

# **BIODEGRADACIÓN ANÓXICA DE COMPUESTOS ORGÁNICOS EN MEDIO LÍQUIDO**

María de los Ángeles MARTINEZ, Rosa Ícela BELTRAN, y Gabriela VÁZQUEZ

Centro de Investigaciones Químicas Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo  
Carr. Pachuca-Tulancingo km. 4.5, C.P. 42076 Pachuca, Hgo., México Tel: (771)  
717 2000 ext. 6501; Fax ext. 6502; e-mail: angeles\_1213@yahoo.com

Palabras clave: pruebas de biodegradabilidad, anoxia, inóculo

## **RESUMEN**

La biodegradabilidad es un parámetro fundamental en el comportamiento ambiental de las sustancias químicas. Para su evaluación se han diseñado una serie de pruebas, las cuales buscan cuantificar el grado de persistencia en ambientes naturales e industriales. En este trabajo se presenta una serie de pruebas en condiciones anóxicas que permite evaluar la biodegradación de compuestos orgánicos en medio líquido con ión nitrato como aceptor de electrones. Para ello, el inóculo se basó en un sedimento lacustre que permite simular las condiciones prevalecientes en un medio natural sedimentario. Las pruebas se basan en el método de Sturm, en el que la mineralización de la sustancia se monitorea por medio de la medición del CO<sub>2</sub> producido. Las pruebas se realizaron con glucosa, fenol y anilina (30 mg/L C) como única fuente de carbono, un medio de cultivo enriquecido con KNO<sub>3</sub> (252 mg/L) y como inóculo se utilizó un extracto de sedimento (Tecocomulco, Hgo.) cuyo comportamiento hacia moléculas xenobióticas está siendo estudiado en nuestro laboratorio.

## **INTRODUCCIÓN**

La evaluación del comportamiento ambiental de sustancias químicas se basa en un parámetro primordial, la biodegradabilidad. Mediante la biodegradación, los microorganismos transforman compuestos orgánicos, algunos de ellos son estructuras muy complejas que pueden convertirse en estructuras más simples o menos tóxicas. Esta propiedad del compuesto depende de las condiciones biológicas en las que se degrade, así como de su estructura química. Ésta última influye decisivamente en la descomposición natural de los compuestos orgánicos; así, la naturaleza química de muchos detergentes, plásticos, materiales de embalaje y residuos médicos los hace resistentes a la degradación microbiana. Para estimar este parámetro, se han diseñado varios protocolos experimentales, también llamados pruebas de biodegradabilidad, que simulan de una manera u otra algún sistema industrial (plantas de tratamiento de aguas residuales) o natural (aguas superficiales, suelos) relevante en el destino de un compuesto químico.

Los organismos reguladores exigen a los fabricantes cada vez más pruebas experimentales de que sus productos se transforman en estructuras inocuas cuando se liberan al medio ambiente. Los permisos para la fabricación y venta a gran escala de nuevos productos químicos dependen del resultado de estas pruebas. Las pruebas deben ser razonablemente respectivas, precisas y comparables, pero lo bastante sencillas y rutinarias para no imponer retrasos inaceptables a la introducción de nuevos productos (Atlas y Bartha, 2002).

Las pruebas conocidas como de *biodegradabilidad inmediata* restringen al máximo las posibilidades de que la biodegradación suceda, razón por la cual se considera que un resultado positivo indica la biodegradabilidad de la sustancia en la mayoría de los medios naturales y de los sistemas de tratamiento (Nyholm, 1991). El principio general de estas pruebas es la incubación aerobia estática, o por lote, de una cantidad reducida de biomasa a una temperatura entre 20 y 25 °C. La sustancia se añade a una concentración definida, como única fuente de carbono y energía. El inóculo consiste en una población microbiana natural que no haya sido expuesta al compuesto de prueba. Como controles positivos, se incluyen compuestos de biodegradabilidad conocida (glucosa, benzoato, acetato o anilina). En virtud de la diversidad de ecosistemas que pueden convertirse en el destino final de las sustancias químicas, se han diseñado pruebas que simulan diferentes compartimientos ambientales (aguas superficiales o marina, suelo) e industriales (plantas de tratamiento de aguas residuales), la mayor parte de las cuales se desarrolla en aerobiosis.

