% con un lodo no específico y un tiempo de incubación de 28 días, aunque los resultados obtenidos no son muy reproducibles entre distintos ensayos. Tan *et al.* (1999) eliminaron más de un 50% del AS generado en la degradación del *Mordant Yellow 10* (unos 0,5 mmol·L<sup>-1</sup>) con un cultivo mixto de lodo granular anaerobio y lodo aerobio con capacidad para degradar aminas aromáticas, y bajo unas condiciones específicas en cuanto al porcentaje de oxígeno presente en el espacio libre de los recipientes empleados. Thurneer *et al.* (1988) consiguieron degradar completamente varios bencenosulfonatos, entre los cuales estaba el ácido sulfanílico, empleando mezclas de cultivos puros, de los que previamente se había estudiado su capacidad para mineralizar alguno de estos compuestos (Thurneer *et al.*, 1986). Feigel y Knackmuss (1993) mineralizaron el ácido sulfanílico empleando dos cultivos bacterianos, el primer paso era la eliminación del grupo amino, que sólo uno de los cultivos era capaz de llevar a cabo. Más recientemente, Perei *et al.* (2001) lograron convertir en biomasa el AS, en un porcentaje superior al 98 ó 70%, cuando su concentración inicial era de 10 ó 50 mM. Para conseguirlo emplearon un cultivo de *Pseudomonas paucimobilis* aislado de un lugar contaminado. No se han encontrado, sin embargo, referencias de la degradación de AS en sistemas en continuo.

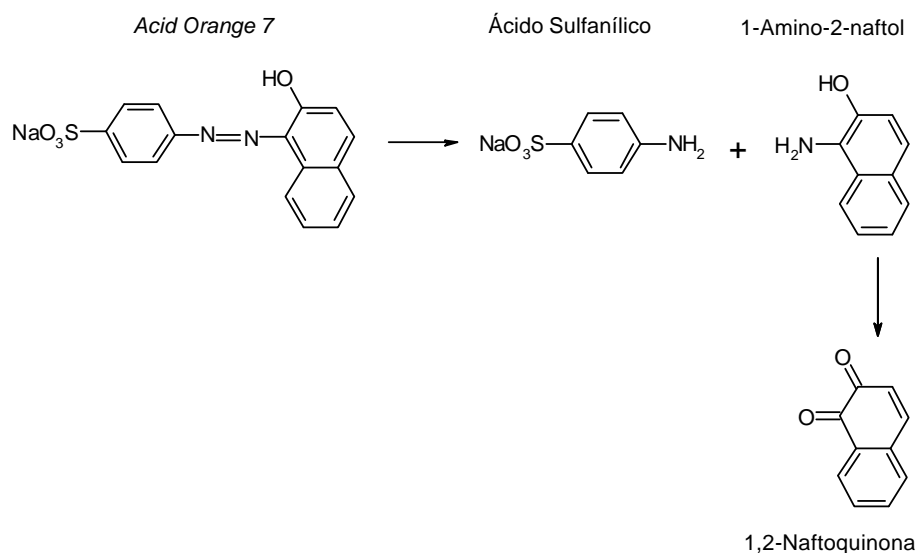
El 1-amino-2-naftol está considerado como un compuesto cancerígeno (Bonser *et al.*, 1956; Chung *et al.*, 1975; Garner *et al.*, 1984). Se trata de un compuesto difícil de detectar ya que es muy sensible a la oxidación en presencia de aire (Conant y Corson, 1943). En general, los aminonaftoles se oxidan rápidamente en disoluciones alcalinas (Booth, 1985). Esta facilidad para oxidarse en presencia de oxígeno también la tienen los amino-benzenosulfonatos que poseen un grupo hidroxilo en posición orto (Grünanger, 1978). La oxidación del 1-amino-2-naftol genera la 1,2-naftoquinona, de hecho, uno de los métodos para la obtención de este compuesto es mediante la oxidación de 1-amino-2-naftol hidrocloreto con Fe (II) (Fieser, 1943).

Los picos de máxima absorbancia de la 12NQ aparecen a 249, 342 y 412 nm (Keck *et al.*, 1997). Los espectros de las Figs. 5.12B y 5.15A, poseen picos en el entorno de los 249 y 342 nm por lo cual, el compuesto detectado en dichos cromatogramas, con un tiempo de retención de 20 minutos, sería la 12NQ. Esta hipótesis se ve reforzada al comprobar que dichos picos tienen un tiempo de retención similar al encontrado en la muestra de 12NQ (Fig. 5.16A), que presenta un espectro de absorción también similar. La explicación a que una disolución de 1A2N preparada en un medio anóxico contenga 12NQ puede ser que el reactivo de partida ya estuviera oxidado, de hecho, dicho reactivo, con el tiempo, fue oscureciendo su color claro original. De este modo, la degradación del AO7, en condiciones anaerobias, seguiría la ruta indicada en la Fig. 5.20.

Keck *et al.* (1997) encontraron que el 12NQ se descompone espontáneamente en condiciones aerobias a 30°C, teniendo una vida media de 90 minutos, cambiando el color de la disolución desde amarillo hasta marrón. De esta descomposición se generaron dos productos con picos de máxima absorbancia en 270 y 342 nm (producto A) y 250, 280 y 238 nm (producto B). Uno de estos productos generados en esta descomposición es el 4-[3,4-dihidroxi-naftil-(1)]-naftoquinona-(1.2) (Fieser y Peters, 1931; Cassebaum, 1957), mientras que el otro producto generado en la descomposición de la 12NQ es el 2-hidroxi-1,4-naftoquinona (Fieser y Peters, 1931), aunque Keck *et al.* (1997) solo pudieron corroborar la presencia del primero de ellos (producto B).

Kudlich *et al.* (1999) estudiaron las reacciones de autooxidación de varios *o*-Aminohidroxinaftalenos, generados durante la reducción anaerobia de algunos tintes azo con grupo sulfónico. Para ello las disoluciones que contenían estos compuestos se exponían al aire. En el caso del 1-amino-2-hidroxinaftaleno-6-sulfonato (misma estructura que el 1A2N pero con un grupo sulfónico) comprobaron que se formaba la naftoquinona correspondiente, que reaccionaba con el compuesto no oxidado generándose un dímero.

Kremer (1989) estudió la degradación anaerobia de los tintes azo *Acid Orange 7* y *Acid Red 88*. El 1A2N es un metabolito generado en la reducción de ambos tintes. Este autor propone que el 1A2N en el propio medio de reacción se transforma en 1,2-dihidroxinaftaleno, que a su vez puede dehidrogenarse para formar la 1,2-naftoquinona, o puede dehidroxilarse para formar 2-naftol. Ambos compuestos fueron identificados como metabolitos en la degradación del *Acid Red 88*. A pesar de que esto parece indicar un mecanismo competitivo, dicho autor apunta que el 1A2N puede ser transformado directamente por los microorganismos a 2-naftol. En presencia de otra fuente de carbono adicional, la 1,2-NQ se encontró de forma continua en el efluente, mientras que el 2-naftol aparecía tras siete semanas. En estas condiciones también se detectó la presencia de la isoquinolina y la quinacridona, además de otro producto no identificado. Estos dos últimos compuestos se formarían directamente de la transformación del 1A2N, el primero de ellos por un proceso de polimerización (posee 5 anillos aromáticos) y el segundo por un proceso de rotura del anillo aromático. En ausencia de otra fuente adicional de carbono, Kremer detectó la presencia de la 1,2-NQ y el 2-naftol a partir de la séptima semana de operación, si bien, durante la segunda y tercera semanas detectó la formación de tres compuestos no identificados, alguno de ellos bastante estable. Todo esto indica que la presencia de otra fuente de carbono afecta tanto al mecanismo de formación de los metabolitos, como a la velocidad de formación de éstos.



**Figura 5.20.** Rotura, en condiciones anaerobias, del enlace azo del AO7.

Teniendo esto en cuenta, resulta complicado determinar cuáles son los productos finales (una vez que las muestras son expuestas al aire) derivados de la transformación del 1A2N, ya que, si bien en condiciones anóxicas se ha detectado la 12NQ, la exposición al aire hace que dicho compuesto no se detecte (Fig. 5.13), lo cual está relacionado con las observaciones de Keck *et al.* (1997). De hecho, tras la exposición al aire de las muestras de AO7 decolorado, adquiere una tonalidad marrón, al igual que ocurría en la descomposición de la 12NQ descrita por Keck *et al.* (1997); algo similar ocurrió con las disoluciones de 1A2N tras prolongadas exposiciones al aire, de hecho, la evolución que sigue el pico correspondiente a la 12NQ en los cromatogramas de la Fig. 5.14 puede ser indicativo de la descomposición de la 12NQ tras su exposición prolongada al aire.



La capacidad de acelerar la velocidad de reducción de los compuestos azo ha sido tradicionalmente asociada a las quinonas y compuestos húmicos (Field *et al.*, 2000; Kudlich *et al.*, 1997), al actuar como transportadores de electrones hasta el enlace azo. La presencia en el medio de la 12NQ, explicaría el efecto autocatalítico observado en la degradación anaerobia del AO7 en presencia de cosustrato.

## 5.5 Referencias

- Bandar J., Nadtochenko V., Kiwi J. and Pulgarin C. (1997). Dynamics of oxidation as a parameter in the modeling of dye mineralization (Orange II) via advanced oxidation technologies. *Water Science and Technology* **35**(4) 87-93.
- Bechold T., Burtscher E. and Turcanu A. (1999). Antraquinones as mediators for the indirect cathodic reduction of dispersed organic dyestuffs. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **465**, 80-87.
- Benner R.G. and Stevenson A.C. (1952). *Du Pont*, US 2619503.
- Bonser G.M., Bradshaw L., Clayson D.B. and Jull J.W. (1956). A further study on the carcinogenic properties of ortho-hydroxyamines and related compounds by bladder implantation in the mouse. *British Journal of Cancer*, **10**, 539-546.
- Booth G. (1985). Aminonaphtols. Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry, A17, 46-47. Ed. Advisory Board.
- Bragger J.L., Lloyd A.W., Soozandehfar S.H., Bloomheld S.F., Marriott C. and Martin G.P. (1997). Investigation into the azo reducing activity of a common colonic microorganism. *International Journal of Pharmaceutics* **157**, 61-71.
- Brown B. and Hamburger B. (1987). The degradability of dyestuffs: Part III. Investigation on their ultimate degradability. *Chemosphere* **16**, 1539-1553.
- Carliell C.M., Barclay S.J., Naidoo N., Buckley C.A., Mulhland D.A. and Senior E. (1995). Microbial decolourisation of a reactive azo dye under anaerobic conditions. *Water SA*, **21**(1), 61-69.

- Cassebaum H. (1957). Die Konstitution des  $\alpha$ -Naphthyl-Dichinhydrons. *Chem. Ver.*, **90**, 1537-1547.
- Chung K. (1983). The significance of azo reduction in the mutagenesis and carcinogenesis of azo dyes. *Mutation Research*, **4**, 269-287.
- Chung K.T., Fulk G.E. and Stein M.W. (1975). Tryptophanase of fecal flora as possible factor in the etiology of colon cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, **54**, 1073-1078.
- Conant J.B. and Corson B.B. (1943). 1,2-Aminonaphthol hydrochloride. *Organic Synthesis*, **2**, 33-39, ed. Board. New York. John Wiley & Sons INC.
- Coughlin M.F., Kinkle B.K. and Bishop P.L. (1999). Degradation of azo dyes containing aminonaphthol by *Spiroplasma* sp strain 1CX. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **23**, 311-316.
- Coughlin M.F., Kinkle B.K., Tepper A. and Bishop P.L. (1997). Characterization of aerobic azo dye-degrading bacteria and their activity in biofilms. *Water Science and Technology*, **36**, 215-220
- Dykes G.A., Timm R.G., and von Holy A. (1994). Azoreductase activity in bacteria associated with the greening of industrial chocolate puddings. *Applied and Environmental Microbiology*, **60**, 3027-3029.
- Feigel B.J. and Knackmuss H.J. (1993). Syntrophic interactions during degradation of 4-aminobenzenesulfonic acid by a two species bacterial culture. *Archives of Microbiology*, **159**, 124-130.
- Fernández J.M., Omil F., Méndez R. and Lema J.M. (2001). Anaerobic treatment of eucalyptus fibreboard manufacturing wastewaters in an Industrial pilot scale hybrid UASB reactor. *Water Research*, **35**(17) 4150-4158.
- Field J., Sierra R. and Lettinga G. (1988). Ensayos anaerobios. *Proceedings of 4th Symposium on Wastewater Anaerobic Treatment*, Valladolid, Spain, pp. 52-81.

