

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**BIOTRANSFORMACIÓN REDUCTIVA DE 4-NITROFENOL UTILIZANDO
ANTRAQUINONA-2-SULFONATO Y *Geobacter sulfurreducens*
INMOVILIZADAS EN ALGINATO DE CALCIO Y DE BARIO**

POR

SUJEI YASSARI RODRÍGUEZ ACEVEDO

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAestrÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN
MICROBIOLOGÍA APLICADA**

OCTUBRE 2016

**BIOTRANSFORMACIÓN REDUCTIVA DE 4-NITROFENOL UTILIZANDO
ANTRAQUINONA-2-SULFONATO Y *Geobacter sulfurreducens*
INMOVILIZADAS EN ALGINATO DE CALCIO Y DE BARIO.**

SUJEI YASSARI RODRIGUEZ ACEVEDO

Aprobación de la Tesis:

Dr. Luis Humberto Alvarez Valencia
Director de tesis

Dra. María Elena Cantú Cárdenas
Co-directora

Dra. María Teresa Garza González
Comité Tutorial

Dr. Edgar Allan Blanco Gámez
Comité Tutorial

Dr. Ulrico Javier López Chuken
Comité Tutorial

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi agradecimiento:

Al Doctor Luis Humberto Alvarez Valencia, mi director de tesis que siempre hizo todo lo posible para que yo pudiera realizar mis actividades, dándome sus consejos y apoyo en todo momento.

A la Doctora María Elena Cantú Cárdenas quien me co-direcciono y me ayudo a desarrollarme en este estudio compartiéndome de su conocimiento y consejos.

Al Doctor Refugio Bernardo García Reyes por sus opiniones y su enseñanza.

A todos mis compañeros con quienes he pasado tantos momentos y compartimos experiencias de nuestras investigaciones.

A mi comité tutorial, quienes siempre me ayudaron a complementar este trabajo gracias a sus dudas y su punto de vista.

Al Doctor Francisco J. Cervantes y la Doctora Aurora Pat Espadas, que me capacitaron en el Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica.

Al posgrado de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en donde pude realizar esta tesis, siempre hubo un espacio para que pudiera trabajar.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por proporcionar la beca con la que he logrado un avance en mis estudios de forma profesional.

A mi familia, de quienes todo el tiempo recibí ese apoyo incondicional, nunca perdieron la fe en mí y siempre sentirán con orgullo mi esfuerzo.

ABREVIATURAS

4-AF	4-aminofenol
4-NF	4-nitrofenol
AQS	Antraquinona-2-sulfonato
AH ₂ QS	Hidroxi antraquinona-2-sulfonato
AQDS	Antraquinona-2,6-disulfonato
IUCID	International Uniform Chemical Information Database
MR	Mediador redox
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido oxidada
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducida
NTC	Nano tubos de carbono
UASB	Up-flow anaerobic sludge blanket (Reactor anaerobio de flujo ascendente)

Tabla de Contenido

ABREVIATURAS.....	3
LISTA DE TABLAS.....	6
LISTA DE FIGURAS.....	7
1. INTRODUCCIÓN	9
2. ANTECEDENTES	11
2.1 Contaminantes recalcitrantes en efluentes industriales.....	11
2.1.1 Características fisicoquímicas del 4-nitrofenol.....	11
2.1.2 Impacto ambiental del 4-nitrofenol.....	12
2.2 Procesos de tratamiento del 4-nitrofenol	12
2.2.1 Métodos fisicoquímicos	12
2.2.2 Métodos biológicos.....	13
2.3 Uso de Mediadores Redox	15
2.4 Geles de alginato.....	19
3. HIPÓTESIS	21
4. JUSTIFICACION	21
5. OBJETIVOS	22
5.1 Objetivo general.....	22
5.2 Objetivos específicos	22
6. MATERIALES Y METODOS	23

6.1	Microorganismo y medio de cultivo.....	23
6.2	Curva de calibración del 4-NF	26
6.3	Protocolo de inmovilización	26
6.4	Biotransformación reductiva de 4-nitrofenol.....	27
6.4.1	Ensayos de biotransformación de 4-NF con AQS soluble.....	29
6.4.2	Ensayos de biotransformación de 4-NF con AQS inmovilizada.....	29
6.4.3	Biotransformación de 4-NF con AQS y <i>G. sulfurreducens</i> inmovilizadas	
	30	
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
7.1	Crecimiento.....	33
7.2	Caracterización de las esferas de alginato de calcio y de bario.	34
7.3	Curva de calibración de 4-NF	40
7.4	Biotransformación de 4-NF	41
7.4.1	Biotransformación de 4-NF en ausencia de AQS.....	41
7.4.2	Biotransformación de 4-NF con AQS soluble	44
7.5	Biotransformación de 4-NF con AQS inmovilizada	50
7.6	Biotransformación de 4-NF con AQS y <i>G. sulfurreducens</i> inmovilizadas.	
	52	
8.	CONCLUSIONES	62
	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	64

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Composición del medio de cultivo para <i>G. sulfurreducens</i>	24
Tabla 2. Preparación de estándares de 4-NF.....	26
Tabla 3. Disposición de residuos.....	32
Tabla 4. Tasa de biotransformación de diferentes concentraciones de 4-NF con 0.2 mM de AQS soluble.....	46
Tabla 5. Tasa de biotransformación de 100 mg/L de 4-NF con diferentes concentraciones de AQS soluble.....	48
Tabla 6. Tasa de biotransformación de 100 mg/L de 4-NF con 0.2 mM de AQS soluble a diferente pH.....	49
Tabla 7. Tasa de biotransformación de 4-NF con AQS y <i>G. sulfurreducens</i> soluble e inmovilizadas en alginato de bario.....	52
Tabla 8. Tasa de biotransformación de 4-NF (50-400 mg/L) con AQS y <i>G. sulfurreducens</i> inmovilizadas en alginato de calcio y de bario.....	56
Tabla 9. Tasa de biotransformación de 4-NF (100 mg/L) con AQS y <i>G. sulfurreducens</i> inmovilizadas en alginato de calcio y de bario.....	59
Tabla 10. Tabla comparativa del porcentaje de biotransformación de 4-NF (100 mg/L) con AQS y <i>G. sulfurreducens</i>	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del 4-NF	11
Figura 2. Diagrama energético de una reacción con catalizador y sin catalizador.	15
Figura 3. Mecanismo de acción de los MR en la biotransformación.	16
Figura 4. Biotransformación de 4-NF con AQS inmovilizada en alginato de calcio y de bario.	31
Figura 5. Cinética de crecimiento de <i>G. sulfurreducens</i>	33
Figura 6. Crecimiento de <i>G. sulfurreducens</i> de 15 días.....	33
Figura 7. Esferas de alginato de calcio (A, B, C y D). Esferas de alginato de bario (E, F, G y H). Esferas solas (A y E). Esferas con AQS (B y F). Esferas con <i>G. sulfurreducens</i> (C y G). Esferas con AQS y <i>G. sulfurreducens</i> (D y H).	34
Figura 8. Izq. Medio solo. Der. Lavado de esferas de alginato de bario.	36
Figura 9. Bandas características de un espectro infrarrojo de alginato de sodio.	37
Figura 10. Espectro infrarrojo de los alginatos de calcio. Solo (A), con <i>G. sulfurreducens</i> (B), con AQS (C), con AQS y <i>G. sulfurreducens</i> (D).	38
Figura 11. Espectro infrarrojo de los alginatos de bario. Solo (A), con <i>G. sulfurreducens</i> (B), con AQS (C), con AQS y <i>G. sulfurreducens</i> (D).	39
Figura 12. Curva de calibración de 4-NF	40
Figura 13. Cinética de biotransformación de diferentes concentraciones de 4-NF	

sin MR, pH 8.4-8.6.....	42
Figura 14. Cinética de biotransformación de diferentes concentraciones de 4-NF con 0.2 mM de AQS, pH 8.4-8.6.....	45
Figura 15. Cinética de biotransformación de 4-NF (100 mg/L) a diferentes concentraciones de AQS (0.025-0.4 mM), pH 8.4-8.6.	47
Figura 16. Cinética de biotransformación de 4-NF (100 mg/L) a diferente pH (5-9) y AQS 0.2 mM.	49
Figura 17. Cinética de biotransformación de 4-NF (100 mg/L) AQS soluble e inmovilizada en alginato de bario, pH 8.4-8.6.	51
Figura 18. Cinética de biotransformación de 4-NF (50-400 mg/L) con AQS 5 g/L y <i>G. sulfurreducens</i> inmovilizadas en alginato de calcio, pH 8.4-8.6.	54
Figura 19. Cinética de biotransformación de 4-NF (50-400 mg/L) con AQS 5 g/L y <i>G. sulfurreducens</i> inmovilizadas en alginato de bario, pH 8.4-8.6.	55
Figura 20. Cinética de biotransformación de 4-NF (100 mg/L) con AQS 5 g/L y <i>G. sulfurreducens</i> inmovilizadas en alginato de calcio a diferente pH.	57
Figura 21. Cinética de biotransformación de 4-NF (100 mg/L) con AQS 5 g/L y <i>G. sulfurreducens</i> inmovilizadas en alginato de bario a diferente pH.	58
Figura 22. Precipitado. A) Alginato de calcio. B) Alginato de bario.	60
Figura 23. Ciclos de biotransformación de 4-NF (100 mg/L) y AQS inmovilizadas en alginato calcio y de bario.....	61
Figura 24. Esferas de alginato de calcio. A) Esfera en buena condición. B) Esfera con ruptura a la mitad.	61

1. INTRODUCCIÓN

El crecimiento industrial y el desarrollo de nuevas tecnologías dan como resultado una gran diversidad de formas de contaminación. Comúnmente la vía de desecho de los contaminantes más utilizada es el agua, la cual no siempre puede ser tratada para su completa purificación. Dentro de los contaminantes que se encuentran en el agua residual están los compuestos recalcitrantes llamados nitrofenoles, estos son compuestos aromáticos provenientes de fuentes antropogénicas, debido a la actividad de varios sectores industriales como el químico, petroquímico y textil (Uberoi y Bhattacharya, 1997). Uno de los compuestos contaminantes encontrados en este tipo de aguas residuales es el 4-nitrofenol (4-NF), que puede ser utilizado como materia prima en la industria de tinturas, fungicidas, manufactura de medicamentos y en procesos para oscurecer el cuero. La producción anual de 4-NF es de 20,000 toneladas al año (US-EPA, 1980; Donlon et al., 1996). Y las concentraciones de 4-NF que se encuentran en aguas residuales pueden estar entre 10 y 190 mg/L (Howard, 1989).

El 4-NF es un compuesto que está clasificado como sustancia tóxica. En general, los compuestos que contienen un grupo nitro en su estructura tienen un riesgo agudo a la salud humana causando cianosis, y con una exposición crónica existe el riesgo de desarrollar cáncer; por lo cual resulta sumamente importante disminuir la cantidad de este tipo de compuestos del agua residual antes de que sean descargados al medio ambiente (Krick, 1979; Razo et al., 1996; She et al.,

2005). En este trabajo se plantea el uso de un proceso microbiológico anaerobio para transformar el 4-NF utilizando quinonas como mediadores redox (MR), acoplada a la oxidación de sustratos orgánicos (Field y Cervantes, 2005; Van Der Zee y Cervantes, 2009)

Por otro lado la inmovilización de microorganismos se define como la ubicación física de células microbianas activas en un espacio o región específica, ya sea de forma natural o inducida. La inmovilización permite una mejora significativa de su estabilidad, lo que hace posible su empleo en la producción industrial de químicos, farmacéuticos, alimentos, tratamiento de residuos, diagnóstico y tratamiento de enfermedades, entre otras aplicaciones. La inmovilización de microorganismos ha sido estudiada durante las últimas décadas como la solución y el mejoramiento de sistemas de tratamiento de aguas, suelos y aires contaminados (Garzón, 2008).

La inmovilización proveería una mejora en procesos de biotransformación en donde se produce una alta salinidad en el medio, causada por las industrias de fabricación de colorantes, ya que al estar en contacto con estas sales se produce una plasmólisis y / o pérdida de la actividad de las células y baja demanda química de oxígeno en el rendimiento de algunos tratamientos anaeróbicos (Guo et al., 2007).

2. ANTECEDENTES

2.1 Contaminantes recalcitrantes en efluentes industriales

Algunos de los contaminantes comúnmente desechados por efluentes industriales, son compuestos aceptores de electrones, tales como colorantes azoicos, compuestos nitroaromáticos, compuestos alifáticos halogenados, compuestos aromáticos halogenados y metaloides, los cuales no se ven afectados durante el tratamiento aeróbico de aguas residuales convencional. Sin embargo, bajo condiciones anaerobias estos contaminantes pueden someterse a transformaciones reductivas (Field et al., 1995; Van Der Zee et al., 2009).

2.1.1 Características fisicoquímicas del 4-nitrofenol

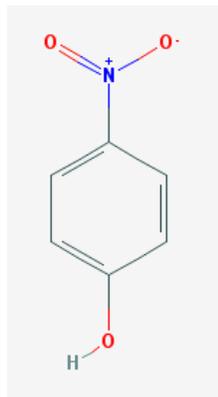


Figura 1. Estructura del 4-NF

El 4-NF, p-nitrofenol o 4-hidroxibenceno es una molécula orgánica con fórmula química de $C_6H_5NO_3$, la cual posee un grupo hidroxilo en la posición del carbono 1 y un grupo nitro en la posición del carbono 4. Este compuesto es un sólido en forma de cristales de color amarillo claro. Los compuestos fenólicos son incoloros generalmente, es el grupo nitro el que les da la coloración característica de tonalidad amarilla. La solubilidad es de 1.6 g/100 mL a 25°C.

2.1.2 Impacto ambiental del 4-nitrofenol

La descarga del 4-NF al medio ambiente por medio de efluentes industriales tiene repercusiones tanto en la flora como en la fauna. No se tienen datos de la dosis letal media o de la concentración letal en humanos, pero existen datos relacionados en animales y microorganismos entre los cuales podemos encontrar que la dosis letal media oral en ratas es de 202 mg/kg. También está la concentración letal de 96 h para peces que se encuentra entre 10 y 100 mg/L. La concentración tóxica límite para la cepa EC5 de *Pseudomonas putida* es de 0.9 mg/L de sustancia anhidra por 16 h según la International Uniform Chemical Information Database (IUCID).

En México, el límite máximo permitido de fenoles totales en agua potable debe ser de 0.001 mg/L (NOM-127-SSA1-1994). La biotransformación del 4-NF con *G. sulfurreducens* produce 4-AF y la cantidad de este compuesto para llegar a una dosis letal es mayor, como en el caso de las ratas que la dosis letal media oral es de 375 mg/kg. Esto nos indica que al realizar una biotransformación del 4-NF se obtendría otro contaminante con una menor toxicidad para el medio ambiente.

2.2 Procesos de tratamiento del 4-nitrofenol

2.2.1 Métodos fisicoquímicos

El tratamiento del 4-NF puede ser realizado por procesos fisicoquímicos entre los cuales se pueden encontrar los procesos de adsorción, coagulación-floculación, intercambio iónico y oxidación avanzada (Romero y Tzompantzi, 2012). Por

medio de estos procesos puede llegar a realizarse la degradación del compuesto recalcitrante (Ramos et al., 2015), pero debido a su alto costo resultan una alternativa poco viable.

2.2.2 Métodos biológicos

Existen microorganismos que pueden realizar la mineralización de compuestos nitroaromáticos como *Rhodococcus sp.* y *Desulfovibrio* (Dickel y Knackmuss, 1991; Nishino et al., 2000). En general, las características recalcitrantes y tóxicas de estas sustancias plantean una amenaza para el ambiente y para la salud (Roldan, 2008). El grupo nitro aporta resistencia en el anillo aromático a la biodegradación, varios autores han descrito estirpes bacterianas capaces de utilizar estos compuestos como fuente de carbono, liberando nitrito al medio. Entre estas cepas se incluyen especies pertenecientes a los géneros *Arthrobacter* (Chauhan et al., 2000), *Bacillus* (Kadiyala et al., 1998), *Pseudomonas* (Zeyer et al., 1986), *Burkholderia* (Bhushan et al., 2000), *Rhodobacter* (Roldán et al., 1998), *Sphingomonas* (Zablotowicz et al., 1999), *Nocardioides* (Ebert et al., 1999) y *Rhodococcus* (Lenke et al., 1992). Es importante mencionar que la liberación de nitrito al medio puede causar otra clase de repercusiones, concentraciones elevadas de nitrógeno pueden promover el desarrollo, mantenimiento y proliferación de los productores primarios (fitoplancton, algas bentónicas, macrófitos) contribuyendo al muy extendido fenómeno de la eutrofización cultural de los sistemas acuáticos (Camargo y Alonso, 2007).