Sin embargo, se han encontrado que en algunos compartimientos ambientales anaerobios existen concentraciones de contaminantes mayores que en medios aerobios (Vázquez-Rodríguez y Beltrán-Hernández, 2004). Además, en algunas situaciones cabe preguntarse sobre el destino del compuesto investigado en condiciones anóxicas, como es el caso de las plantas de depuración anaerobia de aguas residuales, o de los sedimentos acuáticos o los acuíferos anóxicos. Por lo general, en condiciones óxicas la gama de compuestos químicos degradables es mayor y su degradación es más rápida que en condiciones anóxicas. Sin embargo, la dechloración reductora y la eliminación por nitro sustitución reductora de algunos compuestos aromáticos se acelera en condiciones anóxicas.

Dado que la persistencia de una sustancia en condiciones anóxicas puede conllevar su acumulación en compartimientos tales como los sedimentos acuáticos, en este proyecto se presenta la evaluación de tres moléculas orgánicas en medios anóxicos y el empleo de un extracto de sedimento como inóculo que permite simular las condiciones prevaletientes en estos medios naturales cuando el aceptor de electrones disponible es el ión nitrato.

## **METODOLOGÍA**

### **3.1 Pruebas de biodegradabilidad**

Las pruebas se realizan en base al método de Sturm, el cual se basa en la captura y posterior cuantificación del CO<sub>2</sub> producido (OCDE, 1992). El dispositivo experimental consiste en un reactor tipo Spinner con un volumen útil de 1L, en el

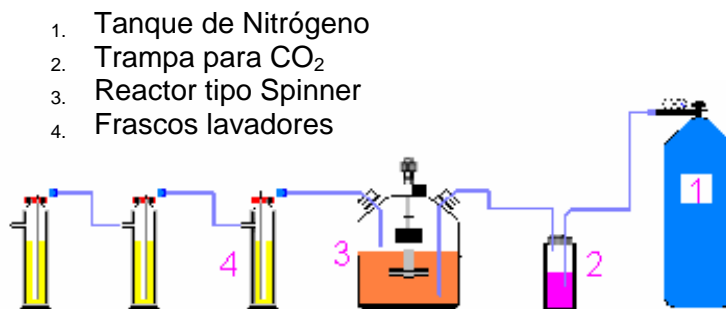
cual se deposita la molécula en estudio (30 mg/L), el medio de cultivo (**Tabla 1**) y como inóculo bacteriano se utilizó un extracto de sedimento lacustre preparado con NaCl 0.7%; el sedimento se introdujo a razón de 1g de sedimento seco por cada 50 mL de solución extractora, previa determinación de su contenido de humedad. La relación de inoculación fue 1% v/v.

**Tabla I.** Composición por litro del medio de cultivo

Buffer de fosfatos	0.27 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	0.84 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
Sales minerales	0.53 g	NH <sub>4</sub> Cl
	100 mg	MgCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O
	75 mg	CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O
Metales traza	1.0 mg	FeSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O
	0.5 mg	CoCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O
	0.5 mg	MnCl <sub>2</sub> *4H <sub>2</sub> O
	0.05 mg	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
	0.05 mg	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>
	0.05 mg	NiCl <sub>2</sub>
	0.05 mg	ZnCl <sub>2</sub>
	0.04 mg	CuCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O
	0.01 mg	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O
	252 mg	KNO <sub>3</sub>

El reactor se alimenta continuamente con nitrógeno para garantizar así un medio anóxico (Fig.1), a la salida de gases de este reactor se conecta una serie de frascos lavadores que contienen 100 ml de Ba(OH)<sub>2</sub> 0.0125 M previamente estandarizado. Durante el ensayo, luego de observar la aparición de un precipitado en los frascos lavadores, se desconecta el primero de la serie y se recorren los demás frascos colocando uno con nueva solución de Ba(OH)<sub>2</sub>. La solución de cada frasco que se retira se filtra y se titula con HCl 0.05 M en presencia de fenolftaleína.

El porcentaje de biodegradación se calcula relacionando la cantidad de CO<sub>2</sub> capturada con el carbono inicial introducido al ensayo. En paralelo a cada prueba se corrió un testigo, al cual no se añadió glucosa. Los valores de CO<sub>2</sub> se corrigieron con los del testigo, para considerar la respiración endógena del inóculo.



**Fig.1** Dispositivo de captura de CO<sub>2</sub>

## 3.2 Caracterización de sedimentos

La caracterización de sedimentos se lleva a cabo determinando la textura, pH, concentraciones de carbono orgánico e inorgánico, nitratos, nitritos y fósforo. Estos análisis se realizan en base a la norma NOM-021-RECNAT-2000 (INE, 2001) para clasificación de suelos. Los extractos de sedimentos se analizaron también en términos de viabilidad celular (determinación de unidades que forman colonias, UFC; Fung et al., 1976).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Caracterización de sedimentos

Los resultados de la caracterización de 6 sedimentos, muestreados en distintos sitios del lago y en diferentes fechas, se muestran en la **(Tabla II)**.