- Field J.A., Cervantes F.J., van der Zee F.P. and Lettinga G. (2000). Role of quinones in the biodegradation of priority pollutants: a review. *Water Science and Technology*, **42**(5-6) 215-222.
- Fieser L.F. (1943). 1,2-Naphtoquinone. *Organic Synthesis*, **2**, 430-432, ed. Board. New York. John Wiley & Sons INC.
- Fieser L.F. and Peters M.A. (1931). The potentials and the decomposition reactions of *ortho*-quinones in acid solution. *Journal of American Chemiistry Society*, **53**, 793-805.
- Food and Environmental Hygiene Department HKSAR (January 2000). Use of preservatives and colouring matter in chinese New Year Foods: An evaluation of food surveillance findings 1997to 1999. Risk Assessment Studies. Report N° 1.
- Ganesh R., Boardman G.D. and Michelson D. (1994). Fate of azo dyes in sludges. *Water Research*, **28**, 1367-1376.
- Garner R.C., Martin C.N. and Clayson D.B. (1984). Carcinogenic aromatic amines and related compounds. *Chemical Carcinogens (Searle CE. ed.)*, **1**, 175-276. ACS Monograph 182. American Chemical Society. Washington D.C.
- Gingell R. and Walker R. (1971). Mechanism of azo reduction by *Streptococcus fecallis II*. The Role of soluble flavins. *Xenobiotica*, **1**(3), 231-239.
- Grünarger P. (1978). *Mechoden der Organischen Chemie* 4<sup>th</sup> ed. Georg Thieme Veriag. Stuttgart, 7, 1-195.
- Haug W., Schmidt A., Nörtemam B. and Hempel D.C., Stolz A., Knackmuss H.J. (1991). Mineralization of the sulfonated azo dye Mordant Yellow 3 by a 6-aminonaphtalene-2-bencenesulfonate-degrading bacterial consortium. *Applied and Environmental Microbiology*, **57**, 3144-3149.
- Hu T.L. (1998). Degradation of azo dye RP<sub>2</sub>B by *Pseudomonas Luteola*. *Water Science and Technology*, **38**(4-5), 299-306.

- Jiang M. and Bishop P.L. (1994). Aerobic biodegradation of azo dyes in biofilms. *Water Science and Technology*, **29**, 525-530.
- Keck A., Klein J., Kudlich M., Stolz A., Knackmuss H.J. and Mattes R. (1997). Reduction of azo dyes by redox mediators originating in the naphthalenesulfonic acid degradation pathway of *Sphingomonas* sp. strain BN6. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**(9) 3684-3690.
- Kremer F.V. (1989). Anaerobic degradation of monoazo dyes. PhD Thesis. Department of Civil and Environmental Engineering. University of Cincinnati.
- Kudlich M., Hetheridge M.J. Knackmuss H.J., Stolz A. (1999). Autoxidation reactions of different aromatic *o*-Aminonaphthalenates that are formed during the anaerobic reduction of sulfonated azo dyes. *Environmental Science and Technology*, **32**, 896-901.
- Kudlich M., Keck A., Klein J., Stolz A. (1997). Localization of the Enzyme system involved in anaerobic reduction of azo dyes by *Sphingomonas* sp. Strain BN6 and effect of artificial redox mediators on the rate of azo dye reduction. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**(9), 3691-3694.
- Larsen J.C. Meyer T. and Scheline R.R. (1976). Degradation of sulphonated water soluble azo dyes by caecal microorganisms from the rat. *Acta Pharmacologica et Toxicologica*, **38**, 353-357.
- Leidner H., Gloor R., Wüest D. and Wuhmann K. (1980). The influence of sulphonic group on the biodegradability of n-alkylbenzene sulphonates. *Xenobiotica*, **10**, 47-56.
- Liakou S., Pavlou S. and Liberatos G. (1997). Ozonization of azo dyes. *Water Science and Technology*, **35**(4) 279-286.
- Mechsner K. and Wuhmann K. (1982). Cell permeability as rate limiting factor in the microbial reduction of sulfonated azo dyes. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, **15**, 123-126.

- Ogawa T., Shibata M., Ogawa T., Shibata M., Atome C. and Idaka E. (1988). Growth inhibition of *Bacillus subtilis* by basic dyes. *Buletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **40**, 45-52.
- Overney G. (1979). Ueber den aeroben Abbau von Dicarboxyazobenzol durch ein Flavobacterium sp. PhD Thesis Diss ETH 6421, ETH Zürich, Switzerland.
- Perei K., Raikhely G., Kiss I., Polyak B. and Kovács K.L. (2001). Biodegradation of sulfanilic acid by *Pseudomonas paucimobilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **55**, 101-107.
- Roxon J.J., Ryan A.J. and Wright S.E. (1967). Reduction of water-soluble azo dyes by intestinal bacteria. *Food and Cosmetics Toxicology*, **5**, 367-369
- Sugiura W., Miyashita T., Yokoyama T. and Arai M. (1999). Isolation of azo dye degrading microorganisms and their application to white discharge printing of fabric. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **88**, 577-581
- Tan NCG., Prenafeta-Boldu F.X., Opesteeg J.L., Lettinga G., Field J.A. (1999). Biodegradation of azo dyes in cocultures of anaerobic granular sludge with aerobic aromatic amine degrading enrichment cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **51**, 865-871.
- Thurneer T., Cook A.M. and Leisinger T. (1988). Co-culture of defined bacteria to degrade seven sulfonated aromatic compounds: efficiency, rates and phenotypic variations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **29**, 605-609.
- Thurneer T., Köhler T., Cook A.L. and Leisinger, T. (1986). Ortho-nitrobenzoic acid and analogues as carbon sources for bacteria: Growth, physiology and enzymatic desulfonation. *Journal of General Microbiology*, **132**, 1215-1220.
- Thurneer T., Köhler T., Cook A.M. and Leisinger T. (1986). Ortho-nitrobenzoic acid and analogues as carbon source for bacteria: growth physiology and enzymatic desulfonation. *Journal of General Microbiology*, **132**, 1215-1220.
- Van der Zee F.P., Lettinga G., Field J.A. (2000). The role of (auto)catalysis in the mechanism of an anaerobic azo reduction. *Water Science and Technology*, **42**(5-6), 301-308.

Wuhrmann K., Mechsner K.I. and Kappeler Th. (1980). Investigation on rate - determinig factors in the microbial reduction of azo dyes. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, **9**, 325-228.

Yatome C., Mastufuru H., Taguchi T. and Ogawa T. (1993). Degradation of 4'-demethylaminoazobencene-2-carboxilic acid by *Pseudomonas stuizeri*. *Aplied Microbiology and Biotechnology*, **39**, 778-781.



## Capítulo 6

### Biodegradación anaerobia del tinte azo *Acid Orange 7* en continuo y semicontinuo

#### 6.1. Introducción

El objetivo de los estudios de degradación en discontinuo de compuestos potencialmente recalcitrantes o tóxicos, como algunos compuestos utilizados en los procesos de tinción industrial, es determinar la viabilidad y, en su caso, las condiciones óptimas de operación para el diseño de un sistema de tratamiento continuo o semicontinuo para efluentes que contengan este tipo de sustancias.

En el caso concreto de aguas que contengan tintes tipo azo, los procesos biológicos en continuo más desarrollados son los basados en sistemas bacterianos aerobio y anaerobio y, en menor medida, sistemas de tratamiento con hongos.

En relación con estos últimos, recientemente se ha operado un reactor de relleno con *Phanerochaete chrysosporium* durante más de 30 días, con una eficacia de decoloración de AO7 superior al 95% a una velocidad de carga de  $0,2 \text{ g AO7}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  ( $0,57 \text{ mM}\cdot\text{d}^{-1}$ ). El reactor operó a  $37^\circ\text{C}$  con adición pulsante de oxígeno, si bien, cuando se operó con aire la eficacia cayó por debajo del 55% (Mielgo *et al.*, 2001). Zhang *et al.* (1999) demostraron que con hongos de putrefacción blanca se podía conseguir decolorar el *Acid Orange 7* en un reactor, operando en continuo de manera estable durante dos meses. A pesar de ello, hay serios problemas que interfieren en la utilización de estos sistemas para el tratamiento de aguas residuales coloreadas (Stolz, 2001). Por una parte, las plantas residuales no son el hábitat natural de los hongos ligninolíticos y además, las lignino-peroxidasas tienen una actividad óptima a un pH comprendido entre 4,5 y 5,0, que exigiría un pH ligeramente ácido en el sistema; esto supondría un gran gasto, ya que no es un pH habitual en estos sistemas



y además, podría inhibirse el crecimiento de otros microorganismos útiles (Swamy y Ramsay, 1999a). Además, los enzimas ligninolíticos de los hongos de putrefacción blanca, en la mayoría de los casos, se expresan sólo durante el metabolismo secundario de estos hongos, cuando crecen en condiciones de limitación de carbono y nitrógeno. Esto exigiría la adición de una fuente de carbono adicional para conseguir el crecimiento de estos microorganismos, ya que ni la lignina ni otros contaminantes degradados por estos enzimas son utilizados como fuente de carbono o energía por estos hongos (Swamy and Ramsay, 1999b). Por otro lado, las ligninoperoxidasas son muy poco específicas y en aguas residuales con mezclas complejas de distintos compuestos (como podría ocurrir con un agua residual industrial) podría producirse la oxidación no deseada de alguno de estos compuestos.

A pesar de que hay trabajos acerca de la decoloración bacteriana en condiciones aerobias de compuestos azo por mecanismos reductores (incluso con grupos sulfónicos, como es el caso de *Acid Orange 7*, *Acid Orange 10*, *Acid Red 4*, *Acid Red 88* ó *Acid Orange 8*), en presencia de otras fuentes adicionales de carbono (Coughlin *et al.*, 1997; Dykes *et al.*, 1994; Jiang and Bishop, 1994; Sugiura *et al.*, 1999) e incluso, utilizando el compuesto azo como única fuente de carbono y energía (Overney, 1979; Kulla, 1981; 1984; Contzen *et al.*, 2000; Coughlin *et al.*, 1999), la opción de usar EDAR convencionales para el tratamiento de aguas con tintes azo tampoco es aconsejable, ya que, en general, la mayoría de los compuestos azo no son degradados por estas bacterias y, en ocasiones, se produce una adsorción física de estos compuestos sobre el lodo (Clarke y Anliker, 1980; Shaul *et al.*, 1991; Pagga y Brown, 1986; Pagga y Taeger, 1994).

La reducción de los compuestos azo en un sistema anaerobio de tratamiento de aguas residuales parece ser una buena alternativa para la decoloración de aguas que contienen tintes azo. Este proceso presenta una serie de ventajas (Stolz, 2001), dado que estos procesos tienen lugar a valores de pH neutros y la velocidad del proceso se incrementa cuando hay otras fuentes de carbono presentes, ya que, durante la oxidación anaerobia de éstas, se generan equivalentes reductores que son usados para la reducción del compuesto azo. El principal problema que plantea el tratamiento

anaerobio de aguas residuales que contienen tintes azo es la formación de aminas aromáticas que, en la mayoría de los casos no son degradadas por las bacterias anaerobias aunque sí por bacterias aerobias. La combinación de los tratamientos anaerobio y aerobio, secuencial (en sistemas independientes o en el mismo sistema), o simultáneamente, para conseguir la mineralización de estos compuestos, es por tanto una excelente opción a considerar.