En microorganismos anaerobios, los procesos respiratorios son notables debido a su capacidad para utilizar una variedad de compuestos como aceptores de electrones. La oxidación del acetato por medio de una deshidrogenasa libera un electrón el cual es captado por un NAD^+ para convertirlo en un NADH y éste a su vez es llevado al exterior por una enzima reductasa que se encarga de pasar el electrón hacia afuera de la célula bacteriana. Los transportadores de electrones de tipo reductor pueden transferir electrones a distintos compuestos aceptores finales de electrones, tales como colorantes azoicos, compuestos polihalogenados, nitroaromáticos y metaloides oxidados, incluyendo minerales insolubles, quinonas y ácidos húmicos (Hernández et al., 2012). Aunque se sabe mucho sobre el transporte microbiano de electrones, poco se entiende sobre el transporte a compuestos orgánicos (Gennis et al., 1996; Lovley et al., 1991). Pero el hecho de que las moléculas extracelulares exógenas (como las quinonas) pueden participar en la transferencia de electrones a los compuestos orgánicos indica que éstas pueden hacer una contribución significativa a la reducción de estos compuestos en muchos entornos (Lovley et al., 1996).

La biotransformación de 4-NF se ha realizado por medio de tratamientos con reactores anaerobios de flujo ascendente y lodos, donde las remociones fueron mayores al 99% de una concentración de 30 mg/L y con tiempos de retención de 30, 24, 18 y 12 h (Khursheed y Grupta, 2001).

Gorontzy et al, en 1993, realizaron la transformación de compuestos mono y dinitroaromáticos entre ellos el 4-NF, el cual fue reducido con una efectividad de 100% a las 48 h [0.1 mM = 13.9 mg/L] con la cepa *Desulfovibrio gigas*.

2.3 Uso de Mediadores Redox

Los MR son moléculas orgánicas que de forma reversible puede ser oxidadas y reducidas, confiriendo de este modo la capacidad de servir como un transportador de electrones en múltiples reacciones redox. Con el uso de MR ocurre la biotransformación del contaminante en dos pasos. Primero se reduce el MR con microorganismos al oxidar el sustrato, después el MR reduce de forma química el contaminante (Dai et al., 2016). Los MR funcionan como catalizadores ya que la alteración en su estructura no llega a formar un producto y tienen la capacidad de acelerar las reacciones mediante la reducción de la energía de activación (E_a) de la reacción, cuanto menor sea E_a , mayor será la velocidad (Figura 2). Esto se debe a que el MR forma con los reactivos un complejo activado distinto y menos energético que el que se forma en su ausencia, sin alterar los parámetros termodinámicos de la reacción.

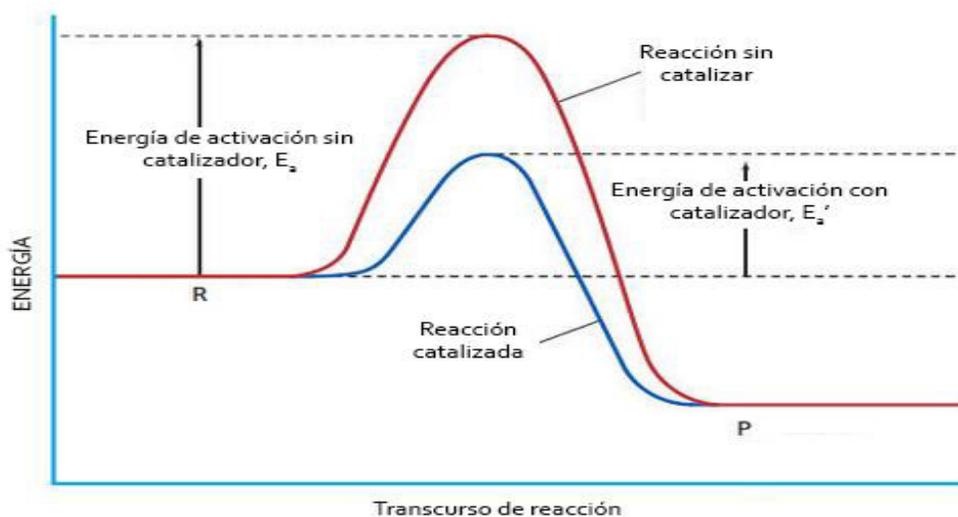


Figura 2. Diagrama energético de una reacción con catalizador y sin catalizador.

En algunos casos, la presencia de MR puede ser incluso un requisito previo para que la reacción tenga lugar. Éstos son capaces de transferir electrones en las reacciones redox entre una amplia variedad de compuestos inorgánicos y orgánicos.

La Figura 3 muestra el mecanismo de acción involucrado en la reducción y oxidación de MR mediante un proceso microbiológico. Además la reducción de

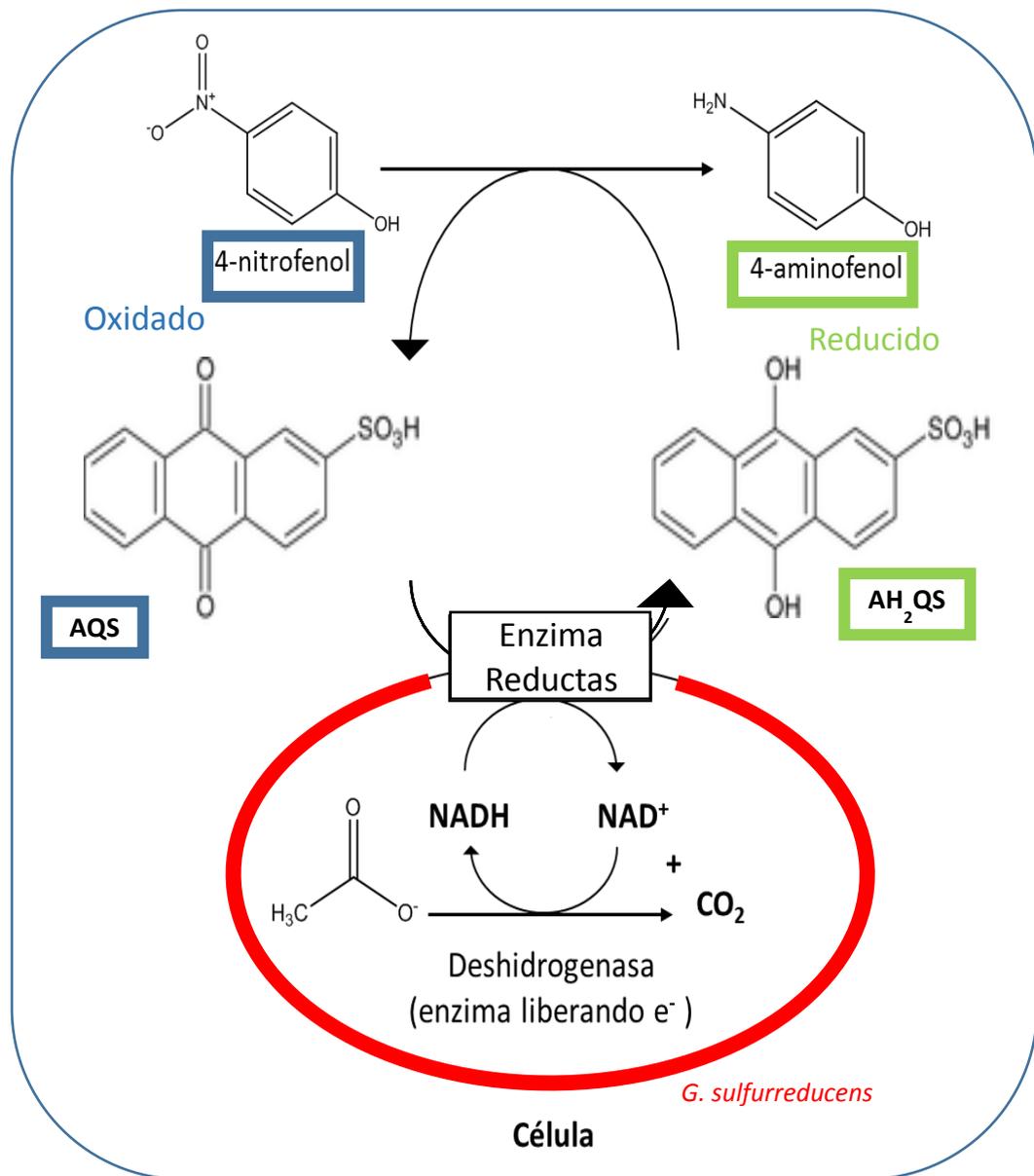


Figura 3. Mecanismo de acción de los MR en la biotransformación.

un MR también puede ser promovida por reacción química con agentes reductores que se encuentran comúnmente en muchos ambientes anaeróbicos (Van Der Zee y Cervantes, 2009).

Cuando la antraquinona-2-sulfonato (AQS) se convierte en el último aceptor de electrones por medio de una enzima reductasa, se transforma a su forma reducida AH₂QS, esto ocurre durante la oxidación de acetato.

Las sustancias húmicas tienen importancia en las reacciones abióticas y microbianas implicadas en la transformación redox de varios contaminantes azoicos, nitroaromáticos, compuestos policlorados, entre otros (Van Der Zee y Cervantes, 2009).

Muchos microorganismos tienen la capacidad de reducir los mediadores redox que están vinculados a la oxidación anaerobia con sustratos orgánicos e inorgánicos. Los transportadores de electrones se pueden reducir de forma química por medio de donantes de electrones que se encuentran en ambientes anaeróbicos (Field et al., 1995). La antraquinona es un MR comúnmente utilizado tanto en forma inmovilizada como soluble (Guo et al., 2007). La presencia de la antraquinona promueve una rápida formación inicial de arilhidroxilaminas (Guo et al., 2010).

Se han utilizado MR en la decoloración de colorantes azoicos, en donde se ve incrementada la velocidad de decoloración, debido al traspaso de electrones desde la oxidación microbiológica de sustratos orgánicos (los donantes de electrones), hasta los aceptores finales de electrones que son los colorantes azoicos (Dos Santos et al., 2004; Cervantes, 2002). Doong et al., en el 2014, utilizaron la bacteria *G. sulfurreducens* para evaluar el efecto de quinonas en la

decoloración de tetracloruro de carbono en presencia de ferrihidrita. La quinona actuaría como el aceptor final de los electrones que proporcionaría *G. sulfurreducens* en la reacción. Se utilizó antraquinona-2,6-disulfonato (AQDS) como un modelo para hacer la comparación. La reducción de ferrihidrita a Fe (II) por *G. sulfurreducens* fue mejorada por AQDS, lausona y 1,4-naftoquinona, presentando constantes de velocidad de 5.4-5.8, 4.6-7.4 y 2.5-5.8 veces más altas que los que no contenían quinonas.

Una de las problemáticas es la dosificación continua de MR disueltos, que genera un costo al invertir en los compuestos químicos, así como la contaminación en el efluente de estos compuestos que son también recalcitrantes (Van Der Zee et al., 2003; Dai et al., 2016). Debido a esto se han buscado formas de inmovilizar los MR. Se han utilizado fibras de carbón activado con funcionalidad de mediador redox (agregando AQDS), empleando lodo anaerobio en un reactor anaerobio de flujo ascendente (UASB) empaquetado con la fibra de carbón y con un tiempo de retención de 8 h, se encontraron incrementos de 1.47 a 2.11 veces para biotransformar 75 mg/L de 4-NF, comprado con un reactor UASB que no contenía las fibras de carbón (Amezquita- García et al., 2016).

Wang et al., en el 2013, inmovilizaron AQS covalentemente en espuma de poliuretano para un tratamiento de nitrobenceno con especies de *Shewanella*. La inmovilización aceleró la bio-reducción de nitrobenceno formando anilina, lo que se atribuye a un efecto sinérgico entre *Shewanella* y el MR inmovilizado, aumentando hasta 5 veces la constante de velocidad en comparación con los que no estaban inmovilizados.

2.4 Geles de alginato

Los alginatos son co-polímeros de bloques de origen natural y rápida gelificación, este polisacárido es principalmente aislado de algas marrones, está compuesto por residuos de β -D-manuronato y α -L-guluronato que se encuentran en forma lineal. La gelificación de alginato se presenta cuando los cationes divalentes, interactúan iónicamente con bloques de residuos de ácido gulurónico, lo que resulta en la formación de la red tridimensional que por lo general se describe como el modelo de caja de huevo (Grant et al., 1973). Los cationes divalentes se unen preferentemente a los bloques G (enlace de 3 guluronatos) en el alginato en una manera altamente cooperativa. La afinidad de los alginatos hacia los diferentes iones divalentes se ha demostrado que disminuye en el siguiente orden: Plomo > Cobre > Cadmio > Bario (Ba^{2+}) > Estroncio > Calcio (Ca^{2+}) > Cobalto, Niquel, Zinc > Manganeseo (Mørch et al., 2007). Los alginatos que presentan grandes regiones de bloques de α -L-guluronato forman un gel de gran fuerza, pero tienen alta porosidad. Y los que tienen mayores bloques de β -D-manuronato tienen fuerza media, pero con alta resistencia a expulsión de líquido, tienen poros más pequeños y suaves (Hernández et al., 2005; Avendaño – Romero et al., 2013).

Se han utilizado geles de alginato para la inmovilización de microorganismos, la red de gel tridimensional es bioquímicamente inerte y las células pueden quedar atrapadas en los espacios intersticiales del gel (Guo et al., 2007). La dosificación continua de las bacterias tolerantes a la sal conducía a un alto costo y la producción continua de lodos (Dai et al., 2016). Su et al., en 2009, inmovilizaron antraquinona y lodo anaerobio en alginato de calcio, las esferas de alginato

tuvieron un buen desempeño en la bioreducción anaerobia de contaminantes, incrementando de 3 a 7.7 veces la tasa de decoloración.

El alginato de calcio ha sido utilizado para la inmovilización de MR a través de la encapsulación de antraquinonas, para la reducción de compuestos de tipo azo y en la desnitrificación, en procesos anaerobios (Guo et al., 2007).

Se ha llevado a cabo la inmovilización de quinonas en geles de alginato de calcio, formando esferas al ser goteada la solución de alginato de sodio en cloruro de calcio. Los cristales quedan atrapados dentro de la esfera (Cheetham et al 1979).

Debe utilizarse una adecuada concentración de iones calcio y polímero para evitar la ruptura de las esferas durante el proceso, y que además tanto el sustrato como el producto puedan moverse satisfactoriamente a través de la red de alginato de calcio (Purwadi, 2006). La limitación de la transferencia de oxígeno a través del alginato de calcio es una ventaja para este proceso, debido a que la biocatálisis que realiza el microorganismo debe ser en condiciones anaerobias.

Se puede reforzar también la inmovilización por ejemplo utilizando nanotubos de carbono. La inmovilización de AQDS en esferas de alginato y nanotubos de carbono (NTC) se llevó a cabo para realizar la reducción de 20 mg/L de U (VI) a U (IV) con una efectividad de 97.5% en 8 h, la cual fue mayor que las que no contenían AQDS. Se utilizó una concentración de 0.7% de AQDS-NTC en las esferas. También se realizó la operación en ciclos (8 ciclos) y de forma continua, con efectividades de 92% y 90% respectivamente (Wang et al., 2015).

Se han utilizado esferas de alginato de calcio (0.01 y 5% de alginato) con un tamaño de 1.5-2.5 mm para determinar la sorción de 4-NF (2 mM = 278 mg/L) en presencia de tensoactivos, en donde se encontró que la efectividad fue de un

47% con 0.22 g de alginato de calcio a las 72 h, la remoción de 4-NF aumenta al incrementar la cantidad de grupos funcionales (Peretz, 2004).

3. HIPÓTESIS

El tratamiento del 4-NF con AQS inmovilizada en alginato de calcio y de bario, ocurre con tasas de biotransformación más altas en comparación con los controles sin mediadores redox.