**Tabla II.** Caracterización de los sedimentos lacustres utilizados como inóculos

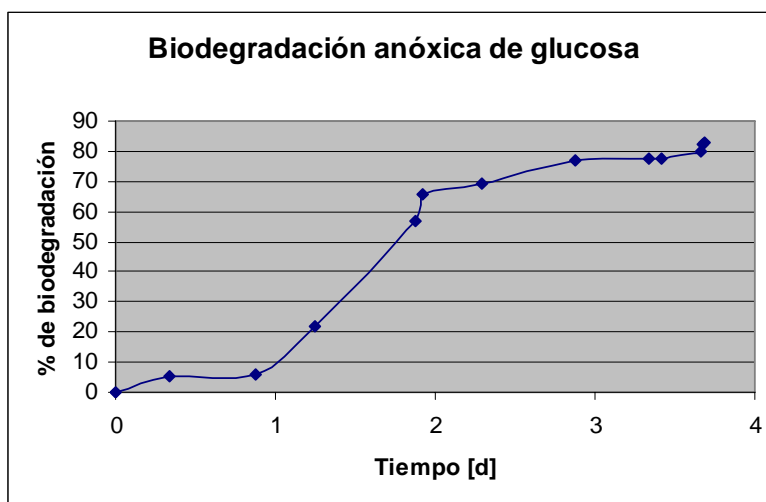
PARAMETRO	MUESTREOS					
	Sep-03	Jun-04	Feb-05	Jun-05	Feb-06	Abr-06
<b>Textura</b>						
% Arcilla	54.2	44	ND	58.9	58.1	49.8
% Limo	20.7	8	ND	3.3	17.3	22.6
% Arena	25.1	48	ND	37.8	24.6	27.6
<b>C.Organico (mg/g)</b>	20.9	117	34.83	38.9	62.4	24.96
<b>C.Inorganico (mg/g)</b>	0.34	0.00014	0.264	0.3	0.27	0.28
<b>Nitritos (mg/Kg)</b>	0.12	0.24	20.65	1.6	31.65	2.07
<b>Nitratos (mg/Kg)</b>	18.13	25	339.7	13.1	148.14	130.4
<b>Fosforo (mg/g)</b>	7.4	7.3	9.76	22.5	1.98	0.87
<b>pH</b>	7.4	6.2	7.1	8.4	7.2	7.3
<b>Densidad</b>	1.12	1.15	1.19	1.4	1.2	1.13

Como puede observarse, las características fisicoquímicas de los sedimentos difieren en cada muestra. Un parámetro particularmente alto es el carbono orgánico, el cual no puede alterar considerablemente los resultados de las pruebas de biodegradabilidad al generar CO<sub>2</sub> adicional al de la molécula de estudio debido a que se prepara un extracto de sedimento para emplearlo como inóculo, en el cual solo se extrae el consorcio bacteriano. Al igual que el carbono orgánico, los nitratos aportados por el sedimento no son significativos con respecto a la concentración del medio de cultivo utilizado. La variabilidad de los parámetros fisicoquímicos contrasta con la relativa homogeneidad que se ha detectado en la concentración de UFC de los extractos de sedimentos obtenidos a partir de diferentes muestras de sedimentos.

### 4.2 Pruebas de biodegradabilidad

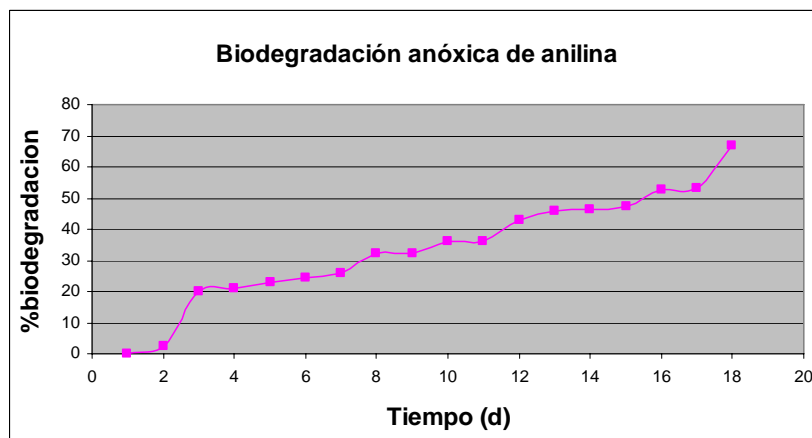
Las pruebas de biodegradabilidad anóxica que se efectuaron empleando como sustrato glucosa (molécula de referencia positiva) o bien moléculas xenobióticas como la anilina y el fenol que se muestran en la **(figura 2,3 y 4)**.