En este sentido, Tan *et al.* (1999a) realizaron ensayos en discontinuo con el tinte azo *Mordant Orange 1* con lodo metanogénico expuesto a oxígeno, concluyendo que la reducción de un tinte azo en presencia de oxígeno es posible siempre que haya una fuente de carbono disponible, utilizada mayoritariamente por bacterias facultativas aerobias, y que proporciona equivalentes reductores para la reducción del tinte. En base a estos resultados, pusieron en marcha un reactor EGSB (Expanded Granular Sludge Bed) en el cual se combinaban condiciones anaerobias y aerobias (la aireación se introducía en la corriente de recirculación) para tratar el tinte azo 4-fenilazonaftol. Mientras que en otro reactor que operaba sin aireación se eliminó el tinte pero no sus intermedios, en el reactor con aireación se consiguió la total eliminación del tinte y los intermedios (Tan *et al.*, 1999b). Operando con un sistema secuencial basado en un reactor anaerobio EGSB y un reactor aerobio, consiguió mineralizar el tinte azo *Mordant Yellow 10*, con una velocidad de carga de  $210 \text{ mg} \cdot \text{L}_{\text{reactor}}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ . Para conseguir la mineralización del tinte se inoculó un cultivo enriquecido en el reactor aerobio, que presentaba actividad degradativa de Ácido Sulfanílico, procedente de un sedimento del Rhin, ya que este compuesto se generaba en la reducción del *Mordant Yellow 10* (Tan *et al.*, 2000).

Kudlich *et al.* (1996) emplearon un sistema basado en la inmovilización de células de un cultivo mixto de bacterias capaces de degradar naftalenosulfonato sobre bolas de alginato sódico. El sistema estaba aireado y se obtenían perfiles de concentración de oxígeno en las bolas, de manera que en el interior las condiciones eran prácticamente anaerobias y se conseguía la reducción del tinte azo, oxidándose en la parte exterior de las bolas las aminas aromáticas generadas. Este sistema sirvió para la mineralización de los tintes azo *Mordant Yellow 3*, *Amaranth* y *Acid Red 1*.

Rajaguru *et al.* (2000) emplearon un sistema secuencial anaerobio-aerobio, constituido por un reactor anaerobio de lecho fijo y un reactor aerobio de tanque agitado. Para los dos reactores emplearon un cultivo mixto de lodo procedente de la planta de tratamiento de aguas residuales de una industria textil. Con este sistema consiguieron mineralizar los tintes azo *Orange G*, *Amido Black 10B*, *Direct Red 4BS* y *Congo Red*.

Cruz y Buitrón (2000) consiguieron decolorar el tinte azo *Disperse Blue 79*, con eficacias del 95%, en un reactor SBR (Secuencing Batch Reactor) con relleno, aunque no consiguieron mineralizarlo. Lourenço *et al.* (2000) también alcanzaron altos niveles de decoloración con el tinte azo *Remazol Brilliant Violet 5R*, operando con un reactor SBR, pero sin conseguir la mineralización. Quezada *et al.* (2000) también usaron un reactor SBR con relleno para degradar tintes azo (*Acid Red 151* y un efluente textil que contenía los tintes *Basic Blue 41*, *Basic Red 46* y *16*, y *Basic Yellow 28* y *19*). En el caso del *Acid Red 151* comprobaron que el 73% del tinte se mineralizaba.

El objetivo de este trabajo fue el estudio de la degradación del tinte azo *Acid Orange 7* en condiciones anaerobias, en sistemas en continuo y semicontinuo (sistemas en discontinuo con adiciones sucesivas). En el caso de los sistemas semicontinuos, se realizaron tres adiciones sucesivas de tinte sin cosustrato, con cosustrato sólo en la primera adición o en todas, para estudiar cómo evolucionaba la velocidad de degradación del tinte en las sucesivas adiciones, en función de las condiciones aplicadas. En los sistemas en continuo se estudiaron las condiciones que permitían la degradación del tinte, operando con una velocidad de carga alta y una eficacia de degradación elevada.

## **6.2. Materiales y Métodos**

### **6.2.1. Biomasa**

La biomasa que se utilizó en estos experimentos procede de los lodos generados en un reactor anaerobio a escala piloto instalado en una factoría dedicada a la

fabricación de tableros de fibra de madera (TAFISA) (Fernández *et al.*, 2001). Estos efluentes industriales contienen compuestos lignocelulósicos aunque ningún tinte, por lo cual el lodo utilizado no estaba aclimatado a este tipo de compuestos. Su característica física más importante es su constitución granular.

### 6.2.2. Ensayos en discontinuo con adiciones sucesivas

Los ensayos se llevaron a cabo en botellas de 500 mL (de los cuales, 250 fueron ocupados por la fase líquida) sin agitación. El medio de nutrientes estaba formado por ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ):  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (230),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (37),  $\text{MgSO}_4$  (6),  $\text{CaCl}_2$  (6), junto con los siguientes elementos traza ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ):  $\text{FeCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (2 000),  $\text{HBO}_3$  (350),  $\text{ZnCl}_2$  (50),  $\text{CuCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (38),  $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (500),  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (50),  $\text{AlCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (90),  $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (2 000),  $\text{NiCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (92),  $\text{Na}_2\text{SO}_3\cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (164), EDTA (1 000), Resazurina (200) y  $\text{HCl}$  ( $1\ \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Se añadió  $\text{NaHCO}_3$  a razón de 1 g: g DQO y para eliminar el oxígeno disuelto se añadió  $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$  en concentración de  $100\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . El pH en las botellas se ajustó a  $7,0\pm 0,1$ , empleando para ello disoluciones de  $\text{HCl}$  y  $\text{NaOH}$ . El espacio libre de las botellas fue gasificado con una mezcla  $\text{N}_2/\text{CO}_2$  (70:30) durante 5 minutos para retirar el oxígeno y aumentar la capacidad tampón del sistema. Las botellas se mantuvieron en una cámara termostaticada a  $37\text{-}38\ \text{°C}$  para operar en rango mesófilo..

Las concentraciones de lodos fueron aproximadamente de  $1,0\text{-}1,2\ \text{g SSV}\cdot\text{L}^{-1}$ , tal y como se recomienda para los ensayos de actividad realizados sin agitación (Field *et al.*, 1988).

Todos los ensayos se hicieron por duplicado. Se emplearon concentraciones de AO7 comprendidas entre  $0,06$  y  $0,90\ \text{mM}$  ( $20$  y  $315\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). En los ensayos con cosustrato se añadió glucosa en concentración en torno a  $2,0\text{-}2,5\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

El procedimiento de operación fue el mismo en todos los ensayos. Así, cuando se detectaba la degradación del tinte se procedía a la adición de un nuevo volumen de disolución concentrada de tinte para lograr una concentración similar a la inicial. En los ensayos con cosustrato, en algún caso también se adicionó glucosa.

### **6.2.3. Ensayos en continuo**

Se pusieron en marcha dos reactores UASB de vidrio con un volumen útil de 750 mL (Fig. 6.1). Uno de ellos operó inicialmente con una concentración de AO7 alimentada de 0,29 mM (100 mg L<sup>-1</sup>), una concentración de glucosa en torno a los 2 g L<sup>-1</sup> y un TRH de 2 días, posteriormente este TRH fue reducido hasta 0,5 días y la concentración de AO7 alimentada se aumentó a 0,43 mM (150 mg L<sup>-1</sup>) y finalmente a 0,57 mM (200 mg L<sup>-1</sup>). El otro reactor se operó inicialmente con una concentración de AO7 de 0,29 mM y una concentración de glucosa de 1 g L<sup>-1</sup> que, posteriormente se redujo a 0,5 g L<sup>-1</sup>. El TRH inicialmente fue de 2 días y posteriormente se redujo hasta 0,5 días.

El caudalímetro empleado para medir el gas producido ha sido descrito por Veiga *et al.* (1990). Los reactores se mantuvieron en una cámara termostaticada a 37±1 °C. La concentración de biomasa en ambos reactores fue aproximadamente 15 g SSV·L<sup>-1</sup>.

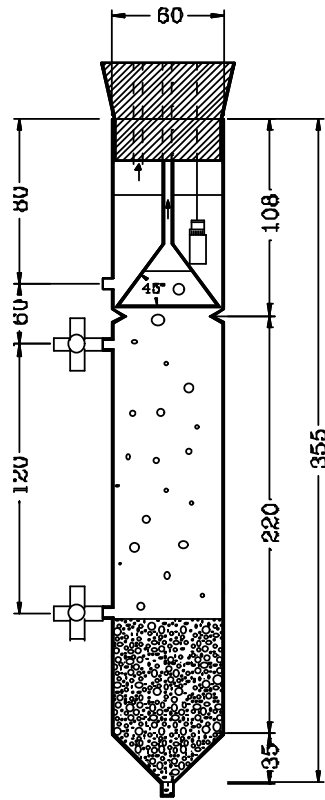
La alimentación a los reactores se realizó mediante bombas peristálticas de caudal fijo (Masterflex Cole Pharmar Mod. 7544-02 y 7544-06) equipadas con tubos Masterflex Phar-Med 6485-25, que suministraban unos caudales de 2,2 y 4,3 mL·min<sup>-1</sup>, respectivamente.

Para la recirculación se empleó una bomba peristáltica Masterflex Cole Pharmar Mod. 7554-20 de velocidad variable (6-600 r.p.m.). La bomba disponía de dos cabezales que permitieron el uso de una sola bomba para recircular ambos reactores, generando el mismo caudal de recirculación. Los tubos empleados fueron Masterflex Phar-Med 6485-16. El caudal empleado para la recirculación de los reactores fue de 90-100 mL·min<sup>-1</sup>.

## **6.3. Resultados**

### **6.3.1. Ensayos en discontinuo con adiciones sucesivas**

En todos los casos se realizaron tres adiciones. En la Tabla 6.1 se muestra un esquema de las características de los tres ensayos realizados.



**Figura 6.1.** Esquema de los reactores UASB de 750 mL.

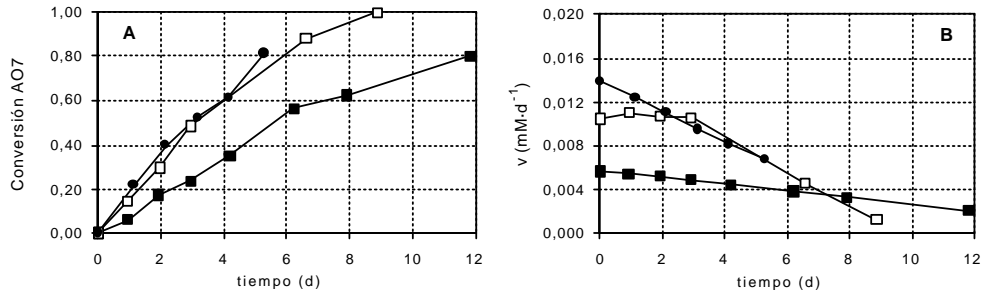
**Tabla 6.1.** Esquema de los distintos tipos de ensayos realizados con adiciones sucesivas.

Ensayo	1 <sup>a</sup> adición		2 <sup>a</sup> adición		3 <sup>a</sup> adición	
	AO7	Glucosa	AO7	Glucosa	AO7	Glucosa
FB1	+	-	+	-	+	-
FB2	+	+	+	-	+	-
FB3	+	+	+	+	+	+

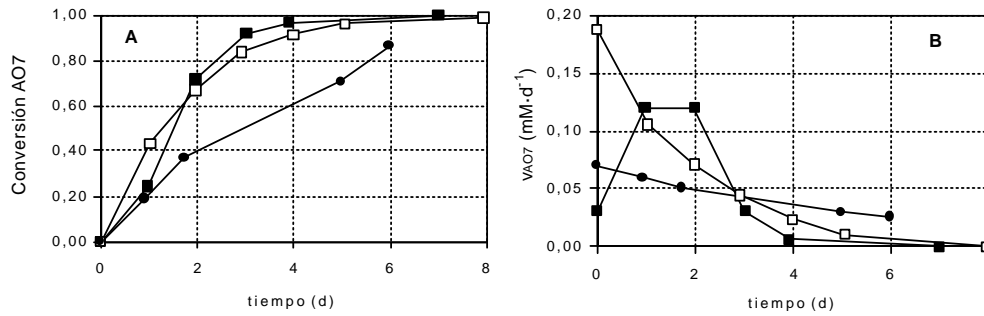
En el ensayo realizado sin cosustrato (FB1), la concentración inicial de AO7 fue 0,06-0,07 mM. La segunda adición se realizó el día 33 de operación, mientras que la tercera se realizó el día 56.