4. JUSTIFICACION

La aplicación de MR en sistemas de tratamiento de aguas en continuo ha sido poco explorada, ya que se requerirían dosis continuas del mediador para alcanzar una buena capacidad catalítica. Es por ello que también se han estudiado estrategias que permitan inmovilizar los MR en distintos soportes, buscando mantener su capacidad catalítica. Por tal motivo, el uso de geles de alginato puede resultar una alternativa para inmovilizar tanto MR como microorganismos para ser aplicados en procesos de reducción de contaminantes electrofílicos.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar las tasas de biotransformación de 4-NF con AQS inmovilizada en alginato de calcio y en alginato de bario utilizando *Geobacter sulfurreducens*.

5.2 Objetivos específicos

1. Preparar y caracterizar geles de alginato de calcio y de bario que contengan AQS inmovilizada.
2. Evaluar la capacidad catalítica de AQS soluble e inmovilizada en geles de alginato de calcio y de bario durante la reducción de 4-NF por *G. sulfurreducens*.
3. Evaluar la capacidad catalítica de AQS y *G. sulfurreducens* simultáneamente inmovilizados en alginato de calcio y de bario en un proceso de biotransformación de 4-NF.
4. Evaluar la capacidad catalítica de AQS y *G. sulfurreducens* simultáneamente inmovilizados en alginato de calcio y de bario en un proceso de biotransformación de 4-NF a diferente pH.

6. MATERIALES Y METODOS

La parte experimental se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigación en Ciencias Ambientales del Centro de Laboratorios Especializados (CELAES) de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

6.1 Microorganismo y medio de cultivo

Se utilizó una cepa de *Geobacter sulfurreducens* que se obtuvo del Laboratorio de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT), mediante una estancia en enero del 2015. *G. sulfurreducens* es un bacilo gram negativo de 2 a 4 por 0.5 μm , inmóvil, no formador de esporas, anaerobio estricto, y quimioorganotrófico. Oxida acetato y puede utilizar Fe (III), S^0 , Co (III), fumarato o malato como aceptores finales de electrones. Puede también utilizar hidrógeno como donador de electrones para la reducción de Fe (III), mientras que no puede utilizar otros compuestos como ácidos carboxílicos, azúcares, alcoholes, aminoácidos, extracto de levadura, fenol, y benzoato. El rango de temperatura de crecimiento es de 30 a 35°C. Puede lograr crecer hasta en la mitad de la concentración de cloruro de sodio encontrada en el agua de mar (Caccavo et al., 1994).

El medio que se utilizó para el cultivo de *G. sulfurreducens* fue el siguiente:

Tabla 1. Composición del medio de cultivo para *G. sulfurreducens*.

MEDIO NBAF

d H ₂ O	800 mL
<u>NB mineral elixir</u>	10 mL
<u>100 X NB mix</u>	10 mL
<u>DL vitaminas</u>	10 mL
Na ₂ SeO ₃	0.3 mg
Resazurina al 1%	0.5 mL
CaCl ₂ • H ₂ O	0.04 g
Fumarato de sodio	40 mL
MgSO ₄ • 7 H ₂ O	0.1 g
NaHCO ₃	1.8 g
Na ₂ CO ₃ • H ₂ O	0.5 g
Acetato de sodio • 3 H ₂ O	2.04 g

Preparación del medio en botellas serológicas: Se llenaron botellas serológicas con medio NBAF, las de 15 mL (botella chica) con 10 mL y las de 120 mL (botella grande) con 87 mL, se sellaron, se les intercambió la atmósfera con N₂/CO₂ (80%/20%) alrededor de 15 min y se esterilizaron en autoclave (Tuttnaver®, 2540M) 15 min a 121°C y 15 lb de presión.

Reactivación de la cepa: Se descongeló la botella serológica que contenía la cepa pura con 24 h de crecimiento y se encontraba en conservación a -70°C.

La cepa fue reactivada en un frasco que contenía medio NBAF con una resiembra y se incubó a 37°C (Prendo®, INO 659V-7).

Resiembra del cultivo puro: Las resiembras se realizaron en botellas serológicas con 10 mL de medio NBAF a las cuales se les agregó 0.1 mL de cisteína 100 mM y 0.2 mL de extracto de levadura al 5% (previamente esterilizados y con intercambio de atmósfera). Se inocularon con 1 mL de un cultivo de 48 h del

microorganismo en condiciones de asepsia empleando jeringas estériles. Estas resiembras se realizaron cada 48 h y se incubaron a 37°C.

Cinética de crecimiento: Se sembró en un frasco con 10 mL de un preinóculo (de 48 h) y se dejó incubar 24 h, posteriormente de éste se sembraron frascos (triplicado) con un inóculo de 24 h para obtener un volumen final de 100 mL, se incubaron a 37°C, a los cuales se les tomó 1 mL de muestra cada 2 horas para realizar la lectura de la densidad óptica (D.O.) en un espectrofotómetro UV-Vis (Spectronic®, Genesys 5) a una longitud de onda de 600 nm.

Elaboración del concentrado celular: Para la elaboración del concentrado de *G. sulfurreducens* se resembró en una botella de 10 mL, se incubó por 48 h y se tomó todo el volumen para resembrar una botella grande con 87 mL de medio (añadiendo 1 mL de cisteína y 2 mL de extracto de levadura), esta última se incubó por 24 h. Después este cultivo se utilizó como inóculo para resembrar varias botellas con 87 mL de medio, de igual forma a lo descrito anteriormente. Se vació el contenido en tubos falcon, y se centrifugó a 4,500 rpm por 10 min. Los pellets se resuspendieron en 5 mL de agua por cada botella con 100 mL de medio aproximadamente. Se llevó a cabo un ajuste por medio de D.O. en un espectrofotómetro UV-Vis a una longitud de onda de 600 nm, para que en las cinéticas se manejaran valores de 0.2 de absorbancia de inóculo en el volumen final.

6.2 Curva de calibración del 4-NF

Se realizó una curva de calibración a partir de una solución madre de 5000 mg/L de 4-NF preparada en medio basal, de la cual se preparó una solución stock de 100 mg/L con buffer de fosfatos (K_2HPO_4 12.06 g/L, KH_2PO_4 5.23 g/L). Posteriormente se prepararon las soluciones para cada estándar según la siguiente tabla:

Tabla 2. Preparación de estándares de 4-NF

Estándar Numero	Concentración de estándares (mg/L)	Solución stock (mL)	Buffer de fosfatos mL
	0	0	0
1	5	2.5	47.5
2	10	5	45
3	15	7.5	42.5
4	20	10	40
5	25	12.5	37.5
6	30	15	35
7	40	20	30

Se realizaron las lecturas a 400 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Spectronic®, Genesys 5).

En base a esta curva de calibración se obtuvieron los cálculos para determinar la concentración de 4-NF en las muestras.

6.3 Protocolo de inmovilización

Para la formación de las esferas de alginato de calcio o alginato de bario con MR se preparó una solución de 5 g/L de AQS (Cheetham et al., 1979), y se añadió alginato de sodio al 3%. Las esferas que tenían *G. sulfurreducens* se prepararon

con el concentrado antes mencionado, resuspendido en agua. Se mezcló y posteriormente introdujo la solución en una jeringa y se dejó gotear en un vaso de precipitado que contenía una solución de CaCl_2 o de BaCl_2 al 0.2 M, para formar esferas de un tamaño de 2.5 mm de diámetro. Las esferas se dejaron madurar en CaCl_2 o en BaCl_2 durante 24 horas para mejorar la estabilidad a 4°C (Van Der Zee et al., 2009; Peretz, 2004), Otros autores han mostrado que la etapa de maduración en el proceso de preparación de esferas fue generalmente lenta, llegando al equilibrio de estado estacionario después de aproximadamente 15 horas, esto puede variar con la concentración de cationes, la fuerza iónica y el pH (Velings y Mestdagh, 1995). Previo a la elaboración de las cinéticas se realizó un lavado de las esferas en medio basal (NBAF sin aceptores finales de electrones, ni sustrato) por 12 h en una incubadora con agitación (Lab-Line®, 3525).

Este material se caracterizó mediante análisis infrarrojo para documentar la presencia de AQS en las esferas y se comparó con las que no contenían AQS. Las esferas se dejaron secar por 24 h a 37 °C en una incubadora (Prendo®, INO 659V-7), para eliminar el exceso de agua y que no generara interferencia. El análisis se llevó a cabo en un espectrómetro FTIR (Perkin-Elmer®, Spectrum-one).

6.4 Biotransformación reductiva de 4-nitrofenol

Todos los experimentos de biotransformación de 4-NF se llevaron a cabo en cultivos en lote por triplicado en botellas serológicas de vidrio de 120 mL, con un

volumen de trabajo de 50 mL del medio previamente descrito pero sin incluir resazurina ni fumarato. La concentración de acetato se ajustó a 1 g/L, el cual sirvió como fuente de carbono y primer donador de electrones (Caccavo et al., 1994); y se utilizó 1 mL de extracto de levadura de una solución de 50 g/L (Cheetham et al., 1979). Las condiciones anaerobias se lograron mediante el intercambio de atmósfera burbujeando el medio con una mezcla de N₂/CO₂ (80%/20%) por 15 min. El 4-NF se añadió a partir de una solución stock de 5 g/L. Las incubaciones, se realizaron a 37°C y 150 rpm, para que la bacteria se adaptara a la concentración del AQS y hubiera una reducción total del MR. El 4-NF se midió a partir de las muestras procesadas de la siguiente manera: se tomó una alícuota de 1 mL de cada botella y se centrifugó 10 min a 10,000 rpm. Se realizaron diluciones 1:5, 1:10 y 1:20 del sobrenadante con buffer de fosfatos para realizar las lecturas y evitar variaciones en el pH, se midió por espectrofotometría UV-Vis a una longitud de onda de 400 nm. La concentración de 4-NF se determinó ajustando las absorbancias a la curva de calibración. Las tasas de biotransformación de primer orden se calcularon mediante el ajuste de la curva de biotransformación a la siguiente ecuación:

$$C_t = C_0 * e^{-kt} \quad (1)$$

Donde C_t es la concentración a un tiempo dado, C_0 es la concentración inicial, k_d es la constante de velocidad de biotransformación y t es el tiempo.

6.4.1 Ensayos de biotransformación de 4-NF con AQS soluble

Se realizaron cuatro cinéticas de biotransformación de 4-NF agregando AQS y *G. sulfurreducens* (1 mL de 0.5 de absorbancia a 600 nm) de forma soluble, con un tiempo de pre incubación de 12 h, de acuerdo a lo siguiente:

1. Distintas concentraciones (50, 100, 200 y 400 mg/L) de 4-NF en ausencia de AQS.
2. Distintas concentraciones (50, 100, 200 y 400 mg/L) de 4-NF en presencia de 0.2 mM de AQS para evaluar su efecto como MR.
3. Biotransformación de 100 mg/L de 4-NF bajo distintas concentraciones (0.025, 0.050, 0.1, 0.2 y 0.4 mM) de AQS.
4. Biotransformación de 100 mg/L de 4-NF en presencia de 0.2 mM de AQS bajo distintos valores de pH (5, 6, 7, 8 y 9).

Se utilizaron los controles: endógeno, estéril, sin AQS, sin 4-NF.

Al realizar cinéticas de biotransformación con diferentes concentraciones de 4-NF y AQS, se buscó obtener información de posibles efectos inhibitorios en el metabolismo de *G. sulfurreducens*.

6.4.2 Ensayos de biotransformación de 4-NF con AQS inmovilizada

La biotransformación de 4-NF (100 mg/L) en presencia de AQS inmovilizada en alginato de bario se realizó utilizando 100 esferas de este material. La concentración resultante de AQS fue de 0.767 mM, esta concentración es más alta debido a que solo están en contacto las moléculas que se encuentran en la superficie de la esfera. Se inoculó 1 mL de *G. sulfurreducens* a partir de la

solución concentrada para una D.O. final de 0.5, adicionalmente se incluyeron los siguientes controles: endógeno, estéril, sin AQS y esferas solas.

6.4.3 Biotransformación de 4-NF con AQS y *G. sulfurreducens* inmovilizadas

Se realizaron cuatro cinéticas de biotransformación de 4-NF utilizando AQS y *G. sulfurreducens* simultáneamente a una concentración de 0.767 mM y D.O. de 0.5, respectivamente. Los ensayos fueron los siguientes:

1. Distintas concentraciones (50, 100, 200 y 400 mg/L) de 4-NF y 100 esferas de alginato de calcio.
2. Distintas concentraciones (50, 100, 200 y 400 mg/L) de 4-NF y 100 esferas de alginato de bario.
3. Biotransformación de 100 mg/L de 4-NF utilizando 100 esferas de alginato de calcio bajo distintos valores de pH (5, 6, 7, 8 y 9).
4. Biotransformación de 100 mg/L de 4-NF y 100 esferas de alginato de bario bajo distintos valores de pH (5, 6, 7, 8 y 9).

Se utilizaron los controles: endógeno, estéril, sin AQS y esferas solas.

Adicionalmente, las esferas utilizadas con 100 mg/L de 4-NF (ensayos 1 y 2 recientemente descritos) fueron reutilizadas bajo las mismas condiciones durante varios ciclos (48 h por ciclo) a fin de evaluar si se mantenía la capacidad catalítica. Se tomaron en cuenta los ciclos en los cuales las esferas aún estaban en buenas condiciones.

Biotransformación de 4-NF con AQS inmovilizada en alginato de calcio y de bario

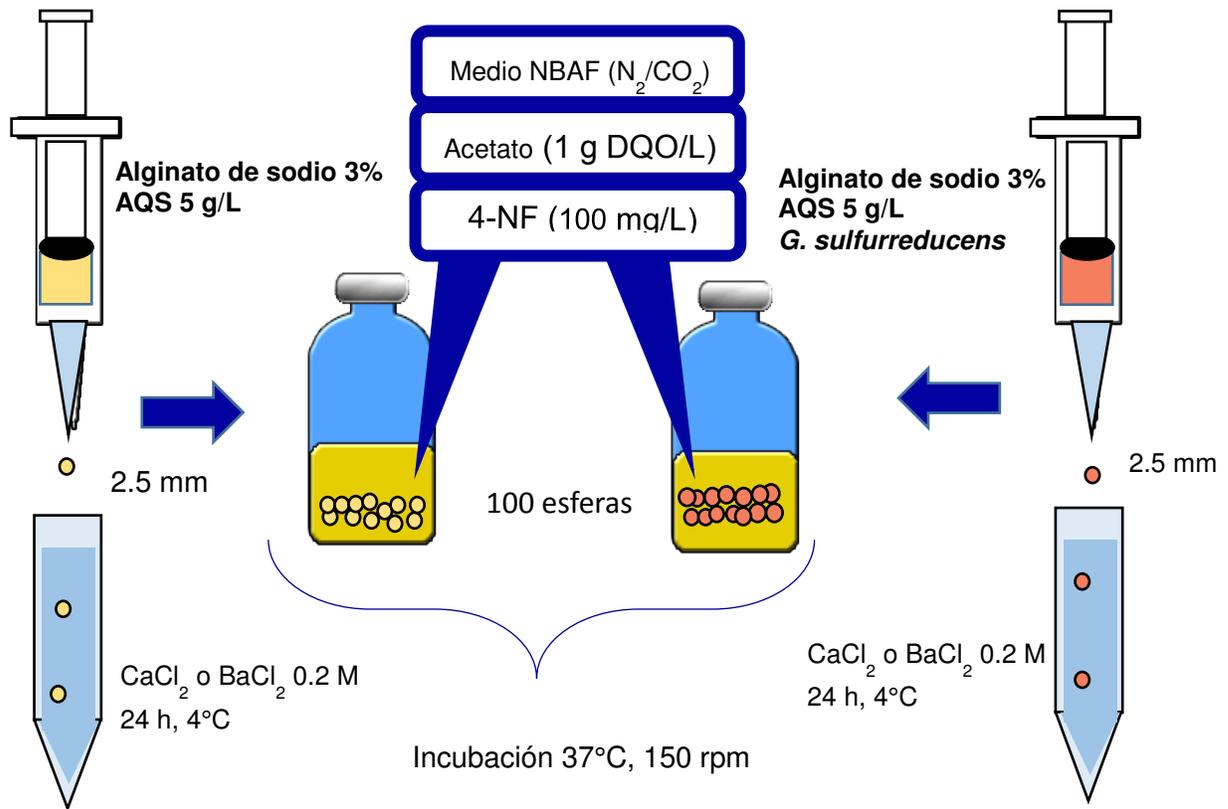


Figura 4. Biotransformación de 4-NF con AQS inmovilizada en alginato de calcio y de bario.

Disposición de los residuos generados.