En la **Fig. 2** se puede observar que la glucosa se degrada fácilmente en medio anóxico, en el cual alcanzó un 80% de biodegradación en menos de tres días. El tiempo de latencia ( $t_l$ ), definido como el tiempo necesario para alcanzar una biodegradación de 10%, fue de 1.01 d, por lo que se le puede considerar una buena molécula de referencia positiva, de igual manera que en las pruebas aerobias.



**Figura 2.** Prueba de biodegradabilidad anóxica con glucosa

En la prueba realizada con anilina (**Fig. 3**), a diferencia de la glucosa este ensayo de biodegradación es más lento alcanzando un 66.7% de biodegradación, y un  $t_l$  de 2.4 d obteniendo un resultado satisfactorio y concluyendo que la anilina también puede ser utilizada como molécula de referencia.



**Figura 3.** Prueba de biodegradación anóxica con anilina

Este hecho dio pauta a utilizar fenol (**Fig.4**), siendo un sustrato de mayor dificultad para ser degradado en estas mismas condiciones. El resultado de esta prueba fue

que en medio anóxico al igual que la anilina también es degradado, aunque con mayor dificultad, puesto que el nivel de biodegradación fue de 65% y con un  $t_i$  de 17 d, siendo un margen mayor que el de la anilina que también es una molécula xenobiótica.

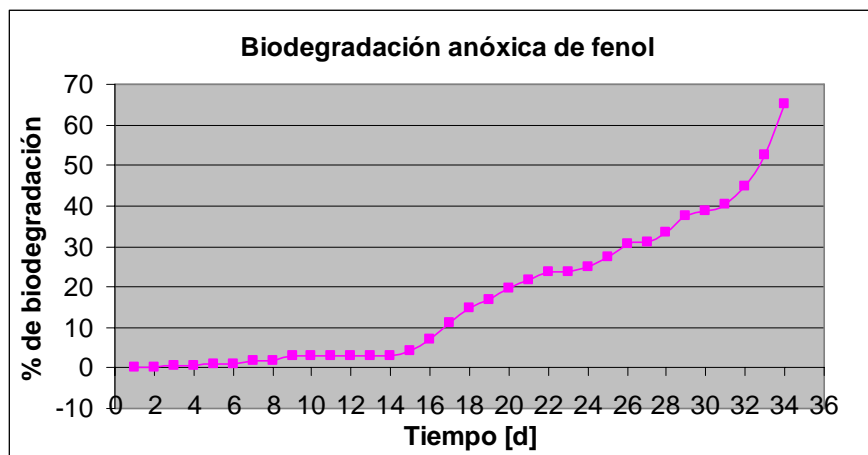


Fig. 4. Prueba de biodegradación anóxica con fenol

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el financiamiento para realizar esta investigación a PROMEP.

## REFERENCIAS

- Atlas R.M y Bartha R. (2002) Ensayos de biodegradabilidad y seguimiento de la biorremediación de contaminantes xenobióticos. En: Ecología microbiana y Microbiología ambiental, Ed. Addison Wesley, Madrid, pp. 553-559.
- Fung D.Y.C., Donahue R., Jensen J.P., Ullmann W.W., Hausler W.J. y Lagrange W.S. (1976) A collaborative study of the microtiter count method and Standard plate count method for viable cell count of raw milk. *J. Milk Food Technol.*, 39: 24-26.
- INE (2001) Instituto Nacional de Ecología. NOM-021-RECNAT-2000. Norma Oficial Mexicana que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelo, estudios, muestreo y análisis.
- Nyholm N (1991) The European system of standardized legal tests for assessing the biodegradability of chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.* 10:1237-1246.
- OCDE. (1992). Ligne directrice pour les essais de biodegradabilité facile des produits chimiques. Organisation pour la Coopération et le Développement Economique, Paris.
- Vázquez Rodríguez G.A. y Beltrán Hernández R.I. (2004), Pruebas normalizadas para la evaluación de la biodegradabilidad de sustancias químicas. Una revisión. *Interciencia* 29(10): 568-572.