Se observó un considerable aumento de velocidad en la segunda adición, con respecto a la primera (Fig. 6.2); necesitándose 9 días para convertir todo el AO7, frente a los 15 que fueron necesarios en la primera adición. En la tercera adición no se produjo un aumento de velocidad significativo, con respecto a la segunda. La comparación de los valores de velocidad inicial, máxima y media (Tabla 6.2) en la 1ª y 3ª adición, permite establecer un incremento superior al 100% en dichos parámetros.

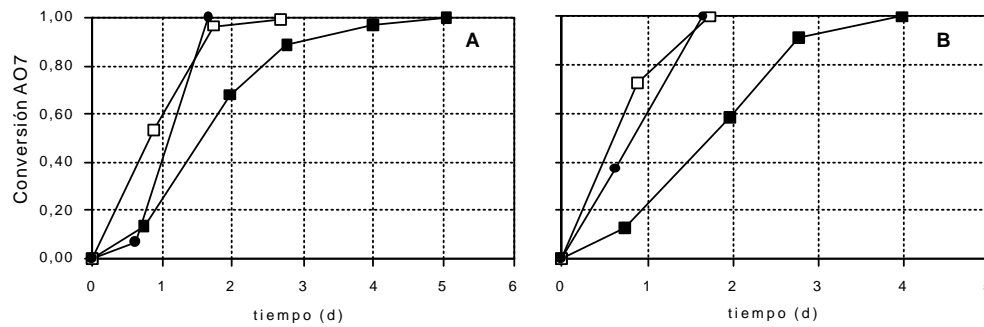
En el ensayo FB2 solamente se añadió cosustrato en la primera adición. Las concentraciones iniciales de AO7 estuvieron en torno a 0,30-0,35 mM y la concentración de DQO biodegradable al comienzo del experimento fue 2,4 g·L<sup>-1</sup> (valores no mostrados). En la primera adición la eliminación de AO7 fue rápida (4 días), siendo la velocidad inicial de 0,03 mM·d<sup>-1</sup>, alcanzando en los días 1 y 2 de operación unos valores máximos en torno a 0,12 mM·d<sup>-1</sup> (Fig. 6.3). La concentración de DQO al realizar la segunda adición estuvo en torno a 1,0 g·L<sup>-1</sup>, siendo del ácido propiónico el principal aporte ya que permaneció en el medio en concentraciones en torno a 0,6 g·L<sup>-1</sup> (valores no mostrados). El tiempo necesario para eliminar el AO7 fue prácticamente el mismo que en la primera adición (0,92 de conversión en el día 4), si bien la velocidad fue siempre descendente, con un valor máximo de 0,19 mM·d<sup>-1</sup>. En esta segunda adición apenas hubo degradación de DQO ya que, la concentración de DQO biodegradable tras la tercera adición fue 0,85 g·L<sup>-1</sup> y la concentración de ácido propiónico durante esta última adición se mantuvo en torno a 0,4-0,5 g·L<sup>-1</sup>. La velocidad de eliminación de AO7 en esta última adición fue apreciablemente menor que en las dos anteriores (Tabla 6.2) y en el día 6 de operación todavía no se había alcanzado una conversión del 90%.



**Figura 6.2.** Conversión (A) y velocidad (B) calculados para la 1<sup>a</sup> (■), 2<sup>a</sup> (□) y 3<sup>a</sup> (●) adición en el ensayo FB1 (sin cosustrato).



**Figura 6.3.** Conversión (A) y velocidad (B) en la 1<sup>a</sup> (■), 2<sup>a</sup> (□) y 3<sup>a</sup> (●) adición del ensayo FB2 (con cosustrato en la 1<sup>a</sup> adición).

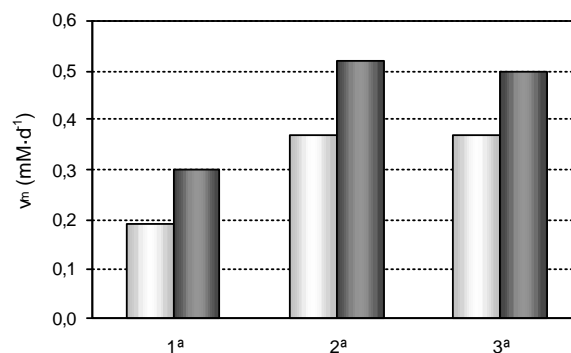


**Figura 6.4.** Conversión de AO7 para la 1<sup>a</sup> (■), 2<sup>a</sup> (□) y 3<sup>a</sup> (●) adición en el ensayo FB3 (a y b) (con cosustrato en las tres adiciones).



El ensayo FB3 se realizó añadiendo en todas las adiciones, tanto tinte como cosustrato. En este caso las concentraciones de AO7 adicionadas fueron altas, realizándose dos variantes; en una de ellas (FB3a) las concentraciones iniciales de AO7 estuvieron entre 0,60-0,75 mM, mientras que en la otra (FB3b) estuvieron entre 0,80-0,90 mM. En ambos casos el comportamiento fue muy similar (Fig. 6.4), necesitándose 5 días para la total conversión del AO7 durante la primera adición y, solamente 2 días durante la segunda y la tercera. Las velocidades medias en cada una de las tres adiciones, para las dos variantes de este ensayo se muestran en la Fig. 6.5.

El objetivo de este experimento es el estudio de la velocidad de degradación del AO7, al margen de la degradación de la DQO y por ello, cuando se realizó la segunda adición el día 6, todavía no se había degradado la DQO aportada por la glucosa, por lo cual se acumuló una gran concentración de DQO (posiblemente en forma de AGV) y, a pesar de que la tercera adición se realizó el día 34 de operación para permitir que la DQO se degradara, no fue así y es de suponer que la metanogénesis resultó inhibida por una alta concentración de AGV.



**Figura 6.5.** Velocidad media de eliminación de AO7 media en cada una de las tres adiciones para los ensayos FB3a (□) y FB3b(■).

Paralelamente a estos ensayos se realizó un blanco en las mismas condiciones que los ensayos FB3a y FB3b, pero sin AO7. El efecto tóxico sobre la metanogénesis se

produjo también en el blanco (Fig. 6.6) por lo que dicho efecto tóxico en los ensayos FB3 no debe ser achacable el AO7 ni a sus intermedios.

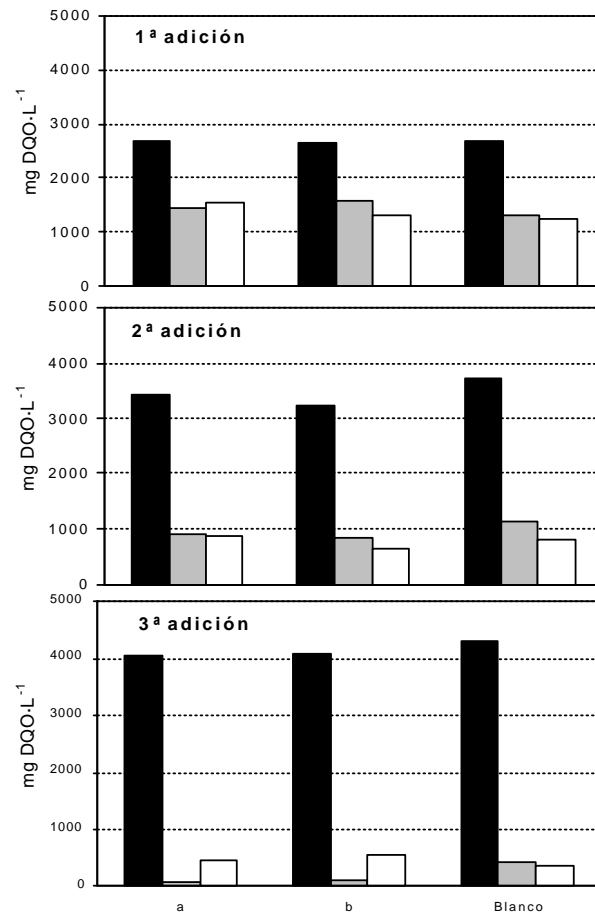
**Tabla 6.2.** Valores de velocidad inicial ( $v_0$ ), máxima ( $v_{max}$ ) y media ( $v_m$ ) para los ensayos en discontinuo con adiciones sucesivas.

Ensayo	Adición	[AO7] <sub>0</sub> mM	$V_0$ mM·d <sup>-1</sup>	$v_{max}$ mM·d <sup>-1</sup>	$v_m$ mM·d <sup>-1</sup>
FB1	1 <sup>a</sup>	0,06	0,006	0,006	0,004
	2 <sup>a</sup>	0,07	0,010	0,011	0,008
	3 <sup>a</sup>	0,07	0,014	0,014	0,010
FB2	1 <sup>a</sup>	0,30	0,031	0,120	0,062
	2 <sup>a</sup>	0,35	0,187	0,187	0,074
	3	0,31	0,070	0,070	0,047
FB3a	1 <sup>a</sup>	0,77			0,30
	2 <sup>a</sup>	0,66			0,52
	3	0,61			0,50
FB3b	1 <sup>a</sup>	0,90			0,19
	2 <sup>a</sup>	0,90			0,37
	3	0,82			0,37

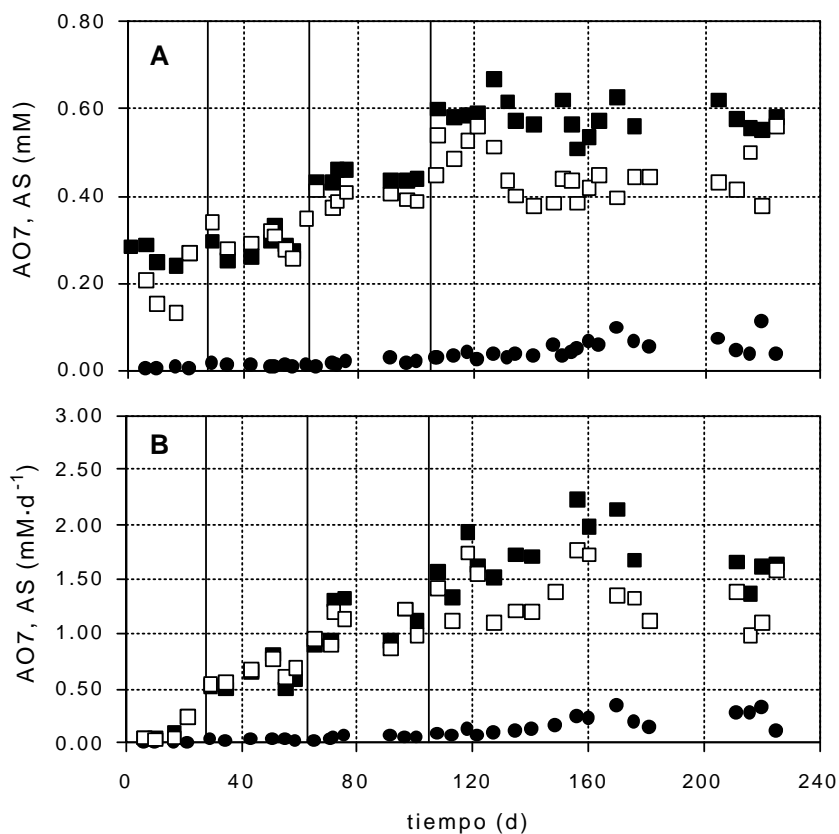
### 6.3.2. Ensayos en continuo

El reactor R1 se operó durante 230 días (Fig. 6.7). Durante este período hubo distintas etapas de operación. En la primera etapa la concentración de AO7 alimentado fue en torno a 0,29 mM (100 mg·L<sup>-1</sup>) y el TRH medio estuvo en torno a 3 días. Este primer período, de 27 días, fue básicamente de puesta en marcha. En el segundo período la concentración de AO7 alimentada fue la misma y el TRH se redujo a 0,5 días; este período de operación duró 36 días. En el tercer período, de 41 días de duración, el TRH se mantuvo pero la concentración de AO7 en el influente se incrementó a 0,43 mM (150 mg L<sup>-1</sup>). El cuarto y último período de operación fue el

más largo, ya que duró 119 días. En este período el TRH estuvo en torno a 0,4 días y la concentración de AO7 en el influente fue 0,58 mM (200 mg L<sup>-1</sup>). En la Fig. 6.9 se muestra el nivel de decoloración alcanzado.