La disposición de todos los residuos generados durante la etapa experimental, se realizó conforme se dicta en el manual de disposición de residuos químicos y peligrosos de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL.

Tabla 3. Disposición de residuos.

Residuo	Contenedor
4-nitrofenol	E Orgánico
Na ₂ SeO ₃	E Inorgánico
Cloruro de calcio	A
Alginato de sodio	A
Esferas alginato de calcio o de bario	A
Esferas de alginato + AQS	E Orgánico
Esferas de alginato + 4-NF	E Orgánico
Esferas de alginato + AQS + 4-NF	E Orgánico

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Crecimiento

En la cinética de crecimiento que se presenta en la figura 5, se pudo determinar que el tiempo de crecimiento máximo fue a las 24 h, con un inóculo inicial de 0.1 de D.O. Estos resultados se ajustan adecuadamente a una cinética de primer orden. El crecimiento fue una formación de agregados color rosa, característico de la cepa *G. sulfurreducens* (Figura 6).

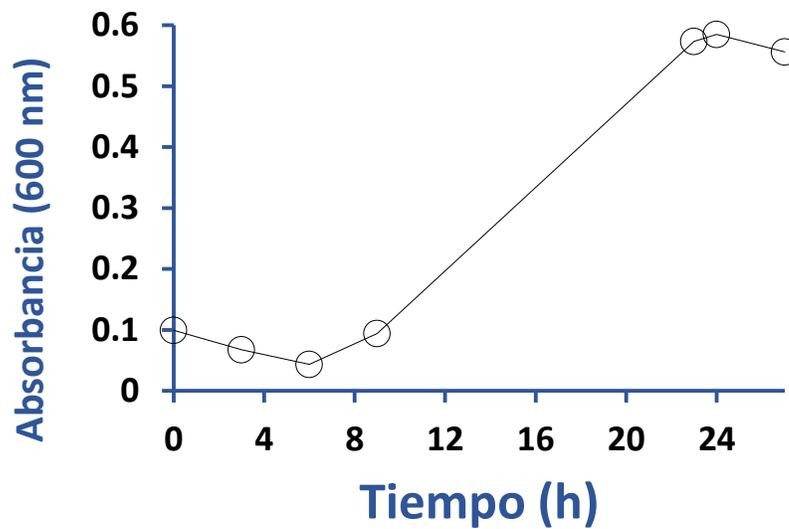


Figura 5. Cinética de crecimiento de *G. sulfurreducens*.



Figura 6. Crecimiento de *G. sulfurreducens* de 15 días.

7.2 Caracterización de las esferas de alginato de calcio y de bario.

Se logró la formación de las esferas de alginato de calcio y alginato de bario con un tamaño de 2.5 mm. En el proceso de maduración en CaCl_2 o en BaCl_2 las esferas se compactaron al formarse complejos entre el alginato y los cationes hacia el interior del gel (Velings y Mestdagh, 1995; Peretz, 2004).

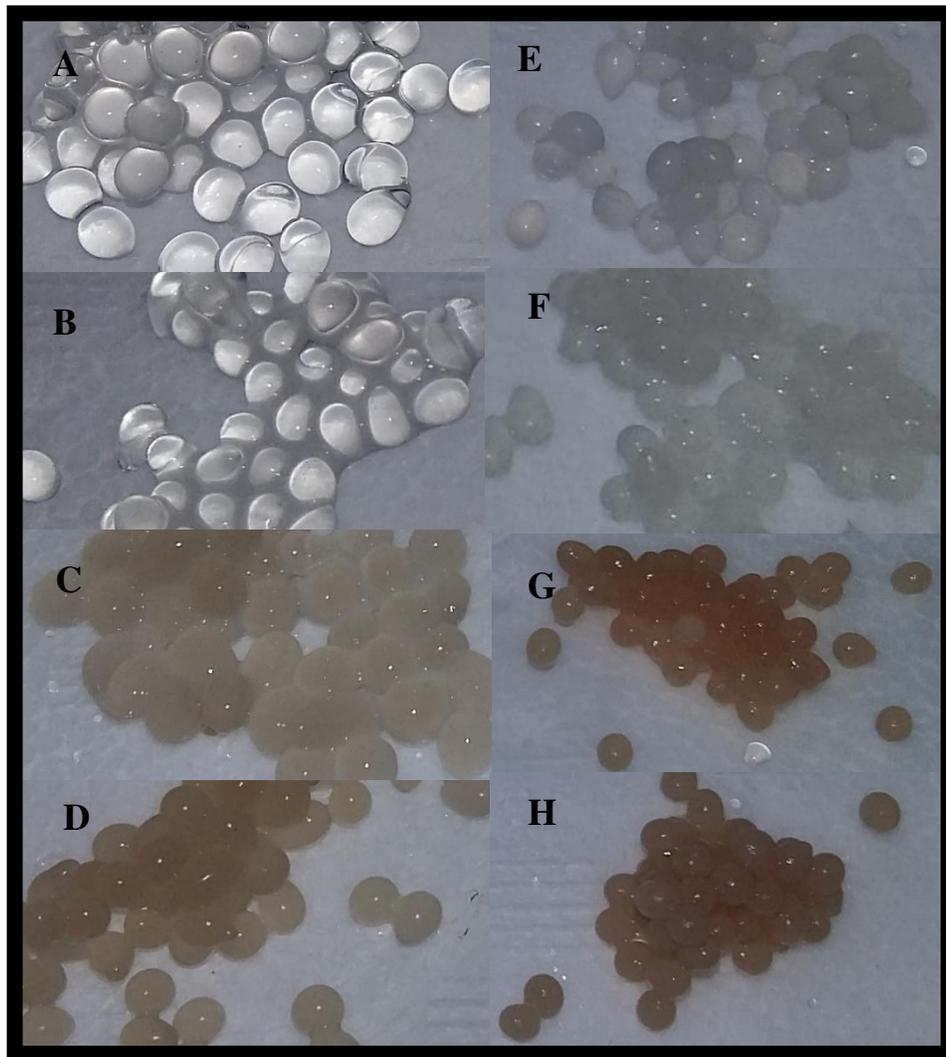


Figura 7. Esferas de alginato de calcio (A, B, C y D). Esferas de alginato de bario (E, F, G y H). Esferas solas (A y E). Esferas con AQS (B y F). Esferas con *G. sulfurreducens* (C y G). Esferas con AQS y *G. sulfurreducens* (D y H).

La AQS y las células quedaron inmobilizadas por atrapamiento físico dentro de las esferas de gel. Al realizar los lavados las esferas presentaron un hinchamiento osmótico, siendo mayor en el alginato de calcio. La preparación del gel con iones de bario se cree que formó enlaces más fuertes debido a que tiene un radio atómico más grande (2.15 Ångström) en comparación con calcio (1.8 Ångström), por lo tanto la producción de una disposición apretada con huecos más pequeños (Bajpai y Sharma, 2004). Se observó que el pH del medio (8.4-8.6) producía una inestabilidad mecánica en el gel, provocando que las esferas de alginato de calcio incrementaran de tamaño hasta 3 mm como se observa en la Figura 7. Se puede suponer que se debió a la formación de especies de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ en donde el catión ya no se encontraba unido al alginato (Velings y Mestdagh, 1995). También se puede suponer que el proceso de hinchamiento de las esferas se debe al intercambio de los iones Ca^{2+} y Ba^{2+} con los de Na^+ presentes en las sales del medio, formando otras especies de calcio como lo son los hidróxidos o los fosfatos, provocando el hinchamiento debido a la captación de agua. Este argumento se ve apoyado por la aparición de turbidez en el sistema seguido de la formación de fosfato o hidróxido con calcio o bario (Figura 8), la presencia de la turbidez se observó desde el inicio del lavado y no se observó al cambiar las esferas al frasco de cinética, aun así el intercambio de iones llevó a cabo de manera más lenta conforme pasaba el tiempo. Los valores de captación de agua de equilibrio siguen el orden $\text{Ca}^{2+} > \text{Ba}^{2+}$ y el tiempo de duración total antes de la disolución completa sigue el orden inverso es decir, $\text{Ba}^{2+} > \text{Ca}^{2+}$ (Bajpai y Sharma, 2004; Mørch et al., 2007).

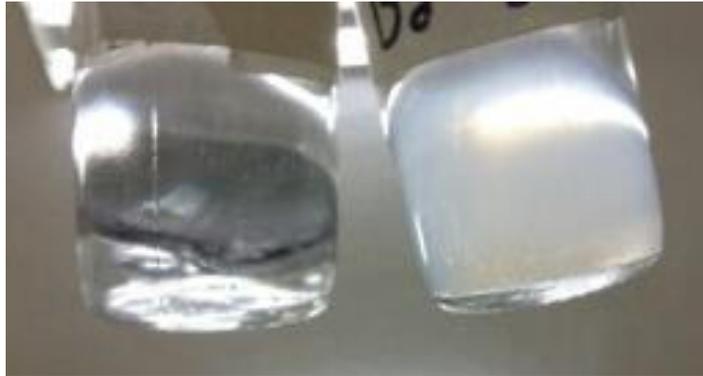


Figura 8. Izq. Medio solo. Der. Lavado de esferas de alginato de bario.

En un estudio en el que se produjeron esferas con alginato de sodio (4%), utilizando cloruro de calcio y cloruro de bario (4%), se encontró que las esferas con iones de bario se hinchaban un 40% en buffer de fosfato salino a pH 7.4, mientras que las esferas de alginato de calcio llegaban a un 160% de absorción de agua, para su posterior disolución (Bajpai y Sharma, 2004). Se ha observado que las esferas producidas con alginatos de calcio y bario al exponerlas en solución salina, el intercambio de los cationes con los iones sodio era menor en alginato de bario en los geles que contenían mayor cantidad de bloques de residuos de ácido gulurónico, y también presentando un fenómeno de hinchamiento de las esferas menor (Mørch et al., 2007).

En la comparación de los espectros de análisis infrarrojo de los alginatos, se pudo observar intensidad en las bandas de la región 2853-2962 cm^{-1} que pertenecen a los enlaces C-H en grupos alquil.

<i>Asignación</i>	<i>Alg-Na⁽⁺⁾</i> <i>[cm⁻¹]</i>
v(OH)	3260
v(CH) _{anómero-α}	2926
v(COO) _{sim.}	-
v(COO) _{asim.}	1595
v(COO) _{sim.}	1406
δ(CCH)+ δ(COH)	1296
v(CO)+ v(CCC)	1082
v(CO)+ δ(CCO)+ δ(CC)	1026

} $\Delta v = 189 \text{ cm}^{-1}$

Figura 9. Bandas características de un espectro infrarrojo de alginato de sodio.

Cuando un ácido carboxílico se transforma en carboxilato, los enlaces C=O y C-O se sustituyen por dos enlaces equivalentes C=O intermedios. Por lo tanto, el ion carboxilato tiene dos bandas características, una de las cuales es intensa, de la deformación axial asimétrica del enlace C-O y que aparecen entre 1650 y 1550 cm^{-1} . La otra, más débil, se observa alrededor de 1400 cm^{-1} y viene de la deformación axial de C-O simétrica.

La banda $1250 \pm 80 \text{ cm}^{-1}$ se puede acoplar con la deformación axial del enlace C=O.

Las bandas encontradas en 1030-1050 cm^{-1} pertenecen a los enlaces C-C, C=O y C-O-C.

La formación de la sal con los grupos carboxilato, reflejan un desplazamiento de la banda 1737 cm^{-1} hasta 1580 cm^{-1} (Pinotti, 2007).

La adición de *G. sulfurreducens* en los alginatos, disminuía la intensidad de las bandas, se puede suponer que la coloración de la bacteria pueda causar una interferencia en la lectura.

Pero en el caso de la adición de AQS y *G. sulfurreducens* juntas las bandas adquirieron mayor intensidad.

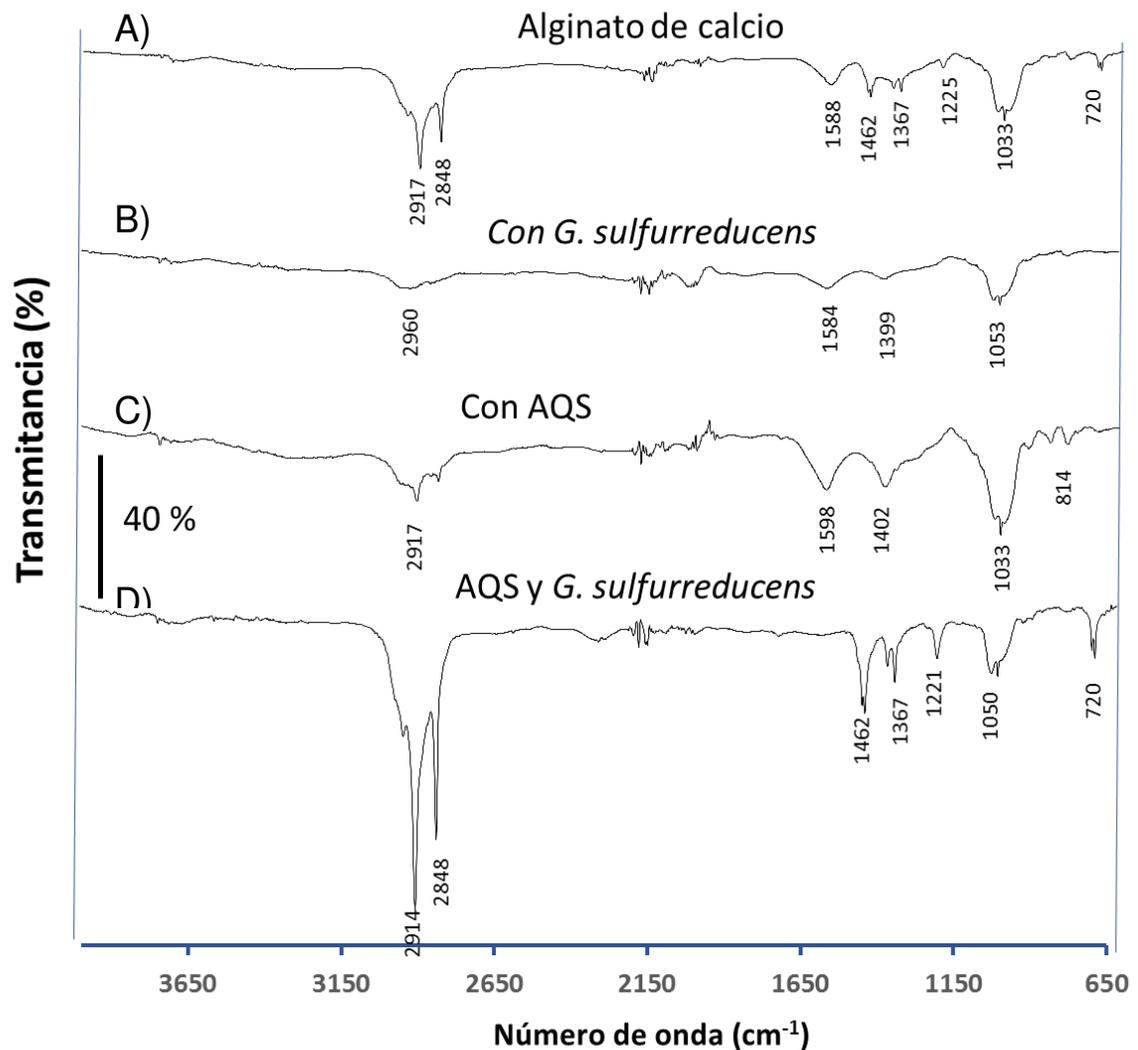


Figura 10. Espectro infrarrojo de los alginatos de calcio. Solo (A), con *G. sulfurreducens* (B), con AQS (C), con AQS y *G. sulfurreducens* (D).

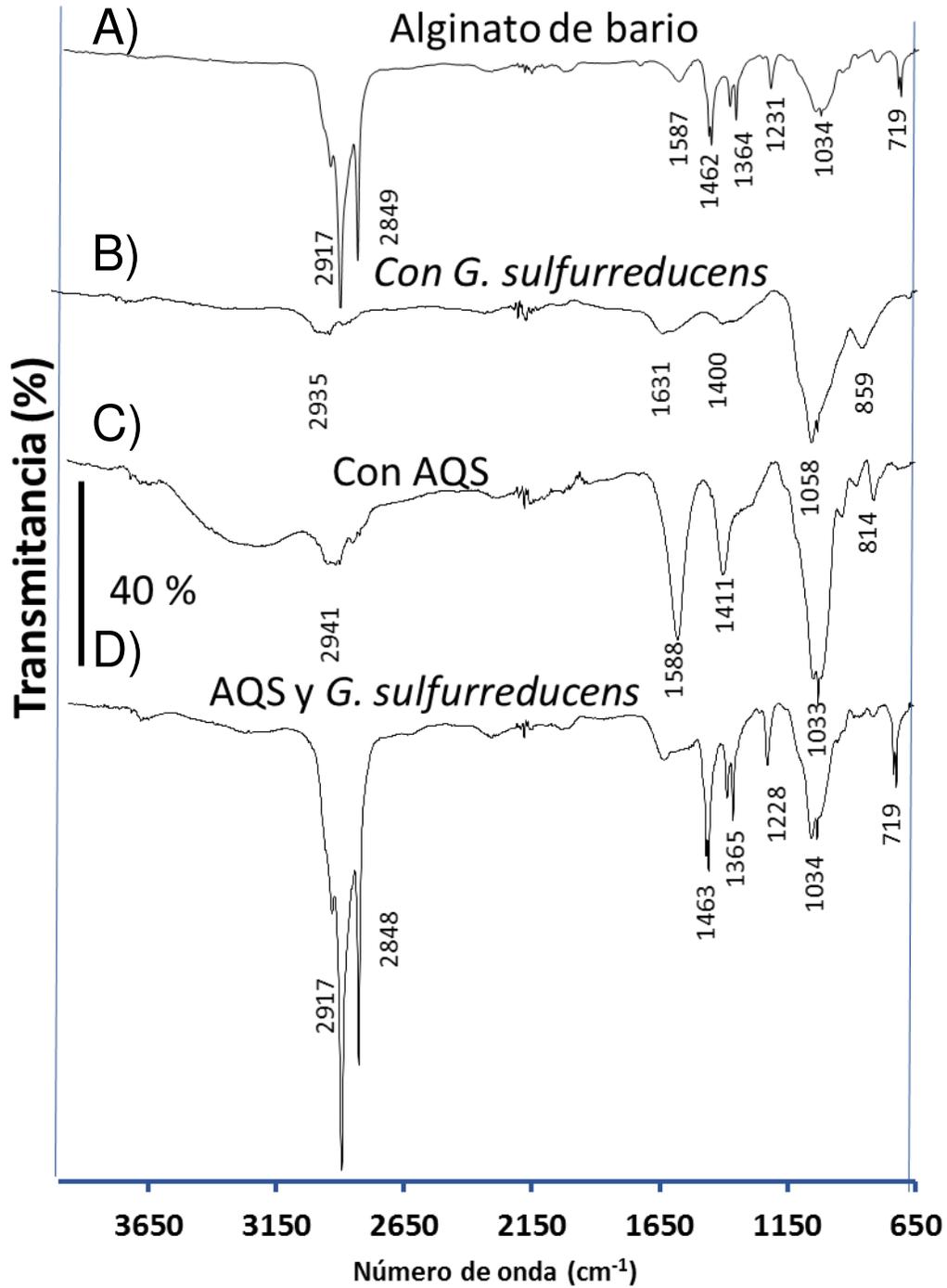


Figura 11. Espectro infrarrojo de los alginatos de bario. Solo (A), con *G. sulfurreducens* (B), con AQS (C), con AQS y *G. sulfurreducens* (D).

Como podemos observar en las figuras 10 y 11, cuando había presencia de AQS en los geles (C y D), aumentaba la intensidad de las bandas que corresponden al desplazamiento del carboxilato y alrededor de 1000 cm^{-1} que corresponde a la unión con un grupo sulfonato, con esto se puede comprobar la presencia de los grupos funcionales de la quinona presentes en la superficie de las esferas.

7.3 Curva de calibración de 4-NF

La curva de calibración dio como resultado una pendiente con valor de 0.0557 y un coeficiente de correlación (R^2) de 0.9997.

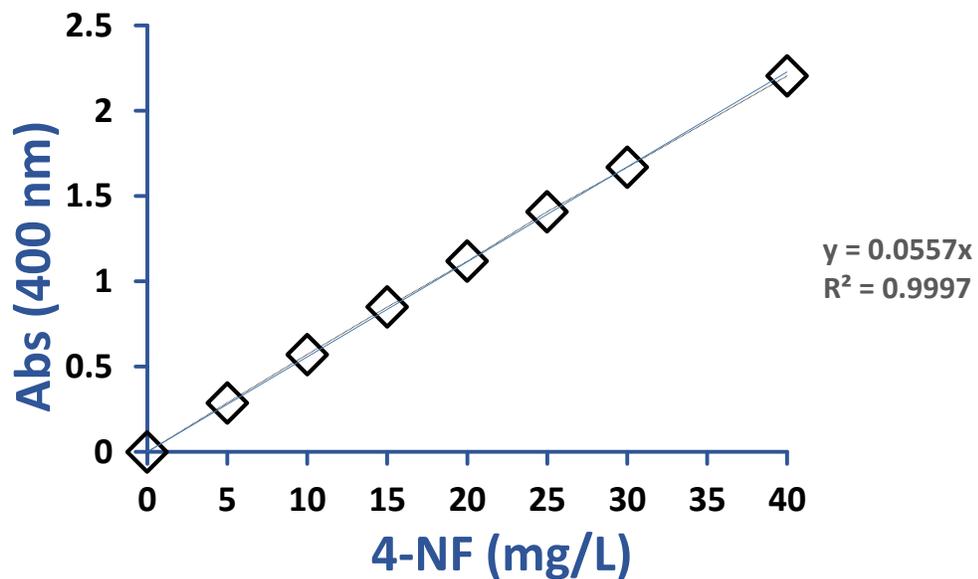


Figura 12. Curva de calibración de 4-NF

7.4 Biotransformación de 4-NF

Los experimentos de biotransformación reductiva de 4-NF permitieron elucidar por un lado el papel de *G. sulfurreducens* para oxidar acetato utilizando 4-NF como aceptor final de electrones y por otro lado evaluar el proceso utilizando la capacidad catalítica de AQS al actuar como MR. Además, fue posible documentar el proceso reductivo de 4-NF utilizando AQS y *G. sulfurreducens* inmovilizadas simultáneamente en alginato de calcio y de bario. También se encontró que la reducción del 4-NF puede ser afectada por factores como el donador de electrones, la concentración del contaminante, la concentración del MR, la densidad celular, la temperatura, el pH y la mezcla de las condiciones. A continuación se muestran los resultados encontrados.

7.4.1 Biotransformación de 4-NF en ausencia de AQS

El ensayo de biotransformación de 4-NF por *G. sulfurreducens* en ausencia de AQS se realizó con una cinética a diferentes concentraciones del contaminante, con el fin de conocer si la bacteria era capaz de utilizar el 4-NF como aceptor final de electrones de manera directa e investigar a qué velocidad se efectuaba esta biotransformación.

Se pudo observar, tal como se muestra en la Figura 13 en donde hubo una disminución en la concentración de 50 mg/L de 4-NF a través del tiempo (144 h) con una efectividad del 100%. Esto indica que *G. sulfurreducens* si realiza la biotransformación pero es muy lento el proceso.

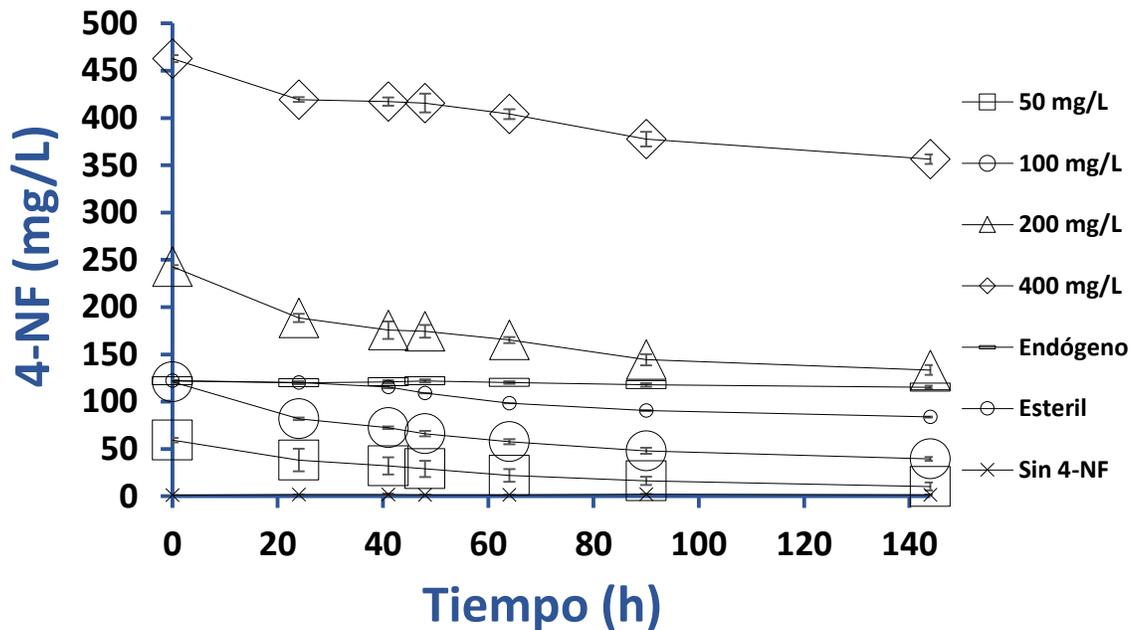


Figura 13. Cinética de biotransformación de diferentes concentraciones de 4-NF sin MR, pH 8.4-8.6.

También se pudo observar que en las concentraciones de 200 y 400 mg/L hubo inhibición en el proceso de biotransformación. Las altas concentraciones de 4-NF resultan ser tóxicas para diversos tipos de microorganismos. Se han realizado estudios para la biotransformación de 4-NF utilizando lodo digestor anaerobio, bacterias metanogénicas, bacterias anaeróbicas halófilas, lodos de depuración anaerobia y sedimentos enriquecidos en los cuales se biotransformó 4-NF en concentraciones desde 5 hasta 100 mg/L con efectividad media o baja y tiempos muy largos (Razo-Flores, 1997).

Uberoi en 1997, en un proceso con lodo anaerobio por lotes logró la biotransformación de 20, 30 y 40 mg/L de 4-NF en 5, 6 y 19 d respectivamente, con una efectividad del 99%; al incrementar la concentración de lodo (al doble),

el tiempo de biotransformación se vio reducido a 2, 3 y 6 d para las anteriores concentraciones mencionadas.

Se ha podido realizar la adaptación de microorganismos a concentraciones más altas de 4-NF, en donde se utilizó lodo granular en un reactor UASB, que en un periodo de 200 días se fue incrementando desde 12 hasta 260 mg/L la concentración de 4-NF y teniendo efectividad de 80 a 100% en la biotransformación (Donlon et al., 1996).

Las celdas de combustible microbianas también han sido utilizadas para la biotransformación de 4-NF, realizando el transporte de electrones desde la celda del ánodo en la que estaba el consorcio hasta el cátodo donde se encontraba el contaminante, realizando la reducción de 100 mg/L de 4-NF con una efectividad de 66.7% en 50 h (Zhang et al., 2016).

El proceso de reducción anaerobia con consorcios también se ha realizado con contaminantes similares estructuralmente al 4-NF, en los cuales se genera el traspaso de electrones que realiza la modificación del grupo nitro al grupo amino, utilizando lodo anaerobio para reducir 2,4-dinitrofenol con el cual se obtuvo una efectividad de 62.5% para biotransformar una concentración de 45 mg/L en 45 d; 3-nitrofenol el cual en un periodo de 10-12 d se biotransformó el 73.6% de una concentración de 100 mg/L (She et al., 2005).

En otra ocasión se utilizó *Shewanella putrefaciens* para realizar la biotransformación de nitrobenceno, utilizando lactato como donador de electrones se logró una efectividad de 98.4% para reducir 0.149 mM en 24 h (Luan et al., 2009).

7.4.2 Biotransformación de 4-NF con AQS soluble

Se determinó la capacidad catalítica de 0.2 mM de AQS soluble bajo diferentes concentraciones de 4-NF (50-400 mg/L). Aun y con la adición de MR los resultados mostraron que a concentraciones de 400 y 200 mg/L de 4-NF se alcanzaron reducciones muy bajas de 10 y 26%, respectivamente, después de 12 h de incubación. A pesar de la baja efectividad observada, *G. sulfurreducens* fue capaz de reducir el 4-NF mediado con AQS, pero en ausencia de la quinona se vio muy disminuido el proceso de biotransformación. Además, la baja efectividad se puede suponer que se deba a una posible inhibición del compuesto sobre el microorganismo. Por otro lado, a la concentración de 50 mg/L se observó efectividad en la biotransformación de 90% en tan solo 4 h de incubación. Para cultivos con 100 mg/L de 4-NF se alcanzó una efectividad de 70% a las 12 h (Figura 14). La biotransformación de 4-NF con *G. sulfurreducens* es muy efectiva comparada con cepas como *Desulfovibrio gigas* que realizan la biotransformación de 0.1 mM (13.9 mg/L) de 4-NF en 48 h (Gorontzy et al., 1993). Concentraciones superiores 100 mg/L de 4-NF reflejan inhibición en *G. sulfurreducens*, teniendo una mayor resistencia comparada con la inhibición observada en cepas como *D. gigas* que con concentraciones superiores a 0.2 mM (27.8 mg/L de 4-NF) retardan el crecimiento, lo cual se hizo evidente al observar una fase de latencia prolongada y una concentración de 1.0 mM (139.1 mg/L de 4-NF) llevó a completar la inhibición del crecimiento (Gorontzy et al., 1993). Zablutowicz en 1999, utilizó *Sphingomonas sp.* para realizar la biotransformación de 0.1 mM (13.9 mg/L) de 4-NF con una efectividad de 90.1% a las 36 h, cabe mencionar que la biotransformación es muy similar a la realizada

por *G. sulfurreducens* sin la adición de MR, pero la concentración de contaminante a biotransformar es muy baja.

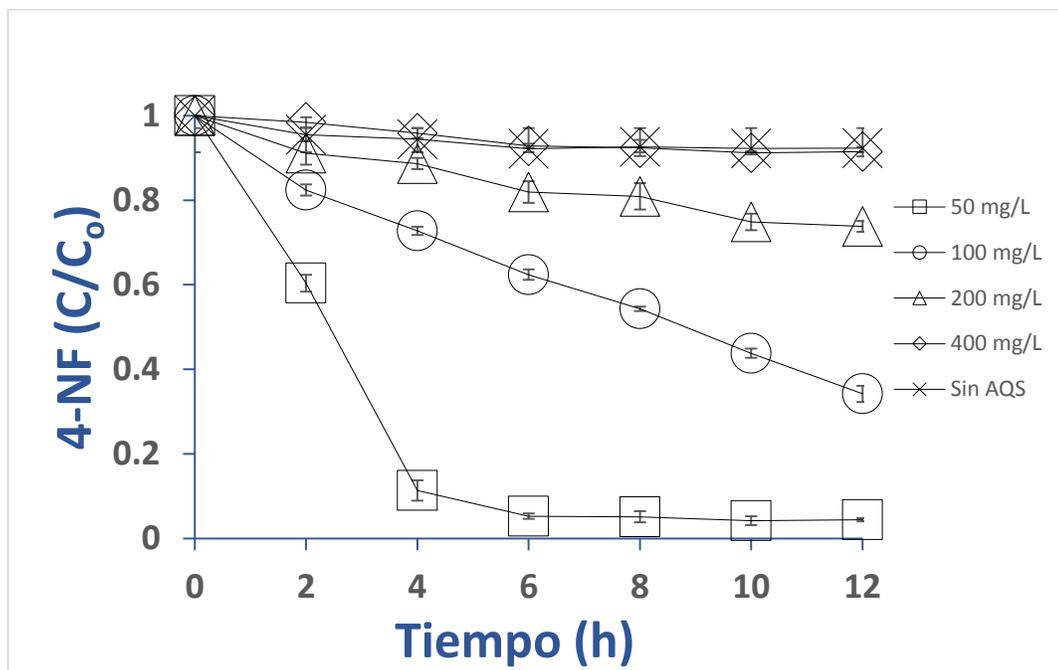


Figura 14. Cinética de biotransformación de diferentes concentraciones de 4-NF con 0.2 mM de AQS, pH 8.4-8.6.