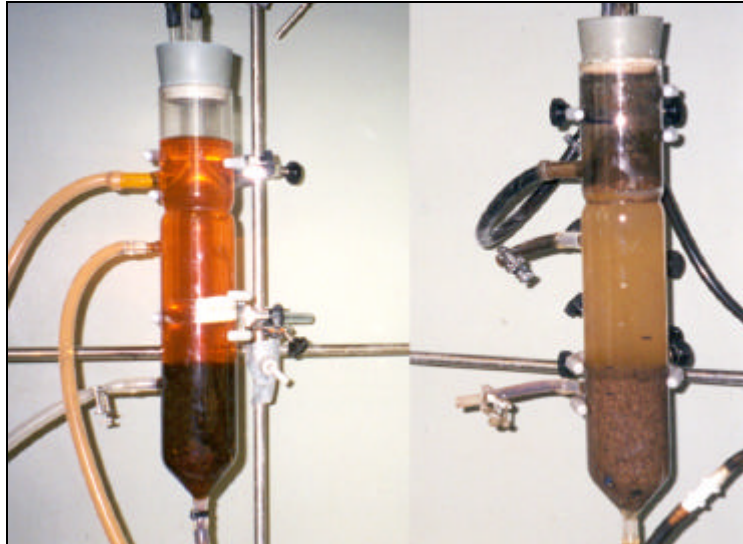


**Figura 6.6.** Valores de concentración de DQO inicial biodegradable ( ■ ), DQO eliminada ( ■ ) y DQO generada como metano ( □ ) para los ensayos FB3 (a, b y blanco), para cada adición.



**Figura 6.7.** (A) Concentración de AO7 en la entrada (■) y en la salida (●) del reactor R1 y de AS en la salida (□) en mM. (B) Velocidad de carga de AO7 correspondientes a la entrada (■) y salida (●), así como de AAS (□) en la salida en mM·d<sup>-1</sup>.

En todos los períodos el porcentaje medio de eliminación de AO7 se mantuvo por encima del 90% y el porcentaje de eliminación de color se mantuvo por encima del 85% (Tabla 6.3). El AS se obtuvo en el efluente en concentraciones prácticamente estequiométricas. Las desviaciones más importantes de la concentración estequiométrica se produjeron en el 1<sup>er</sup> y 4<sup>o</sup> períodos (26% y 13%, respectivamente).

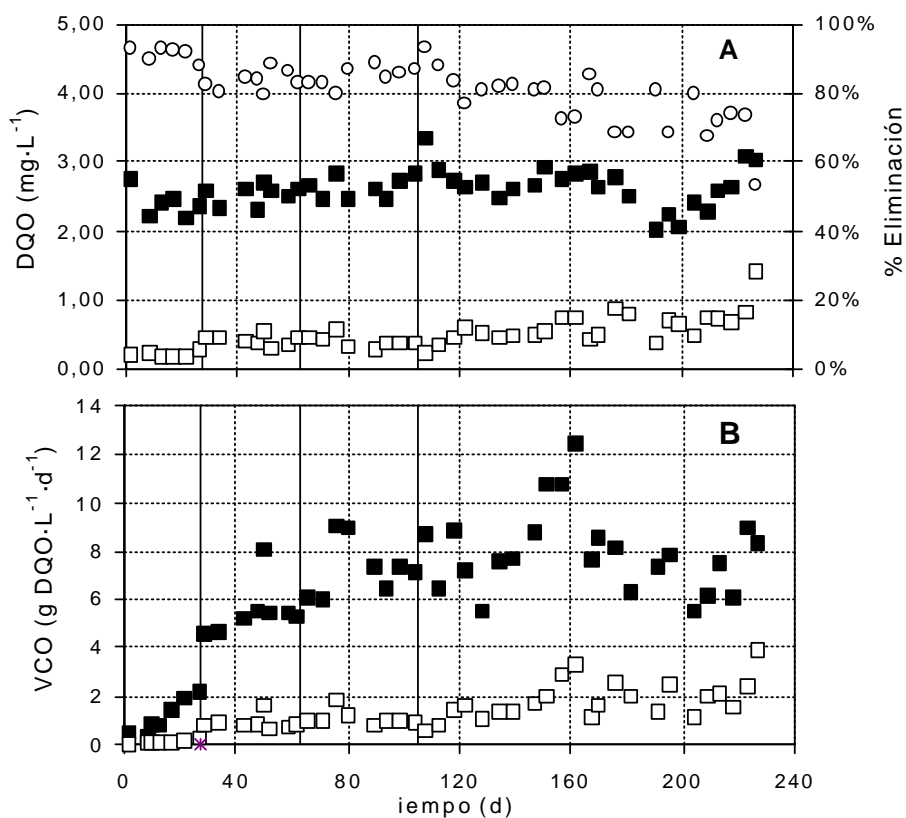


**Figura 6.9.** Vista del reactor R2 (izquierda) en el momento de su puesta en marcha y del reactor R1(derecha) en un estado estacionario de su operación.

El nivel de eliminación de DQO se mantuvo alto, incluso cuando se alimentaron 0,59 mM de AO7 (Figura 6.8), estando próximo al 80%. Este valor sería del 87% si se considera sólo la DQO biodegradable, suponiendo que la DQO aportada por el AO7 no sufre variaciones en el reactor, lo cual es probable ya que no se observó mineralización. Puede decirse entonces que no hubo efecto tóxico significativo producido por el tinte o las aminas aromáticas generadas en su degradación.

El porcentaje de metano y CO<sub>2</sub> en el biogás generado fue del 60-65% y 16-25%, respectivamente, en los distintos períodos de operación.

En la Tabla 6.3 pueden verse los valores medios de los parámetros más importantes en estos períodos de operación.



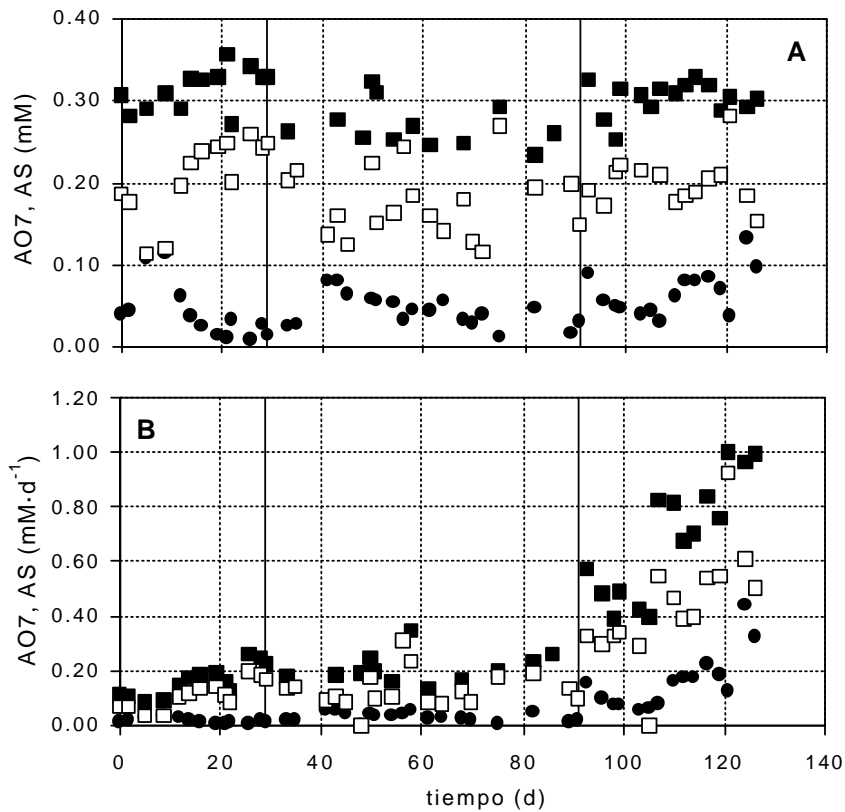
**Figura 6.8.** (A) Concentración de DQO en la entrada (■) y en la salida (□) del reactor R1 y porcentaje de depuración (○). (B) Velocidad de carga orgánica en la entrada (■) y en la salida (□).

El reactor R2 (Fig. 6.10) operó con una concentración de AO7 en la alimentación en torno a  $0,29 \text{ mM}$  ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) y una concentración de glucosa en torno a  $1 \text{ g L}^{-1}$ . En este período el TRH se mantuvo en 2 días. En estas condiciones la eliminación de AO7 fue superior al 85% y la eliminación de DQO próxima al 80% (Tabla 6.4). En el segundo período de operación, la concentración de glucosa alimentada se redujo a  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  y el TRH fue inferior al del primer período (en torno a 1,5 días). En estas

condiciones, la eliminación de AO7 se mantuvo con respecto a los valores obtenidos en el primer período, a pesar de la disminución del TRH y de la concentración de glucosa alimentada. La eliminación de DQO fue inferior, debido a que el porcentaje de DQO aportada por el tinte aumenta y ésta se mantiene debido a que no se consigue la mineralización del compuesto. En el siguiente período se redujo todavía más el TRH hasta un valor medio de 0,5 días, manteniéndose el resto de los parámetros de operación. En este período la eliminación de AO7 disminuyó ligeramente hasta un valor medio del 78% que, no obstante, es alto teniendo en cuenta las condiciones de operación.

**Tabla 6.3.** Valores medios de las propiedades más importantes medidos para los distintos períodos de operación del reactor R1.

<b>Período</b>			<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>Nº días</b>			27	36	41	119
<b>TRH</b>		<i>d</i>	3,3	0,5	0,4	0,3
<b>AO7</b>	Entrada	<i>mM</i>	0,27	0,29	0,44	0,58
	Salida	<i>mM</i>	0,01	0,01	0,02	0,05
	Eliminación	%	98	96	96	92
<b>AS</b>	Salida	<i>mM</i>	0,19	0,30	0,38	0,46
<b>Color</b>	Eliminación	%	91	89	90	86
<b>DQO</b>	Entrada	<i>gL<sup>-1</sup></i>	2,6	2,5	2,7	2,7
	Salida	<i>gL<sup>-1</sup></i>	0,2	0,4	0,4	0,6
	Eliminación	%	92	84	84	78
<b>VCO</b>	Entrada	<i>gL<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup></i>	1,3	5,5	7,4	8,1
	Salida	<i>gL<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup></i>	0,1	0,9	1,1	1,8



**Figura 6.10.** (A) Concentración de AO7 en la entrada (■) y en la salida (●) del reactor R2 y de AS en la salida (□) en mM. (B) Velocidad de carga de AO7 en la entrada (■) y en la salida (●) y de AS (□) en la salida en  $\text{mM}\cdot\text{d}^{-1}$ .

Antes de finalizar la operación se cambiaron los parámetros de operación de los dos reactores, de manera que ambos se mantuvieron en las mismas condiciones. De esta manera, el reactor R1 fue operado en las mismas condiciones del período 4 pero disminuyendo la concentración de glucosa, primero a  $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  y después a  $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Mientras, el reactor R2 operó en las mismas condiciones que en el período 3 pero la



concentración de AO7 alimentada se incrementó primero hasta 0,42 mM y después hasta 0,57 mM.

**Tabla 6.4.** Valores medios de las propiedades más importantes medidos para los distintos períodos de operación del reactor R2.