La capacidad catalítica de AQS al actuar como MR también fue documentada a través de las tasas de reducción (k_d) observadas. La Tabla 4 muestra los valores de k_d para las diferentes condiciones probadas. Se encontró que hubo un incremento en la k_d de hasta 9.43 veces al utilizar AQS en la biotransformación de la concentración de 100 mg/L comparado con el control que no tenía MR. Se ha evaluado el uso de quinonas con *G. sulfurreducens* por ejemplo para la dechloración de tetracloruro de carbono en presencia de ferrihidrita. Utilizando la quinona como el aceptor final de los electrones evaluando lawsona, 1,4-naftoquinona y AQDS se observó que fueron más altas las constantes de

velocidad (5 - 7 veces) de los que tenían mediador redox, que los que no contenían quinonas (Doong et al., 2014).

Tabla 4. Tasa de biotransformación de diferentes concentraciones de 4-NF con 0.2 mM de AQS soluble.

Concentración de 4-NF (mg/L)	K_d (h^{-1})	Incremento
50	0.4890	
100	0.0830	9.43
200	0.0278	
400	0.0090	
100 (Sin AQS)	0.0088	

Al realizar la variación de las concentraciones de AQS para biotransformar 100 mg/L de 4-NF se encontró que 0.4 mM de AQS tuvo una efectividad de biotransformación del 90% a las 14 h de incubación. Con 0.1 y 0.2 mM de AQS se biotransformó alrededor del 80% del 4-NF en el mismo periodo. Finalmente la efectividad de biotransformación utilizando 0.025 y 0.050 de AQS fue entre 45-55% (Figura 15). Entre mayor fue la concentración del MR se aumentó la efectividad de biotransformación sin presentar inhibición de *G. sulfurreducens* por la concentración de AQS.

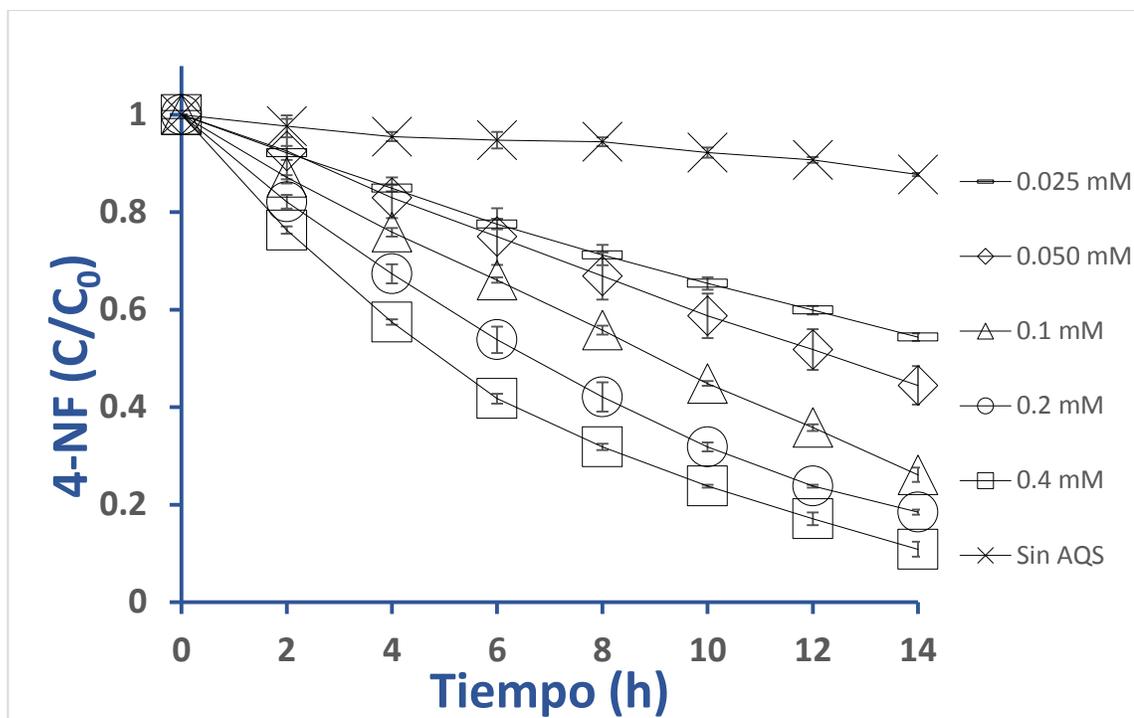


Figura 15. Cinética de biotransformación de 4-NF (100 mg/L) a diferentes concentraciones de AQS (0.025-0.4 mM), pH 8.4-8.6.

La Tabla 5 muestra valores de k_d al evaluar diferentes concentraciones de AQS. Los incrementos para las concentraciones de 0.025, 0.050, 0.1, 0.2 y 0.4 fueron de 4.98, 6.31, 9.89, 13.48 y 17.39 veces en comparación con el control que no tenía AQS. Encontrando que, entre mayor fue la concentración de MR, mayor fue la tasa de biotransformación de 4-NF. Se han observado altos incrementos de las tasas de biotransformación con otros MR como es el caso del uso de nano partículas de bio-paladio, las cuales fueron reducidas por lodo activado (48 h), para después biotransformar 1 mM (139 mg/L) de 4-NF en tan solo 6 h, lo que dio como resultado de 20 veces mayor la reducción de 4-NF con nanopartículas de bio-paladio, que los gránulos sin nanopartículas (Suja et al., 2014).

Tabla 5. Tasa de biotransformación de 100 mg/L de 4-NF con diferentes concentraciones de AQS soluble.

Concentración de AQS (mM)	K_d (h^{-1})	Incremento
0.025	0.0428	4.98
0.050	0.0543	6.31
0.1	0.0851	9.89
0.2	0.1159	13.48
0.4	0.1496	17.39
Sin AQS	0.0086	

En la evaluación de la biotransformación a diferente pH se observó que a pH 9 se obtuvo una efectividad de 90% a las 20 h de incubación. A pH 7 y 8 fue alrededor del 80%. Para pH 5 y 6 se obtuvieron biotransformaciones menores a 60% (Figura16). La capacidad de *G. sulfurreducens* para sobrevivir a pH menor de 7 puede verse afectada, ya que debido al metabolismo de la bacteria el pH se va modificando, el pH inicial tiende a ir disminuyendo conforme avanza la cinética. Estudios anteriores con bacterias tolerantes a sales, han demostrado que el rango de pH en el que se benefician las reacciones como decoloración (100% de efectividad) es entre 6-10 (Guo et al., 2007).

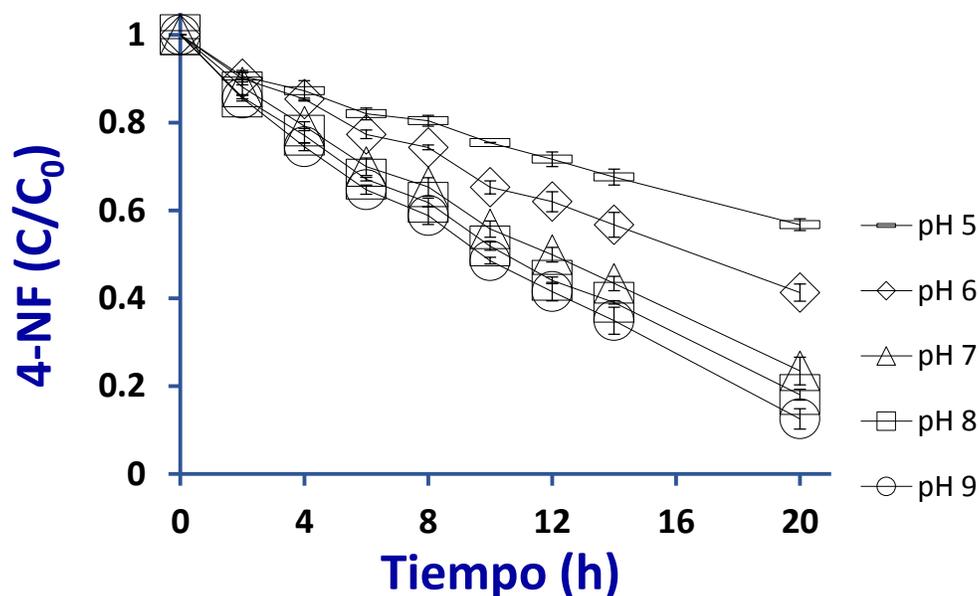


Figura 16. Cinética de biotransformación de 4-NF (100 mg/L) a diferente pH (5-9) y AQS 0.2 mM.

Las tasas de reducción al evaluar con diferentes pH reflejan que a pH 9 hubo un incremento de 1.15, 1.47, 2.04 y 3.02 veces al comparar con los pH 8, 7, 6 y 5 respectivamente. La capacidad catalítica disminuye conforme el pH es más ácido, se puede suponer que esto pasa debido al aumento de protones en el medio los cuales estarían reteniendo el paso de los electrones y retardarían el traspaso de éstos al receptor final.

Tabla 6. Tasa de biotransformación de 100 mg/L de 4-NF con 0.2 mM de AQS soluble a diferente pH.

pH	K_d (h^{-1})
5	0.0284
6	0.0420
7	0.0582
8	0.0743
9	0.0857

7.5 Biotransformación de 4-NF con AQS inmovilizada

En este experimento se evaluó AQS y *G. sulfurreducens* solubles e inmovilizadas, la concentración de AQS soluble se ajustó a la concentración que contenían las esferas (0.767 mM), esta vez se obtuvo el 100% de la biotransformación de 100 mg/L de 4-NF a las 10.5 h, y tomando en cuenta que no se realizó preincubación. La inmovilización de AQS y la bacteria es más efectiva que utilizar solo AQS inmovilizada, logrando biotransformaciones de 90 y 75% respectivamente a las 48 h. Cabe mencionar que la bacteria inmovilizada estaba a una concentración mayor que la que se utilizó soluble, esto se debió a la cantidad de esferas utilizadas (100), para lo cual se necesitó 2.38 mL del concentrado, considerando que 1 mL de alginato proporcionaba 42 esferas. En el control sin MR se biotransformó el 25%. Las esferas solas muestran una disminución de 4-NF de 10%, lo cual se puede atribuir a una absorción por parte de las esferas. Esta absorción es menor a la observada en otros experimentos, en donde se presentaba una absorción de 47% en alginato de calcio (Peretz, 2004).

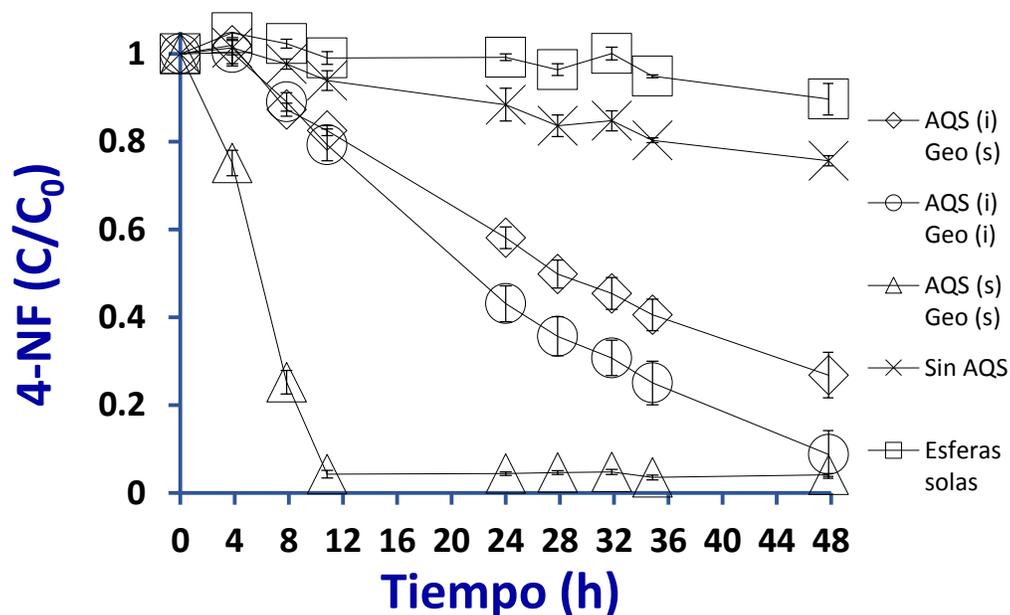


Figura 17. Cinética de biotransformación de 4-NF (100 mg/L) AQS soluble e inmovilizada en alginato de bario, pH 8.4-8.6.

En el caso de las dos inmobilizaciones (AQS sola y AQS con *G. sulfurreducens*) se pudo documentar una mayor tasa de biotransformación cuando se utilizaba el MR. Aumentando la k_d en 4.41 y 7.24 veces con las inmobilizaciones de AQS sola y AQS con *G. sulfurreducens* respectivamente en comparación con el control sin MR. Al estar *G. sulfurreducens* de forma soluble y el MR inmovilizado, solo se tiene contacto con el mediador que se encuentra en la superficie lo que dificulta el traspaso de electrones hacia el interior de la esfera, sin embargo al contener la esfera el MR y la bacteria se puede promover este traspaso a través de los filamentos de las células, creando una red de traspaso de electrones por el interior de la esfera.

Tabla 7. Tasa de biotransformación de 4-NF con AQS y *G. sulfurreducens* soluble e inmovilizadas en alginato de bario.

	K_d (h^{-1})	Incremento
Alginato de bario		
AQS (i) Geo (s)	0.0256	4.41
AQS (i) Geo (i)	0.0420	7.24
AQS (s) Geo (s)	0.2376	
Sin AQS	0.0058	
Esferas solas	0.0013	

Se han utilizado fibras de carbón activado con funcionalidad de mediador redox (agregando AQDS), empleando lodo anaerobio en un reactor anaerobio de flujo ascendente (UASB) empacutado con la fibra de carbón y con un tiempo de retención de 8 h, se encontraron incrementos de 1.47 a 2.11 veces para biotransformar 75 mg/L de 4-NF comparado con un reactor UASB que no contenía las fibras de carbón (Amezquita- García et al., 2016).

Se realizaron ciclos de biotransformación de 4-NF utilizando AQS sola inmovilizada en los dos tipos de geles y *G. sulfurreducens* soluble, las esferas solo resistieron un ciclo, en el siguiente ciclo las esferas ya se encontraban con rompimiento. Es probable que *G. sulfurreducens* tenga alguna actividad con la superficie de la esfera, lo que hace que se debilite y se rompa con mayor facilidad.

7.6 Biotransformación de 4-NF con AQS y *G. sulfurreducens* inmovilizadas.

La inmovilización en los geles de alginato permitieron la encapsulación del MR y de la bacteria, los iones de calcio y de bario fueron formando una estructura de

gel en la superficie de las esferas y entre mayor era el tiempo de maduración, les dieron más soporte al interior. De esta forma, la encapsulación proporcionó una protección al microorganismo para que no estuviera en contacto directo con las altas concentraciones del contaminante o las variaciones en el pH; aun así la biotransformación no fue tan rápida como con AQS soluble, ya que la parte que estaba en contacto con el medio era solo la superficie de la esfera. Se pudo observar en el alginato de calcio menor estabilidad mecánica, lo cual fue evidenciado por el hinchamiento de las esferas debido a la introducción de líquido, permitiendo así la liberación de AQS y *G. sulfurreducens*. En el alginato de bario se pudo observar una mejor inmovilización, lo cual hizo más lenta la biotransformación que en alginato de calcio, pero con menor hinchamiento y mayor tiempo de duración de las esferas. Hay que tomar en cuenta que el pH y los componentes del medio al que se expusieron las esferas causaron también esta alteración de la estructura en la superficie, ya que al momento de hacer el lavado se pudo observar turbidez antes mencionada.

La biotransformación de 4-NF con las esferas que contenían AQS y *G. sulfurreducens* en alginato de calcio fue efectiva para las concentraciones de 50 y 100 mg/L, con valores de 100 y 70% a las 33 y 50 h respectivamente. En el control sin AQS y con una concentración de 100 mg/L de 4-NF, se observó una disminución del contaminante, lo cual puede ser atribuido a un proceso de absorción. La concentración de 200 mg/L fue biotransformada en un 35% y la de 400 mg/L fue del 15% a las 50 h.

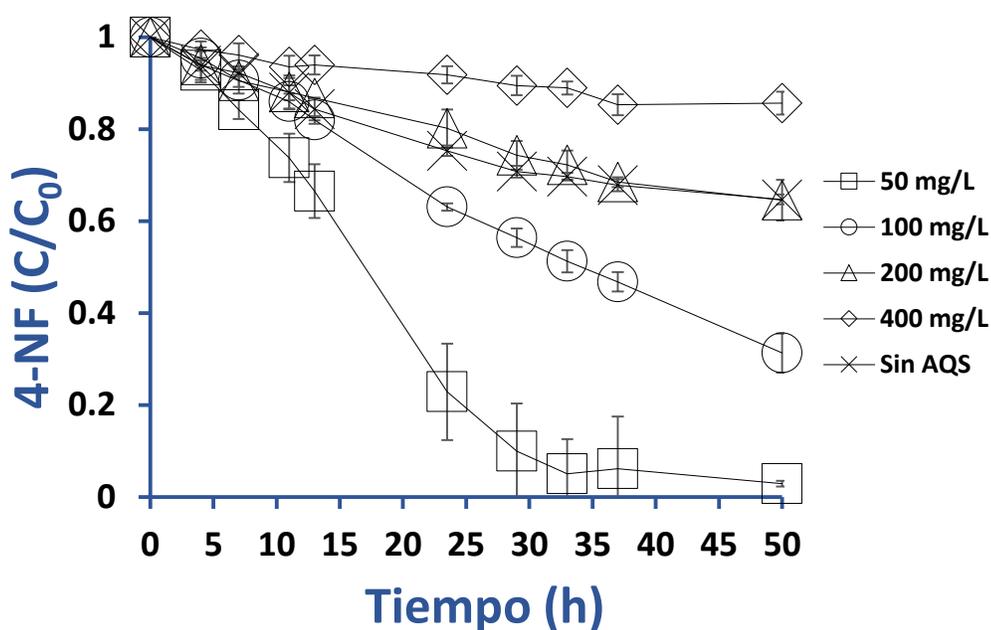


Figura 18. Cinética de biotransformación de 4-NF (50-400 mg/L) con AQS 5 g/L y *G. sulfurreducens* inmovilizadas en alginato de calcio, pH 8.4-8.6.

En el caso de las esferas con el gel de alginato de bario, hubo un comportamiento similar, solo que en esta ocasión tardó más la biotransformación. Como ya se mencionó antes, esto puede deberse a que hubo una mejor inmovilización y mayor estabilidad mecánica del material. Los resultados indican que se alcanzó el 100 y 60% de reducción en las cinéticas con 50 y 100 mg/L del 4-NF respectivamente a las 48 h de incubación. La reducción en las concentraciones de 400 y 200 mg/L de 4-NF, junto con el control sin AQS (100 mg/L de 4-NF), fue menor al 15%.

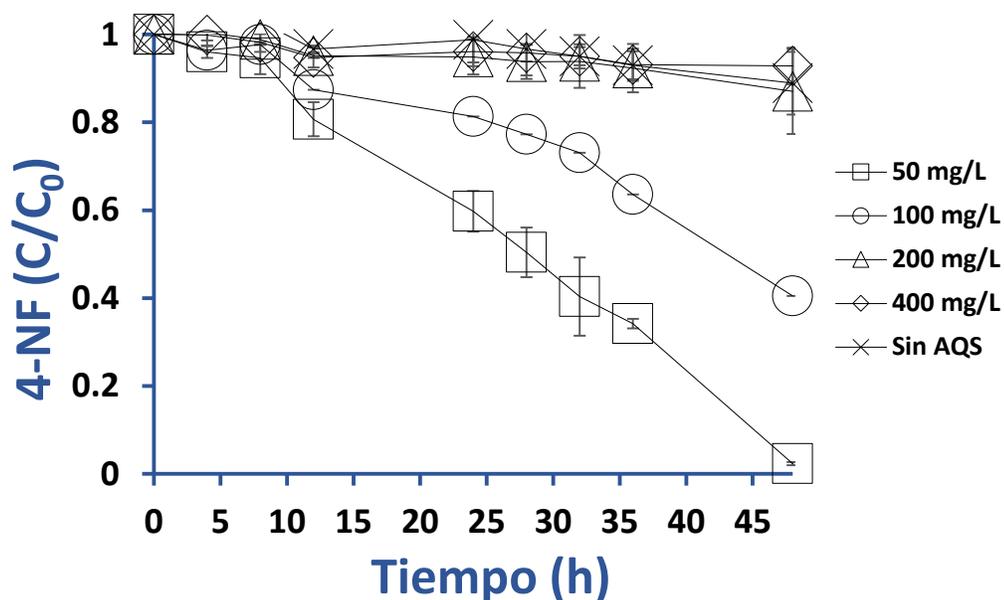


Figura 19. Cinética de biotransformación de 4-NF (50-400 mg/L) con AQS 5 g/L y *G. sulfurreducens* inmovilizadas en alginato de bario, pH 8.4-8.6.

La capacidad catalítica de AQS al estar en dos diferentes geles de alginato se vio alterada por la inestabilidad mecánica de las esferas. En la concentración de 100 mg/L de 4-NF la k_d se vio incrementada 2.03 y 8.45 veces para el alginato de calcio y el alginato de bario respectivamente en comparación con los controles sin MR. Se han realizado estudios en donde se utilizó AQS inmovilizada en espuma de poliuretano y se observó una efectividad de 95.6% para reducir nitrobenceno con *Shewanella*, y que se aumentó hasta 5 veces la constante de velocidad en comparación de los cultivos que no tenían MR (Wang et al., 2013).

Tabla 8. Tasa de biotransformación de 4-NF (50-400 mg/L) con AQS y *G. sulfurreducens* inmovilizadas en alginato de calcio y de bario.

Concentración de 4-NF (mg/L)	K_d (h^{-1})		Incremento
	Alginato de calcio	Alginato de bario	
50	0.0741	0.0244	
100	0.0210	0.0093	2.03 y 8.45
200	0.0096	0.0022	
400	0.0037	0.0018	
Sin AQS	0.0103	0.0011	

Cuando el pH del medio fue modificado se pudo ver una variación en la biotransformación con las esferas de alginato de calcio. Teniendo como resultado que a pH de 9 y 8 las biotransformaciones fueron alrededor del 70% a las 48 h mientras que a pH 7 fue del 60%. En el caso de los pH de 6 y 5 fueron menores al 30%.

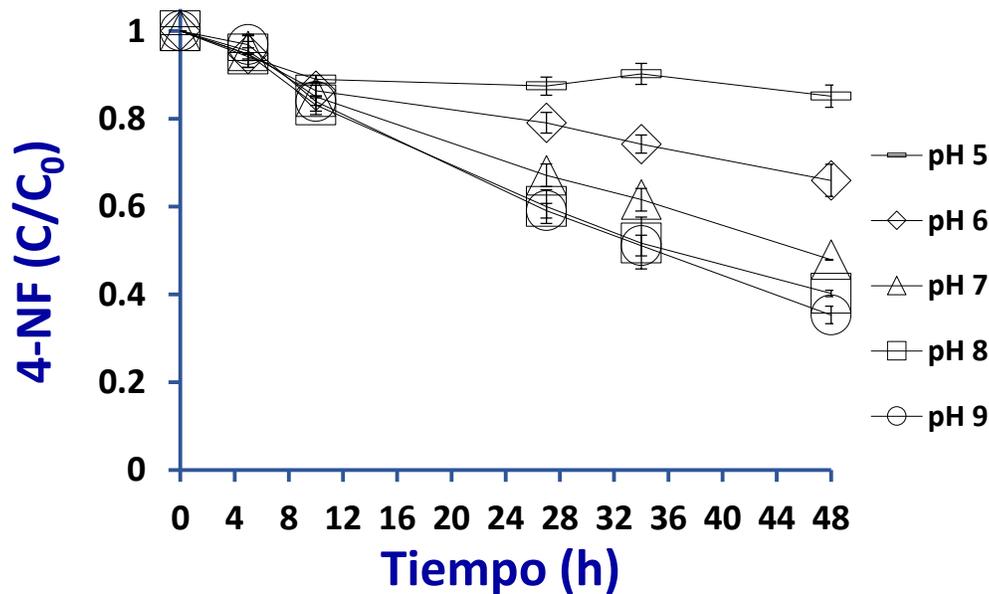


Figura 20. Cinética de biotransformación de 4-NF (100 mg/L) con AQS 5 g/L y *G. sulfurreducens* inmovilizadas en alginato de calcio a diferente pH.

El alginato de bario provee una mejor protección a la bacteria y la biotransformación se vio favorecida a pH de 7, 8 y 9 (> 90 %). A pH de 6 y 5 fue de 62% y 47% respectivamente.

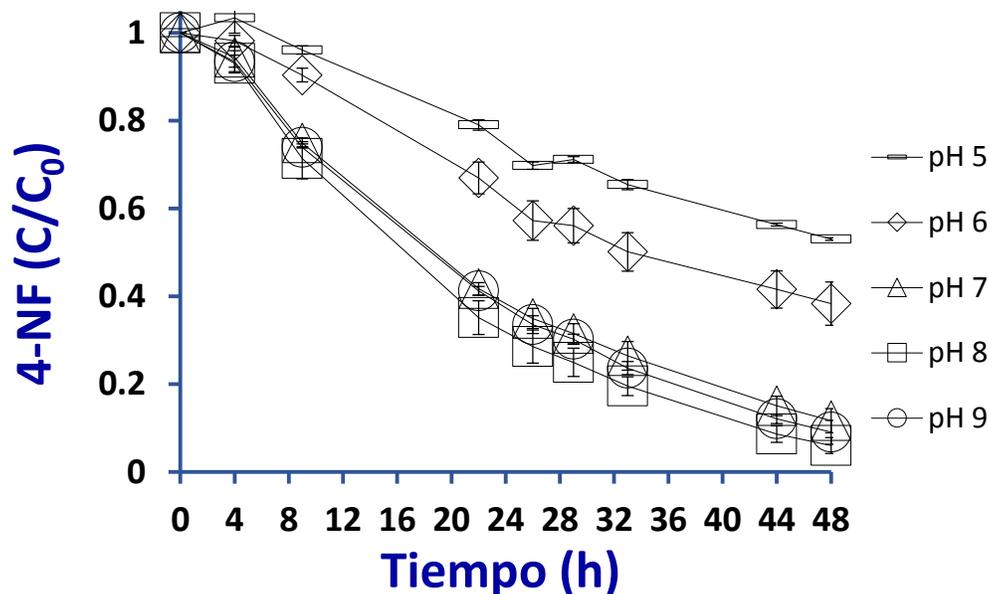


Figura 21. Cinética de biotransformación de 4-NF (100 mg/L) con AQS 5 g/L y *G. sulfurreducens* inmovilizadas en alginato de bario a diferente pH.

La capacidad catalítica en alginato de calcio para los diferentes pH se documentó de la siguiente manera. Se presentó un incremento en el pH 9 de 1.21, 1.08, 1.90 y 3.88 en comparación con los pH de 8, 7, 6 y 5 respectivamente. Con alginato de bario a pH 8 se incrementó 1.15, 1.26, 2.66 y 4.19 con respecto a los pH de 9, 7, 6 y 5 respectivamente. Dentro de los mejores pH de cada gel el de bario fue mayor 5.27 veces que el de calcio. La capacidad catalítica en ambos geles es hasta 5 veces mayor en pH básicos (pH 8 o 9) que en ácido (pH 5).

Tabla 9. Tasa de biotransformación de 4-NF (100 mg/L) con AQS y *G. sulfurreducens* inmovilizadas en alginato de calcio y de bario.

pH	K_d (h^{-1})	
	Alginato de calcio	Alginato de bario
5	0.0026	0.0127
6	0.0053	0.0200
7	0.0093	0.0421
8	0.0083	0.0532
9	0.0101	0.0459

Tabla 10. Tabla comparativa del porcentaje de biotransformación de 4-NF (100 mg/L) con AQS y *G. sulfurreducens*.

	Soluble	Inmovilizada	
		Alginato de Calcio 48 h	Alginato de Bario 48 h
Sin AQS (pH 8.4-8.6)	34% (48h)	35%	12%
AQS y <i>Geo</i> (pH 8.4-8.6)	66% (12h)	69%	60%
pH 5	44% (20h)	15%	47%
pH 6	59% (20h)	34%	62%
pH 7	77% (20h)	52%	89%
pH 8	82% (20h)	60%	94%
pH 9	87% (20h)	65%	91%

Aunque los porcentajes de efectividad se reflejaron mayores cuando se utilizaron esferas de alginato de calcio, también se debe considerar el hecho de que las esferas al estar en contacto con el medio presentaron deterioro lo que puede hacer que se esté llevando a cabo una biotransformación de forma soluble. Al centrifugar la muestra se pudo observar una mayor formación de precipitado con las esferas de alginato de calcio (Figura 22).

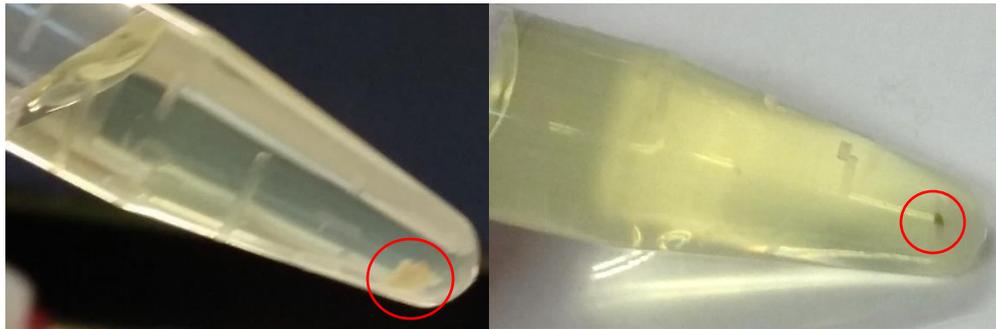


Figura 22. Precipitado. A) Alginato de calcio. B) Alginato de bario.

En la figura 23 se puede observar el comportamiento de las esferas en los ciclos de biotransformación, se encontró que las esferas con alginato de bario tenían una mayor resistencia, logrando completar cinco ciclos de 48 h con efectividad que oscila entre 40 y 60% de biotransformación después del primer ciclo (85%). Las esferas con alginato de calcio presentaron una duración de dos ciclos, pero se observó una similitud en la biotransformación con respecto a las de esferas bario. Al momento de la toma de muestra se observó que no presentaron ruptura las esferas (Figura 24).

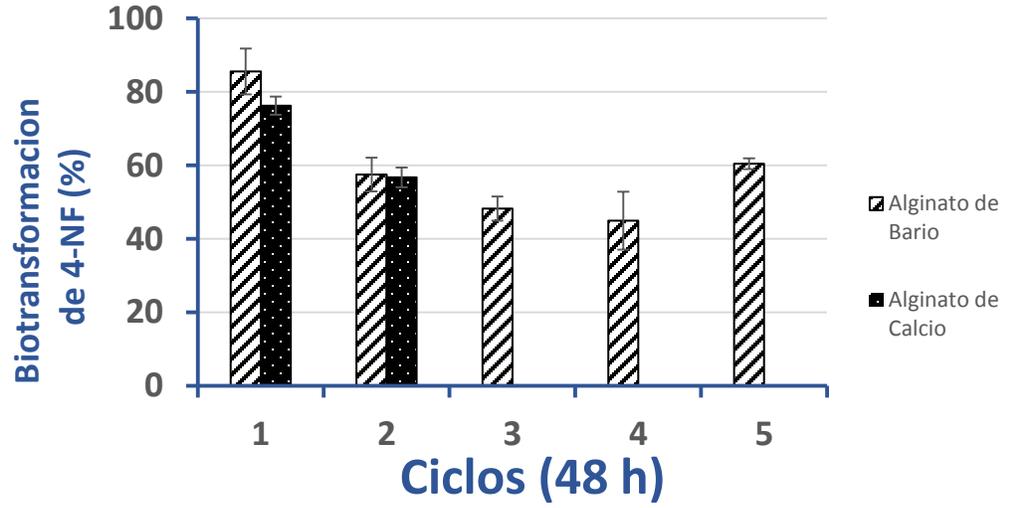


Figura 23. Ciclos de biotransformación de 4-NF (100 mg/L) y AQS inmovilizadas en alginato calcio y de bario.