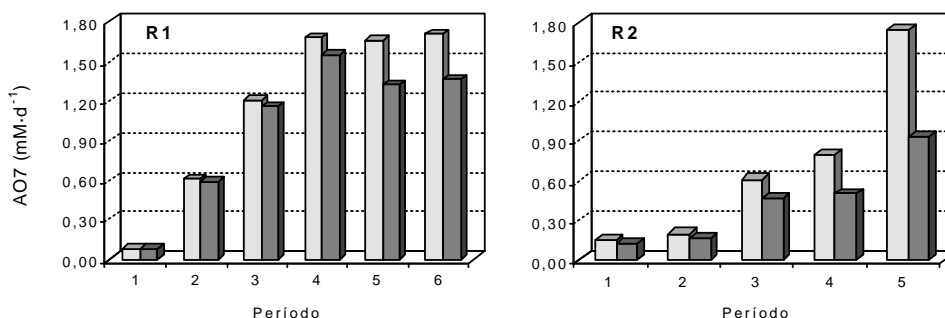
<b>Período</b>			<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>Nº días</b>			27	36	41
<b>TRH</b>		<i>d</i>	2,1	1,4	0,5
<b>AO7</b>	Entrada	<i>mM</i>	0,31	0,27	0,30
	Salida	<i>mM</i>	0,04	0,04	0,07
	Eliminación	%	86%	84%	78%
<b>AS</b>	Salida	<i>mM</i>	0,20	0,18	0,20
<b>Color</b>	Eliminación	%	83%	79%	70%
<b>DQO</b>	Entrada	<i>gL<sup>-1</sup></i>	0-96	0-38	0,48
	Salida	<i>gL<sup>-1</sup></i>	0,21	0,14	0,23
	Eliminación	%	78%	63%	53%
<b>VCO</b>	Entrada	<i>gL<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup></i>	0,45	0,28	1,04
	Salida	<i>gL<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup></i>	0,11	0,11	0,52

Mientras que el reactor R2 perdió eficacia al trabajar con altas concentraciones de AO7 en la alimentación (Tabla 6.5), el reactor R1 mantuvo un elevado porcentaje de eliminación de AO7 pese a trabajar con bajas concentraciones de glucosa. En base a los valores medios de AO7 eliminado (Fig. 6.11), se puede observar que mientras en el reactor R1 la disminución de la alimentación de glucosa de 2,5 a 0,5 g·L<sup>-1</sup> supone eliminar un 12% menos de AO7, el reactor R2, con un TRH similar duplica su capacidad de degradación de AO7 al aumentar la concentración alimentada hasta 0,57 mM y reducir ligeramente el TRH hasta 0,3 días. De todos modos, pese a este aumento en la cantidad de AO7 eliminado, solamente se elimina el 54% del AO7 alimentado.

**Tabla 6.5.** Valores medios de las propiedades más importantes medidos para los últimos períodos de operación de los reactores R1 y R2.

<b>R1</b>	<b>Período</b>		<b>5</b>	<b>6</b>	
	<b>Nº días</b>		14	10	
	<b>TRH</b>	<i>d</i>	0,4	0,3	
	<b>AO7</b>	entrada	<i>mM</i>	0,56	0,52
		salida	<i>mM</i>	0,12	0,11
		eliminación	%	78%	79%
	<b>Color</b>	eliminación	%	78%	76%
	<b>DQO</b>	entrada	<i>gL<sup>-1</sup></i>	1,0	0,6
		salida	<i>gL<sup>-1</sup></i>	0,4	0,3
<b>R2</b>	<b>Período</b>		<b>4</b>	<b>5</b>	
	<b>Nº días</b>		12	6	
	<b>TRH</b>	<i>d</i>	0,5	0,3	
	<b>AO7</b>	entrada	<i>mM</i>	0,42	0,57
		salida	<i>mM</i>	0,15	0,27
		eliminación	%	63%	54%
	<b>Color</b>	eliminación	%	57%	49%
	<b>DQO</b>	entrada	<i>gL<sup>-1</sup></i>	0,53	0,55
		salida	<i>gL<sup>-1</sup></i>	0,35	0,41

Cuando el reactor R1 operaba en unas condiciones de 0,29 mM de AO7 en la alimentación y un TRH aproximado de 0,5 días (período 2), se tomaron muestras de influente y efluente, determinando la toxicidad por Microtox. El valor de la EC<sub>50</sub> obtenido para un tiempo de respuesta de 15 minutos fue del 2% para el influente y del 67% para el efluente. Esto indica que, a pesar de que en la reducción biológica anaerobia de los tintes azo se generan aminas aromáticas, la toxicidad del efluente resultante de este tratamiento en continuo para el AO7 es del orden de un 67% menos tóxico, según el método Microtox.



**Figura 6.11.** Valor medio de AO7 de entrada (□) y eliminado (■) en cada período para los reactores R1 y R2.

## 6.4. Discusión

### 6.4.1. Ensayos en discontinuo con adiciones sucesivas

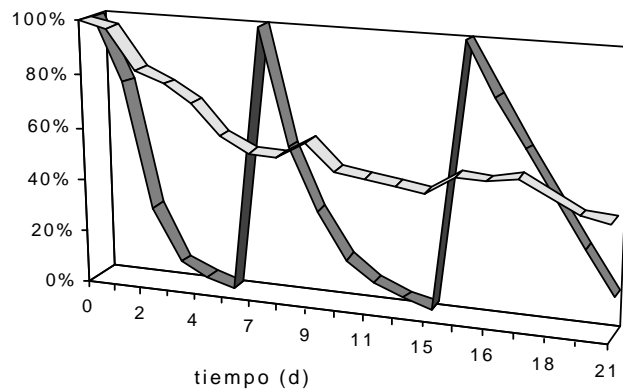
En el ensayo sin presencia de cosustrato (Fig. 6.1) se produjo un gran aumento en la velocidad de eliminación de AO7 en la segunda adición, duplicándose la velocidad inicial, mientras que en la tercera adición no hubo grandes diferencias con respecto a la segunda. Teniendo en cuenta que los factores que parece que determinan la velocidad de eliminación (además de la naturaleza del tinte que en este caso no es una variable) son la velocidad de generación de equivalentes reductores y la velocidad del transporte de éstos al compuesto azo (y, en consecuencia, la presencia de compuestos que actúen como aceleradores de este transporte), ambos factores se ven potenciados en la segunda adición. Por una parte, teniendo en cuenta que no hay una fuente de carbono externa respirable por las bacterias anaerobias, es la entrada en fase endógena del lodo lo que genera los equivalentes reductores, tras 33 días de operación (período transcurrido hasta la segunda adición) es de suponer que haya en el medio una mayor cantidad de equivalentes. Además también hay presente en el medio 1-amino-2-naftol (y/o 1,2-naftoquinona) generado en la transformación del

AO7 en la primera adición, con lo cual, debido al comportamiento transportador de electrones de este compuesto, o de los generados en su transformación (van der Zee *et al.*, 2000), también se ve favorecido el segundo factor que determina la velocidad de eliminación del AO7 (Tabla 6.6).

En el ensayo FB2 sólo se adicionó glucosa en la primera adición. El período de tiempo necesario para alcanzar la conversión total del AO7 en las dos primeras adiciones fue muy similar (4-5 días), si bien, en la segunda adición la velocidad máxima se produjo en el inicio del experimento y en la primera adición en los días 1 y 2 de operación. Esta diferencia pone de manifiesto el posible efecto del 1-amino-2-naftol (o los productos de su transformación) que, en la segunda adición está presente desde el principio. Se dan entonces en esta segunda adición dos factores que actúan de distinta manera sobre la velocidad de degradación del AO7, por un lado, el 1A2N favorece el transporte de electrones hacia el tinte, y, por otro lado, pese a que todavía permanece materia orgánica en el sistema que aporta DQO (Fig. 6.12), parece que no es biodegradable, ya que, tras la segunda adición, se mantuvo entre valores de 1 400-1 200 mg L<sup>-1</sup>, lo cual hace que no se generen electrones. En la tercera adición parece que la escasa generación de electrones debida a la actividad catabólica de las bacterias limita más la velocidad de degradación de lo que la favorece la presencia de 1A2N, con el consecuente descenso en la velocidad de degradación.

En los ensayos FB3, los dos factores que en el ensayo FB2 actuaban en sentidos opuestos (Tabla 6.6), actúan en el mismo sentido, favoreciendo la degradación del AO7 a mayor velocidad, alcanzándose valores de velocidad elevados y que se mantuvieron estables en la segunda y tercera adiciones. Hay que destacar que, a pesar de que la metanogénesis se vio inhibida en las últimas adiciones, posiblemente por una elevada acumulación de ácidos grasos volátiles en el medio, esto no afectó a la velocidad de degradación del AO7, ya que probablemente en el proceso de degradación de la glucosa a compuestos más oxidados se generan los electrones necesarios para la reducción de los compuestos azo. Esta inhibición de la metanogénesis en las alimentaciones sucesivas también se produjo en el blanco, por

lo cual no debe ser asociado con un efecto tóxico provocado por el AO7 o sus intermedios.



**Figura 6.12.** Evolución del AO7 ( ■ ) y la DQO ( ■ ) en porcentaje sobre el valor inicial

Se ha empleado la Ec. 5.4 (modelo cinético de 1<sup>er</sup> orden que considera los procesos autocatalíticos) para ajustar los valores de concentración de AO7 del ensayo FB2. Para la 2<sup>o</sup> y 3<sup>a</sup> adición la ecuación tuvo que modificarse, ya que en estos casos la ecuación cinética estaría representada por las Ecs. 6.1 y 6.2.

$$-\frac{dC}{dt} = k_1C + k_2C(C_0 + C_0' - C) \quad [6.1]$$

$$-\frac{dC}{dt} = k_1C + k_2C(C_0 + C_0' + C_0'' - C) \quad [6.2]$$

$C_0$ ,  $C_0'$  y  $C_0''$  son las concentraciones iniciales en la 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> y 3<sup>a</sup> adición, respectivamente. La Ec. 6.1 se aplica a la segunda adición y la Ec. 6.2 se aplica a la 3<sup>a</sup>.

**Tabla 6.6.** Factores que pueden tener influencia en la velocidad de degradación de AO7, para los ensayos FB1-FB3.

Ensayo	Adición	Glucosa	1A2N	DQO <sub>AGV</sub>	v <sub>AO7</sub> *
FB1	1 <sup>a</sup>				⇓⇓
	2 <sup>a</sup>		+		⇓
	3 <sup>a</sup>		+		↔
FB2	1 <sup>a</sup>	+			⇑
	2 <sup>a</sup>		+	+	⇑
	3		+	+	↔
FB3	1 <sup>a</sup>	+			⇑
	2 <sup>a</sup>	+	+	+	⇑⇑
	3	+	+	+	⇑⇑

\* Muy baja (⇓⇓); baja (⇓); intermedia (↔); alta (⇑); muy alta (⇑⇑).

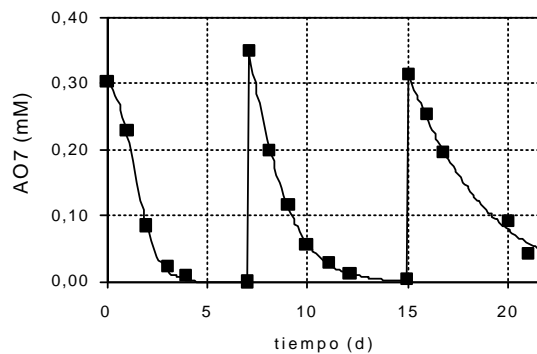
Integrando las ecuaciones se obtiene la Ec. 6.3 y la Ec. 6.4.

$$C = C_0 \frac{[k_1 + k_2(C_0 + C_0')] e^{-[k_1+k_2(C_0+C_0')]t}}{k_1 + k_2C_0 + k_2C_0' e^{-[k_1+k_2(C_0+C_0')]t}} \quad [6.3]$$

$$C = C_0 \frac{[k_1 + k_2(C_0 + C_0' + C_0'')] e^{-[k_1+k_2(C_0+C_0'+C_0'')]t}}{k_1 + k_2C_0 + k_2C_0' + k_2C_0'' e^{-[k_1+k_2(C_0+C_0'+C_0'')]t}} \quad [6.4]$$

El ajuste de los datos experimentales a estas ecuaciones fue muy correcto (Fig. 6.13). Un análisis comparativo de los valores de las constantes obtenidas en cada adición (Tabla 6.7) permite conocer que  $k_1$  permanece constante, mientras que  $k_2$  disminuye mucho en la 2<sup>a</sup> adición y prácticamente se anula en la 3<sup>a</sup>. Teniendo en cuenta que

cuando se realizaron la 2ª y 3ª adiciones había 1A2N en el medio, el efecto autocatalítico en estas adiciones no se debe notar tanto como en la 1ª ya que, quizás la cantidad de 1A2N generada en la degradación de la primera adición de AO7 sea suficiente para catalizar la degradación de las adiciones posteriores, con lo cual una concentración mayor de este compuesto no añade un mayor efecto sobre la velocidad de degradación del AO7. Entonces, en este caso la degradación de AO7 en las sucesivas adiciones sería prácticamente de 1º orden (como en efecto ocurre) y sería la constante  $k_1$  la que se vería afectada por las condiciones del sistema. Así, la presencia de 1A2N hace que en la 2ª y 3ª adiciones, la velocidad inicial (que coincide con la velocidad máxima) es mayor que en la 1ª adición, si bien, la ausencia de equivalentes reductores procedentes de la actividad catabólica de las bacterias hace que la velocidad global del proceso, que en la 2ª adición prácticamente se mantiene, en la 3ª adición sea bastante inferior.