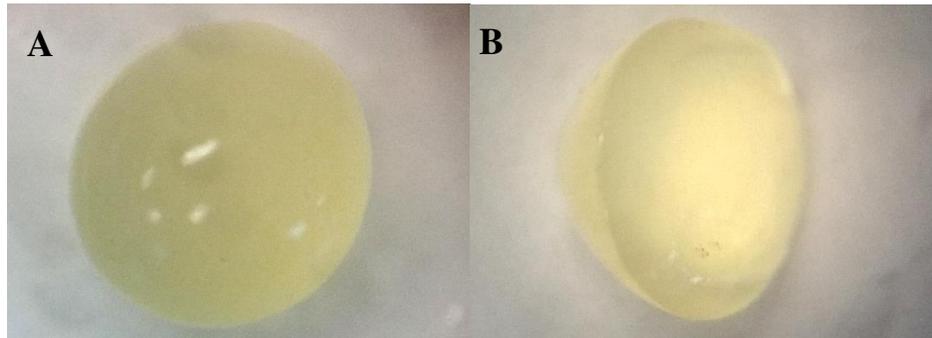


Figura 24. Esferas de alginato de calcio. A) Esfera en buena condición. B) Esfera con ruptura a la mitad.

8. CONCLUSIONES

Se prepararon geles con 3% de alginato de sodio y 0.2 M de solución gelificante (cloruro de calcio o de bario) que contenían AQS y *G. sulfurreducens*, obteniendo esferas de 2.5 mm, las esferas de alginato de calcio presentaron un hinchamiento (3 mm) al estar en contacto con el medio debido al pH. Por medio de espectroscopia IR se pudo comprobar la presencia de AQS en las esferas, presentando mayor intensidad en las bandas de unión a grupo sulfonato. Se pudo determinar que las esferas de alginato de bario tienen mayor resistencia durando 5 ciclos de biotransformación con efectividad entre 45-80% en comparación con las de alginato de calcio (2 ciclos y efectividad de 55-75%).

En este estudio se comprobó que la biotransformación de 4-NF con *G. sulfurreducens* se vio mejorada al adicionar AQS en comparación con los controles que no tenían MR.

Las concentraciones de 400 y 200 mg/L de 4-NF causan efectos inhibitorios en *G. sulfurreducens* tanto de manera soluble como inmovilizada con biotransformaciones menores al 40%.

Se evaluó la capacidad catalítica de AQS soluble (0.2 mM) al comparar las tasa de biotransformación de 4-NF (100 mg/L), en donde se observó que el incremento fue de 9.43 veces comparado con el control sin MR con una efectividad de 80% a las 14 h. Al aumentar la concentración de AQS la tasa de reducción también se incrementó. Por otro lado, al modificar el pH del medio se observó que bajo condiciones alcalinas (pH 8 y 9) aumenta la capacidad catalítica de AQS, presentando mayores tasas de biotransformación con valores de 0.0743 y 0.0857 h⁻¹ respectivamente.

La capacidad catalítica de AQS inmovilizada (0.767 mM) en alginato de bario presento un incremento de 4.41 en comparación con el control que no tenía MR para la biotransformación de 100 mg/L de 4-NF.

Se evaluó la capacidad catalítica de AQS inmovilizada (0.767 mM) con *G. sulfurreducens* simultáneamente en alginato de calcio y de bario en donde se observaron incrementos de 2.03 y 8.45 veces respectivamente en comparación con los controles sin MR en la biotransformación de 100 mg/L de 4-NF.

Se evaluaron las tasas de biotransformación de AQS inmovilizada (0.767 mM) con *G. sulfurreducens* simultáneamente en alginato de calcio, se observó que a pH de 7 y 9 existe una mayor capacidad catalítica de AQS en la biotransformación de 4-NF (100 mg/L), presentando tasas de 0.0093 y 0.0101 h⁻¹ respectivamente y en alginato de bario fueron de 0.0532 y 0.0459 h⁻¹ a pH 8 y 9 respectivamente.

De acuerdo a los resultados obtenidos este proceso puede ser empleado para el tratamiento de aguas residuales que contengan 4-NF, se puede utilizar la inmovilización en esferas de alginato de bario, en las cuales se encuentren tanto la bacteria como la AQS inmovilizadas en una cantidad aproximada de 2,000 esferas /L para tener buena eficiencia al biotransformar 100 mg/L de 4-NF. Se debe considerar que para no causar efectos inhibitorios en la bacteria *G. sulfurreducens* la concentración de 4-NF no debe ser mayor de 200 mg/L. El pH se podría ajustar a que oscilara entre 8 y 9, para tener una mayor efectividad en la biotransformación.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Avendaño-Romero G C, López-Malo A, Palou E: **Propiedades del alginato y aplicaciones en alimentos.** *Temas Selectos de Ingeniería alimentos* 2013, **7**: 87-96.

Bajpai S K, Sharma S: **Investigation of swelling/degradation behaviour of alginate beads crosslinked with Ca²⁺ and Ba²⁺ ions.** *Reactive & Functional Polymers* 2004, **59**: 129–140.

Bhushan B, Chauhan A, Samanta S K, Jain R K: **Kinetics of biodegradation of p-nitrophenol by different bacteria.** *Biochem Biophys Res Comm* 2000, **274**: 626-630.

Brock, T. D. & Madigan, M. T. **Biology of Microorganisms** 6th ed (1991) Prentice Hall, New Jersey.

Caccavo F, Lonergan D, Loveley D, Davis M, Stolz J, McInerney M: **Geobacter sulfurreducens sp. nov., a Hydrogen- and Acetate-Oxidizing Dissimilatory Metal Reducing Microorganism,** *Appl Environ Microbiol* 1994, **60**: 3752-3759.

Camargo J, Alonso A: **Contaminación por nitrógeno inorgánico en los ecosistemas acuáticos: problemas medioambientales, criterios de calidad del agua, e implicaciones del cambio climático.** *Rev Ecosistemas* 2007, **16(2)**: 98-110.

Cervantes FJ, 2002. **Quinones as electron acceptors and redox mediators for the anaerobic biotransformation of priority pollutants.** Ph.D. Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.

Chauhan A, Chakraborti A K, Jain R K: **Kinetics of biodegradation of p-nitrophenol by different bacteria.** *Biochem. Biophys. Res Commu* 2000, **270**:

733-740.

Cheetham P, Blunt K, Bucke C: **Physical Studies on Cell Immobilization Using Calcium Alginate Gels.** *Biotechnol and Bioeng* 1979, **21**: 2155-2168.

Dai R, Chen X, Ma C, Xiang X, Li G: **Insoluble/immobilized redox mediators for catalyzing anaerobic bio-reduction of contaminants.** *Rev Environ Sci Biotechnol* 2016, **15**: 379–409.

Dickel O, Knackmuss H J: **Catabolism of 1,3–dinitrobenzene by Rhodococcus sp. QT–1.** *Arch Microbiol* 1991, **157**: 76-79.

Donlon B A, Razo-Flores E, Lettinga G, Field J A: **Continuous detoxification, transformation, and degradation of nitrophenols in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors.** *Biotechnol Bioeng* 1996, **51**: 439-449.

Doong R, Lee C, Lien C: **Enhanced dechlorination of carbon tetrachloride by Geobacter sulfurreducens in the presence of naturally occurring quinones and ferrihydrite.** *Chemosphere* 2014, **97**: 54-63.

Dos Santos A B, Bisschops I A E, Cervantes F J, Van Lier J B: **Effect of different redox mediators during thermophilic azo dye reduction by anaerobic granular sludge and comparative study between mesophilic (30 °C) and thermophilic (55 °C) treatments for decolourisation of textile wastewaters.** *Chemosphere* 2004, **55**: 1149-1157.

Ebert S, Rieger P G, Knackmuss H J: **Function of coenzyme F420 in aerobic catabolism of 2,4,6–trinitrophenol and 2,4– dinitrophenol by Nocardioides simplex FJ2–1A.** *J Bacteriol* 1999, **181**: 2669-2674.

Field J, Stams A, Kato M, Schraa G. **Enhanced biodegradation of aromatic pollutants in cocultures of anaerobic and aerobic bacterial consortia.** *Anton*

Leeuw Int J G 1995; **67**: 47-77.

Field J, Cervantes F: **Microbial redox reactions mediated by humus and structurally related quinones.** In: Perminova IV, Hatfield K, Hertkorn N, editors. **Use of humic substances to remediate polluted environments: from theory to practice**, Springer 2005, **52**: 343-52.

Garzón C: **Inmovilización Microbiana: Técnicas y usos en el tratamiento de residuos tóxicos.** *Rev Sist Amb* 2008, **2(1)**: 23-34.

Gennis R, Stewart V: **Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology.** *Neidhardt* 1996, **1**: 217-261.

Gorontzy T, Küver J, Karl-Heinz B: **Microbial transformation of nitroaromatic compounds under anaerobic conditions.** *J Gene Microbiol* 1993, **139**: 1331-1336.

Grant G T, Morris E R, Rees D A, Smith P J, Thom D: **Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model.** *FEBS* 1973, **32**: 195-198.

Guo J, Zhou J, Wang D, Tian C, Wang P, Uddin M, Yu H: **Biocatalyst effects of immobilized anthraquinone on the anaerobic reduction of azo dyes by the salt-tolerant bacteria,** *Water Res* 2007, **41**: 426-432.

Guo J, Kang L, Yang J, Wang X, Lian J, Li H, Guo Y, Wang Y: **Study on a novel non-dissolved redox mediator catalyzing biological denitrification (RMBDN) technology.** *Bior tech* 2010, **101**: 4238-4241.

Hernández E M, López G Y R, García P A: **Evaluación de derivados carboximetilados del alginato de sodio como superabsorbente.** *Rev Cub Quím* 2005, **17**: 239-240.

Hernández V, Alvarez L H, Montes M A, Cervantes F J: **Reduction of quinone and non-quinone redox functional groups in different humic acid samples by *Geobacter sulfurreducens***. *Geoderma* 2012, **183**: 25-31.

Howard P: **Handbook of environmental fate and exposure data for organic chemical. Volume I Large production and priority pollutants**. (1989). Lewis Publishers, Chelsea, Michigan, USA.

Kadiyala V, Smets B F, Chandran K, Spain J C: **High affinity p-nitrophenol oxidation by *Bacillus sphaericus* JS905**. *Microbiol Lett* 1998, **166**: 115-120.

Karim K, Gupta S K: **Biotransformation of nitrophenols in upflow anaerobic sludge blanket reactors**. *Bioresource Technology* 2001, **80**: 179-186.

Khursheed K, Gupta S KK: **Biotransformation of nitrophenols in upflow anaerobic sludge blanket reactors**. *Bioresource Technol* 2001, **80**: 179-186.

Krick E: **Aromatic amines and related compounds as carcinogenic hazards to man**. In Environmental carcinogénesis. *Elsevier* 1979, pp 143-164.

Lenke H, Pieper D H, Bruhn C, Knackmuss H J: **Degradation of 2,4-dinitrophenol by two *Rhodococcus erythropolis* strains, HL 24-1 and HL 24-2**. *App Environ Microbiol* 1992, **58**: 2928-2932.

Lovley D: **Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction**. *Microbiol* 1991 **55**: 259-287.

Lovley D, Coates J, Blunt-Harris E, Phillips E, Woodward J: **Humic substances as electron acceptors for microbial respiration**. *Nature* 1996, **382**: 445-448.

Luan F, Burgos W, Xie L, Zhou Q: **Bioreduction of Nitrobenzene, Natural Organic Matter, and Hematite by *Shewanella putrefaciens* CN32**. *Environ Sci Technol* 2010, **44**: 184-190.

Mørch Y A, Donati I, Strand B L, Skjåk-Bræk G: **Effect of Ca²⁺, Ba²⁺, and Sr²⁺ on Alginate Microbeads.** *Biomacromolecules* 2006, **7**: 1471-1480.

"Salud ambiental, agua para uso y consumo humano-límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización"
Norma Oficial Mexicana **NOM-127-SSA1-1994**. Diario oficial de la federación, 30 noviembre 1995.

Nishino SF, Spain JC, He Z: **Strategies for aerobic degradation of nitroaromatic compounds by bacteria: process discovery to field application.** *Press* 2000, pp 7-61.

Peretz S: **Interaction of alginate with metal ions, cationic surfactants and cationic dyes.** *Rom Journ Phys* 2004, **49**: 857–865.

Pinotti M, 2007. **Estudos termoanalíticos do ácido algínico e dos alginatos de metais alcalinos, alcalinoterrosos, amônio, mono-, di- e trietanolamônio.**

M.C. Instituto de Química de São Carlos, Universidad de São Paulo, Brasil.

Purwadi R. 2006. **Continuous ethanol production from dilute-acid hydrolyzates: detoxification and fermentation strategy.** Tesis de doctorado en philosophy. Göteborg, Suecia. Universidad Chalmers de Tecnología, Departamento de Biología e Ingeniería Química.

Ramos K, Sarrin B, Jimenez Y: **Degradation a mixture of ortho and para-nitrophenol by heterogeneous photo-Fenton with MgFeAl-mixed oxide as catalyst.** *Rev Ingeniería UC* 2015, **22(2)**: 37-45.

Roldán M D, Blasco R, Caballero F J, Castillo F: **Degradation of p-nitrophenol by the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*.** *Arch Microbiol* 1998, **169**: 36-42.

Roldán M D, Pérez–Reinado E, Castillo F, Moreno–Vivián C: **Reduction of polynitroaromatic compounds: the bacterial nitroreductases.** *Microbiol* 2008, **32**: 474-500.

Romero A, Tzompantzi F: **Reducción fotocatalítica del 4-nitrofenol y naranja de metilo, usando CdS bajo luz azul.** (2012) Universidad Autónoma Metropolitana, Mexico D.F.

She Z, Gao M, Jin C, Chen Y, Yu J: **Toxicity and biodegradation of 2,4-dinitrophenol and 3-nitrophenol in anaerobic systems.** *Proc bio* 2005, **40**: 3017-3024.

Su Y, Zhang Y, Wang J, Zhou J, Lu X, Lu H: **Enhanced bio-decolorization of azo dyes by co-immobilized quinone-reducing consortium and anthraquinone.** *Bioresour Technol* 2009, **100**: 2982–2987.

Suja E, Nancharaiah Y V, Venugopalan V P: **Biogenic nanopalladium production by selfimmobilized granular biomass: Application for contaminant remediation.** *Water Res* 2014, **65**: 395-401.

Van der Zee F P, Bisschops I A E, Lettinga G, Field J.A: **Activated carbon as an electron acceptor and redox mediator during the anaerobic biotransformation of azo dyes.** *Environ Sci Technol* 2003, **37**: 402-408.

Van der Zee F, Cervantes F: **Impact and application of electron shuttles on the redox (bio)transformation of contaminants: A review.** *Biotech adv* 2009, **27**: 256-277.

Velings N M, Mestdagh M M: **Physico-Chemical Properties of Alginate Gel Beads.** *Polim Gels Networks* 1995, **3**: 311–330.

Uberoi V, Bhattacharya S K: **Toxicity and degradability of nitrophenols in**

anaerobic systems. *Water Environ Res* 1997, **69(2)**:146.

US-EPA **Ambient water quality for nitrophenols** US Environmental Protection Agency 1980, Report EPA 44/5-80-063.

Wang J, Lu H, Zhou Y, Song Y, Liu G, Feng Y: **Enhanced biotransformation of nitrobenzene by the synergies of Shewanella species and mediator-functionalized polyurethane foam.** *J Hazard Mater* 2013, **252**: 227-232.

Wang W, Feng Y, Tang X, Li H, Du Z, Yi A, Zhang X: **Enhanced U (VI) bioreduction by alginate-immobilized uranium-reducing bacteria in the presence of carbon nanotubes and anthraquinone-2,6-disulfonate.** *J Environ Sci* 2015, **31**: 68-73.

Zablotowicz R M, Leung K T, Alber T, Cassidy M B, Trevors J T, Lee H, Veldhuis L, Hall J C: **Degradation of 2,4-dinitrophenol and selected nitroaromatic compounds by Sphingomonas sp. UG30.** *Can J Microbiol* 1999, **45**: 840-848.

Zhang L, Jiang X, Shen J, Xu K, Li J, Sun X, Han W, Wang L: **Enhanced bioelectrochemical reduction of p-nitrophenols in the cathode of self-driven microbial fuel cells.** *RSC Adv.* 2016, **6**: 29072–29079.

Zeyer J, Kocher H P, Timmis K N: **Influence of para- substituents on the oxidative metabolism of o-nitrophenols by Pseudomonas putida B2.** *Appl Environ. Microbiol* 1986, **52**: 334–339.