**Figura 6.13.** Concentración de AO7 (■) y valor simulado mediante las ecuaciones 5.4, 6.3 y 6.4 (—) para el ensayo FB2.

**Tabla 6.7.** Valores de los parámetros del modelo cinético basado en la [Ec. 5] (Capítulo 5), coeficientes de correlación y velocidades inicial y máxima calculadas según el modelo, para el ensayo FB2.

Adición	$k_1$ $d^{-1}$	$k_2$ $mM \cdot d^{-1}$	$r^2$	$r_0$ $mM \cdot d^{-1}$	$r_{max}$ $mM \cdot d^{-1}$
1 <sup>a</sup>	0,12	5,76	0,999	0,036	0,152
2 <sup>a</sup>	0,12	1,03	0,999	0,152	0,152
3 <sup>a</sup>	0,12	0,20	0,990	0,078	0,078

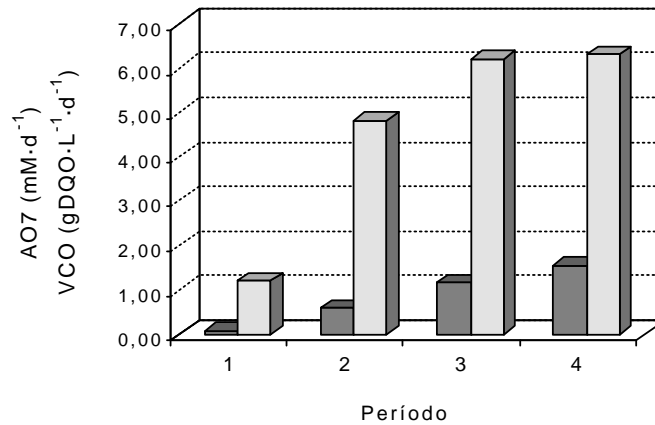
#### 6.4.2. Ensayos en continuo

El reactor R1 operó siempre con una eficacia de eliminación de AO7 superior al 90% (ver Tabla 6.3). Al aumentar la concentración de AO7 en el influente y reducir el TRH, el nivel de eliminación de tinte apenas se ve afectado. Así, durante el período 4 se llegó a alcanzar una velocidad de eliminación de AO7 media de  $1,55 \text{ mM} \cdot \text{d}^{-1}$  ( $542 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ). Esta cantidad es superior a la alcanzada en otros trabajos de tratamiento de tintes azo en continuo. Por ejemplo, Rajaguru *et al.*, (2000) trataron varios tintes azo en continuo, en un sistema secuencial anaerobio-aerobio, con un TRH total de 3 días. Las velocidades máximas de eliminación alcanzadas para el *Amido Black 10B*, *Congo Red* y *Direct Red* fueron  $0,08 \text{ mM} \cdot \text{d}^{-1}$  ( $51,3 \text{ mg L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ),  $0,19 \text{ mM} \cdot \text{d}^{-1}$  ( $135 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) y  $0,15 \text{ mM} \cdot \text{d}^{-1}$  ( $112 \text{ mg L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ), respectivamente. El consumo de glucosa en todos los casos fue en torno a  $3,5 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$ . Un estudio más cercano fue el de Cervantes *et al.* (2001) que estudiaron el efecto de la adición de una quinona (AQDS) a un reactor anaerobio UASB que trataba AO7. Las concentraciones de AO7 usadas fueron entre  $1,71$  y  $3,43 \text{ mM} \cdot \text{d}^{-1}$ , oscilando la conversión del AO7 entre el 99% y algo menos del 90%, para la máxima velocidad de carga con una relación AQDS:AO7 de 0,01. Sin embargo, en ausencia de la quinona, la conversión del AO7 baja al 70% cuando la velocidad de carga es de  $3,43 \text{ mM} \cdot \text{d}^{-1}$ . Laszlo (2000) alcanzó velocidades de reducción de AO7 entre  $20$  y  $90 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  ( $0,48$  y  $2,16 \text{ mM} \cdot \text{d}^{-1}$ ), si bien, empleó una relación AQDS:AO7 de 6,25.



Otro hecho a destacar fue que durante el período 4 se operó con una velocidad de carga orgánica media de  $8 \text{ gDQO L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  y un porcentaje de eliminación de DQO de casi el 80%. El aumento de la concentración de AO7 alimentada desde 0,27 (período 2) hasta 0,58 mM (período 4) supuso una pérdida en la eficacia de eliminación de DQO de un 7%, si bien, considerando únicamente la DQO biodegradable, este descenso sería del 2%, prácticamente despreciable, sobre todo teniendo en cuenta que el aumento en la velocidad de carga orgánica biodegradable entre estos dos períodos fue del 32%. Estos resultados comparan favorablemente con los de Cervantes *et al.* (2001), ya que, con una velocidad de carga orgánica de  $5,3 \text{ g DQO}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  obtienen una eliminación de DQO entre el 80 y 87%, dependiendo de la concentración de ADQS empleada.

En la Fig. 6.14 se aprecia que el aumento en la carga de AO7 eliminada también se ve correspondido con un aumento en la DQO total eliminada, debido a que el porcentaje de eliminación se mantiene a pesar de la reducción en el TRH en los sucesivos períodos y del aumento en la concentración de AO7 alimentado.



**Figura 6.14.** Valores medios de DQO eliminada (  $\square$  ) en  $\text{g DQO}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  y de AO7 eliminado (  $\blacksquare$  ) en  $\text{mM}\cdot\text{d}^{-1}$ , para cada período.

El reactor R2 operó en condiciones más restrictivas de alimentación de carbono orgánico adicional y esto se vio reflejado en las eficacias de eliminación de AO7. Si no tenemos en cuenta el aporte de DQO del AO7, en los dos primeros períodos la eliminación de DQO biodegradable sería próxima al 100%, pero en el tercer período sería del 78% que es un valor bajo, teniendo en cuenta que la velocidad de carga orgánica en este período fue en torno a  $1 \text{ g DQO}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ . Esta actividad puede ser debida a que la baja alimentación de glucosa provocó la inactividad de una parte importante del lodo, ya que, posiblemente el aporte de carbono no era suficiente para mantener la actividad de toda la biomasa.

Así, los porcentajes de eliminación de AO7, que oscilaron entre el 86 y 78%, fueron sensiblemente inferiores a los alcanzados en el reactor R1, que operó con una carga de AO7 mayor. Cabe sin embargo destacar el alcance de una conversión de AO7, próxima al 80% y una decoloración del 70%, operando con  $0,60 \text{ mM}\cdot\text{d}^{-1}$  ( $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) de AO7, con un aporte mínimo de carbono adicional, lo cual se considera bastante significativo.

Cuando los dos reactores operaron en las mismas condiciones, el comportamiento fue distinto, ya que el reactor R1, pese a ser alimentado con una baja concentración de glucosa, solamente perdió un 14% de eficiencia de eliminación de AO7. mientras que el reactor R2 perdió un 30% de eficacia y prácticamente la mitad del AO7 alimentado fue recogido en el efluente (Fig. 6.11). Esta diferencia de comportamientos podría durar mientras el lodo del reactor R1 mantuviese su actividad con un aporte tan pequeño de carbono biodegradable.

## 6.5. Referencias

Cervantes F.J., van der Zee F.P., Lettinga G. and Field J.A. (2001). Enhanced decolourisation of acid orange 7 in a continuous UASB reactor with quinones as redox mediators. *Water Science and Technology*, **44**(4), 123-128.

- Clarke A. and Anliker R. (1980). Organic dyes and pigmentes. In Hutzinger O (eds). The handbook of environmental chemistry, vol. 3. Part A. Anthropogenic compounds. Springer, Berlin.
- Contzen M., Moore E.R.B., Blümel S., Stolz A. and Kämpfer P. (2000). *Hydrogenopaga intermedia* sp. nov., 4-aminobenzenesulfonate degrading organism. *Systematic and Applied Microbiology*, **23**, 487-493.
- Coughlin M.F., Kinkle B.K. and Bishop P.L. (1999). Degradation of azo dyes containing aminonaphtolb by *Sphingomonas* sp.straim ICX. *Industrial Microbiology and Biotechnology*, **23**, 341-341.
- Coughlin M.F., Kinkle B.K., Tepper A. and Bishop P.L. (1997). Characterization of aerobic azo dye-degrading bacteria and their activity in biofilms. *Water Science and Technology*, **36**, 215-220
- Cruz A. and Buitrón G. (2000). Biotransformation of Disperse Blue 79 by an anaerobic sequencing batch biofilter. *Water Science and Technology*, **42**(5-6), 317-320.
- Dykes G.A., Timm R.G. and von Holy A. (1994). Azoreductase activity in bacteria associated with the greening of industrial chocolate puddings. *Applied and Environmental Microbiology*, **60**, 3027-3029.
- Fernández J.M., Omil F., Méndez R and Lema J.M. (2001). Anaerobic treatment of eucalyptus fibreboard manufacturing wastewaters in an industrial pilot scale hybrid UASB reactor. *Water Research*, **35**(17), 4150-4158.
- Field J.A., Cervantes F.J., van der Zee F.P. and Lettinga G. (2000). Role of quinones in in the biodegradation of priority pollutants: a review. *Water Science and technology*, **42**(5-6), 215-222.
- Jiang M. and Bishop P.L. (1994). Aerobic biodegradation of azo dyes in biofilms. *Water Science and Technology*, **29**, 525-530.
- Kudlich M., Bishop P.L., Knackmuss H.J. and Stolz A. (1996). Simultaneous anaerobic and aerobic degradation of the sulfonated azo dye Mordant Yellow

- 3 by immobilized cells from a naphthalenesulfonate-degrading mixed culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **46**, 597-603.
- Kulla H.G. (1981). Anaerobic bacterial degradation of azo dyes. In: Leisinger, T., Cook, A.M., Nüesch, J. and Hütter, R. (eds). Microbial degradation of xenobiotic and recalcitrant compounds. Academic, London. pp. 387-399.
- Kulla H.G., Krieg R., Zimmermann T. and Leisinger T. (1984). Experimental evolution of azo-dye degrading bacteria. In Klug MJ, Reddy CA (eds). Current perspectives in microbiology ecology. American Society of Microbiology, Washington DC. pp. 663-667.
- Laszlo J.A. (2000). Regeneration of azo-dye saturated cellulosic anion exchange resin by *Burkholderia cepacia*. *Environmental Science and Technology*, **34**, 167-172.
- Lourenço N.D., Novals J.M. and Pinheiro H.M. (2000). Reactive Textile dye colour removal in a sequencing batch reactor. *Water Science and Technology*, **42**(5-6), 321-328.
- Mielgo I, Moreira M.T., Feijoo G. and Lema J.M. (2001). A packed-bed fungal bioreactor for the continuous decolourisation of azo dyes (Orange II). *Journal of Biotechnology*, **89**, 99-106.
- Overney G. (1979). Ueber dem aerobem Abbau von Dicarboxyazobenzol durch ein Flavobacterium sp. PhD Thesis Dis ETH 6421, ETH Zurich, Switzerland.
- Pagga U. and Brown D. (1986). The degradability of dyestuffs: Part II. Behaviour of dyestuffs in aerobic biodegradation tests. *Chemosphere*, **13**, 479-491.
- Pagga U. and Taeger K. (1994). Development of a method for adsorption of dyestuffs on activated sludge. *Water Research*, **28**, 1051-1057.
- Quezada M., Linares I. and Buitrón G. (2000). Use of a sequencing batch biofilter for degradation of azo dyes (acids and basis). *Water Science and Technology*, **42**(5-6), 329-336.

- Rajaguru R., Kalaiselvi K., Palamivel M. and Subburam V. (2000). Biodegradation of azo dyes in a sequential anaerobic-aerobic system. *Appl. Microbiology and Biotechnology*, **54**, 268-273.
- Shaul G.M., Holdsworth T.J., Dempsey C.R. and Dostal K.A. (1991). Fate of water soluble azo dyes in the activated sludge process. *Chemosphere*, **2**, 107-119.
- Stolz A. (2001). Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **56**, 69-80.
- Stolz A. (2001). Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **56**, 69-80.
- Sugiura W., Miyashia T., Yokoyama T. and Arai M. (1999). Isolation of azo dye degrading microorganisms and their application to white discharge printing of fabric. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **88**, 577-581
- Tan N.C.G., Borger A., Slenders P., Svitelskaya A., Lettinga G. and Field J.A. (2000). Degradation of azo dye Mordant Yellow 10 in a sequential anaerobic and bioaugmented aerobic bioreactor. *Water Science and Technology*, **42**(5-6), 337-344.
- Tan N.C.G., Lettinga G., Field J.A. (1999a). Reduction of the azo dye Mordant Orange I by the methanogenic granular sludge exposed to oxygen. *Bioresource Technology*, **67**, 35-42.
- Tan N.C.G., Opsteeg, J.L., Lettinga, G. and Field, J.A. (1999b). Integrated anaerobic/aerobic EGSB reactor for azo dye degradation. Alleman B.C. and Lesson A. (Eds.). vol. 5 (7). Battelle Press. Columbus Richland, pp. 253-258.
- Veiga M.C., Soto M., Méndez R. and Lema J.M. (1990). A new device for measurement and control of gas production by bench scale anaerobic digesters. *Water Research*, **24** (12), 1661-1554.
- Zheng F., Knapp J.S. and Tapley K.N. (1999). Development of bioreactor systems for decolorization of Orange using white rot fungus. *Enzyme and Microbial Technology*, **24**, 58-63.

## Conclusiones

En el trabajo incluido en esta memoria se estudian los distintos factores que determinan la viabilidad y, en su caso, las condiciones adecuadas, para el tratamiento biológico anaerobio de formaldehído y de los compuestos Poly R-478 y *Acid Orange 7*, representativos de dos grandes grupos de colorantes de amplio uso en la industria, estudiándose de modo específico los siguientes aspectos:

### **Biodegradación de formaldehído en condiciones anaerobias**

Se estudia la biodegradabilidad y toxicidad anaerobia del formaldehído, así como las posibles rutas de degradación que sigue este compuesto. Para ello se realizan ensayos en discontinuo.

Se comprueba que el formaldehído se elimina totalmente del medio hasta una concentración en torno a 3.33 mM (100 mg·L<sup>-1</sup>). Esta degradación transcurre a través de la formación de metanol que, únicamente cuando la concentración inicial de formaldehído es baja (1,67 mM), se mineraliza completamente a metano y CO<sub>2</sub>.

En presencia de otra fuente de carbono adicional (AGV) el formaldehído se puede degradar a mayor velocidad, alcanzándose una eliminación total, incluso para una concentración inicial elevada (6,66 mM). Sin embargo, sólo para concentraciones inferiores a 3,33 mM el proceso de degradación se completa hasta la fase final de metanización, mientras que a concentraciones superiores tiene lugar la acumulación de metanol. En experimentos con adiciones sucesivas de formaldehído a alta concentración (superior a 3,33 mM) se observa una acumulación progresiva de metanol. Una explicación razonable es que, en esas condiciones, se ve inhibida la metanización directa del formaldehído, transcurriendo el proceso únicamente a través de la vía de formación de metanol. Este resultado podría, por otra parte, ser debido a la inhibición en la metanización de metanol. En ambas hipótesis se considera el efecto tóxico sufrido por la biomasa en su prolongada exposición al formaldehído.

Adicionalmente, el formaldehído ejerce un efecto tóxico sobre los procesos de degradación de los AGV, más acusado en el caso del medio con alta proporción de acetato ( $IC_{50}$  3,3 mM) y más leve en el del medio enriquecido en butirato y propionato (4,1 mM), y resulta especialmente importante en exposiciones sucesivas, descendiendo el valor de la  $IC_{50}$ , hasta 1,5 mM, cuando se emplea este último medio.

A su vez, el metanol generado en la degradación del formaldehído puede transformarse en metano directamente, o bien a través de su conversión en acetato. Una tercera ruta, a través de la formación de hidrógeno, resulta poco favorable por la inhibición de las bacterias metanogénicas consumidoras de hidrógeno.

### **Tratamiento bacteriano de Poly R-478**

Se estudia la degradación bacteriana del Poly R-478 como base de un posible tratamiento directo, o bien como un post tratamiento, realizado en combinación con un tratamiento con hongos ligninolíticos. En este estudio, además de operar en condiciones anaerobias se realizaron también ensayos en condiciones aerobias.

En condiciones anaerobias, tanto operando en discontinuo como en continuo, no se consigue la decoloración de Poly R. Tampoco se consigue una mejora de calidad del efluente, parcialmente decolorado, resultante de un tratamiento previo con hongos. Sin embargo, en este último caso el tratamiento anaerobio de estas aguas produce cambios apreciables en el espectro de absorción UV-VIS que, si bien no afectaron apreciablemente al color, evidencian la posibilidad de una alteración en la estructura de la molécula.

En condiciones aerobias se observa una cierta decoloración en el medio, si bien no se pudo discernir si se trata de un proceso exclusivamente físico o si, por el contrario, transcurre en paralelo con una degradación biológica.

Tanto en condiciones anaerobias como aerobias, no se aprecia efecto tóxico alguno del Poly R ni de los compuestos generados en la rotura parcial de la molécula tras someterse a un tratamiento con hongos.

### **Biodegradación anaerobia del tinte azo *Acid Orange 7* en discontinuo**

Inicialmente se lleva a cabo el estudio de la degradación del tinte azo AO7 mediante ensayos en discontinuo. Los resultados indican que este compuesto se degrada por mecanismos biológicos incluso cuando es la única fuente de carbono presente en el medio.

El uso de una fuente adicional de carbono permite aumentar considerablemente la velocidad de eliminación del AO7. De todos los cosustratos empleados, la glucosa es el más favorable, posiblemente debido a que estimula la formación de los equivalentes reductores, responsables de la reducción del enlace azo. Empleando una concentración inicial de glucosa en torno a  $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  se alcanza la mayor velocidad de degradación de AO7.

En ausencia de cosustrato el AO7 se degrada siguiendo una cinética de primer orden, mientras que en presencia de cosustrato, en la mayoría de los casos, la cinética corresponde a la típica de un proceso autocatalítico.

La degradación del AO7 produce, estequiométricamente, ácido sulfanílico que, a pesar de los intentos efectuados, ha resultado ser recalcitrante al tratamiento anaerobio. El otro compuesto generado en el tratamiento anaerobio, el 1-amino-2-naftol, no se detecta en el medio, aunque sí la 1,2-naftoquinona que se produce tras la oxidación del 1-amino-2-naftol. Considerando que las quinonas favorecen el transporte de electrones, es probable que la 1,2-naftoquinona sea el compuesto responsable del carácter autocatalítico de la degradación del AO7.

Mediante el uso del método de las velocidades iniciales, se confirma que, en presencia de glucosa, la degradación de AO7 responde a un modelo cinético de Haldane, que tiene en cuenta la inhibición por sustrato.

Ni el AO7 ni los compuestos generados en su degradación causan efecto tóxico sobre la metanogénesis. Además, la realización de un ensayo de Microtox indica que el tratamiento anaerobio de aguas con AO7 disminuye la toxicidad.



### **Biodegradación anaerobia del tinte azo *Acid Orange 7* en continuo y semicontinuo**

Se estudió, en primer lugar, la operación en estrategia fed-batch, mediante adiciones sucesivas de AO7 sobre el medio en el que había sido previamente degradado. En los ensayos sin cosustrato, la adición sucesiva de AO7 produjo un considerable aumento de velocidad, reduciéndose el período necesario para eliminar 0,06-0,07 mmol·L<sup>-1</sup> de AO7 desde 15 hasta 9 días. La velocidad inicial en la tercera adición fue superior al doble de la alcanzada en la primera adición.

Cuando se emplea glucosa como cosustrato, en las distintas adiciones, la velocidad de degradación de AO7 también fue superior en la segunda y tercera adición. Así, la velocidad media del proceso, que había sido 0,3 mM·d<sup>-1</sup> en la primera adición, fue de 0,5 mM·d<sup>-1</sup> en las siguientes. Este efecto observado, tanto en ausencia como en presencia de cosustrato, es posiblemente debido a la presencia de 1,2-naftoquinona en el medio, que permite acelerar el transporte de equivalentes reductores hasta el enlace azo. Cuando sólo se incorporó glucosa en la primera adición, la velocidad de degradación de AO7 disminuyó notablemente (sobre todo en la tercera adición) debido a la escasa generación de equivalentes reductores.

En el posterior estudio del tratamiento en continuo de AO7 en reactores UASB se llegó a operar a una velocidad de carga de AO7 de hasta 1,7 mM·d<sup>-1</sup> (590 mg·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), con una eficacia de eliminación superior al 90%. Las condiciones de operación fueron 2,5 g·L<sup>-1</sup> y 0,58 mM de glucosa y AO7 en el influente, respectivamente, aplicando un TRH de 0,3 días. La eliminación de DQO en estas condiciones fue próxima al 80%.

Operando con 0,5 g·L<sup>-1</sup> de glucosa en el influente, la eficacia de eliminación de AO7 a una velocidad de carga de tinte de 0,6 mM·d<sup>-1</sup> (213 mg·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) fue del 70%. La concentración de AO7 en el influente fue 0,30 mM y el TRH 0,5 días.

Cuando los dos reactores operan en las mismas condiciones (TRH y concentración de AO7 y glucosa), la eficacia de eliminación de AO7 fue muy superior en el reactor que había operado con una alta concentración de glucosa en el influente (79% frente a 54%).

En los ensayos en continuo no se observa efecto tóxico alguno sobre la biomasa. La realización de un ensayo de Microtox mostró que el tratamiento anaerobio de AO7 permite disminuir notablemente la toxicidad.



## Nomenclatura

$\mu$	Velocidad de crecimiento específico de los microorganismos
$\mu_m$	Velocidad de crecimiento específico máximo
$[AO7]_0$	Concentración inicial de <i>Acid Orange 7</i>
12NQ	1,2-Naftoquinona
1A2N	1-Amino-2-naftol
$A_{520}$	Absorbancia a 520 nanómetros
$A_{520}/A_{350}$	Relación entre las absorbancias medidas a 520 y 350 nm
$Ac_m$	Velocidad de consumo específico máximo de sustrato o actividad específica máxima
AGSB	Expanded Granular Sludge Bed
AGV	Ácidos Grasos Volátiles
AO7	<i>Acid Orange 7</i>
AS	Ácido Sulfanílico
C	Concentración
$C_0$	Concentración inicial
$C_0'$	Concentración inicial en la segunda adición
$C_0''$	Concentración inicial en la tercera adición
COT	Carbono Orgánico Total
DQO	Demanda Química de Oxígeno

EC <sub>50</sub>	Concentración que reduce en un 50% la emisión de luz de la bacteria marina <i>Photobacterium phosphoreum</i> (método Microtox). Habitualmente el período de tiempo considerado es de 15 minutos.
FA	Formaldehído
FAD	Flavin Adenina Dinucleótido
FADH	Flavin Adenina Dinucleótido reducida
HAc	Ácido Acético
HBut	Ácido Butírico
HPr	Ácido Propiónico
IC <sub>50</sub>	Concentración que reduce un 50% la actividad metanogénica de las bacterias.
K <sub>i</sub>	Constante de inhibición
K <sub>s</sub>	Constante de saturación
LC <sub>50</sub>	Concentración que mata al 50% de los organismos vivos. Se utiliza principalmente en ensayos con peces. Habitualmente el período de tiempo considerado es de 96 horas.
NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleótido
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido reducida
NADP	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
S	Concentración de sustrato
SBR	Secuencing Batch Reactor
SST	Sólidos en Suspensión Totales
SSV	Sólidos en Suspensión Volátiles
TRH	Tiempo de Residencia Hidráulico
UASB	Upflow Anaerobic Sludge Blanket

UV – VIS	Ultravioleta – Visible
$v_0$	Velocidad inicial
VCO	Velocidad de Carga Orgánica
$v_m$	Velocidad media
$v_{max}$	Velocidad máxima
$v_s$	Velocidad de desaparición de sustrato
X	Concentración de microorganismos
$Y_{xs}$	Rendimiento celular