
Evaluación de la aplicación de cosustratos en la eliminación de aminas aromáticas en un proceso anaerobio desnitrificante

E. R. Meza Escalante^{1*}, R. G. Ulloa Mercado², D. Serrano Palacios¹, A. M. Rentería Mexía², L. A. Leyva Soto², L. M. Díaz Tenorio², P. Gortáres Moroyqui²

¹Departamento de Ciencias del Agua y Medio Ambiente. ²Departamento de Biotecnología y Ciencias Alimentarias. Instituto Tecnológico de Sonora, 5 de Febrero 818 Sur, Colonia Centro CP 85000, Ciudad Obregón Sonora México.

Evaluation of the application of co-substrates in the elimination of aromatic amines in a denitrifying anaerobic process.

Abstract

Different industries such as textile, paper, cosmetics, and pharmaceutical are a sector that produces a large amount of wastewater, which are discharged into the aquifers, rivers, and lakes, without giving them a conventional treatment, which generates great pollution problems. Some studies have shown that degrading the allura red azo dye results in the breaking of the azo bond, causing the activation of aromatic amines like as aniline and *p*-cresidine, which are a problem for the public and environmental sectors. The objective of this project was to evaluate the elimination (as well as the effect of a co-substrate) under denitrifying conditions of the aromatic aniline and *p*-cresidine amines. Initially, the behavior of the aromatic amines aniline and *p*-cresidine was studied separately, and then in a mixture at a concentration of 50 mg/L, having an unfavorable result for aniline, therefore the study with *p*-cresidine was continued, since this amine had a removal percentage of $40.5 \pm 2.1\%$. Kinetics were performed for a period of 216 hours each, separately, to evaluate the effect of sodium acetate and methanol as co-substrates at a concentration of 50 mg/L. The percentages of *p*-cresidine removal were $22.7 \pm 1.01\%$ using methanol and $22.8 \pm 1.43\%$ with sodium acetate, showing that the co-substrate did not contribute to the oxidation process of the amine; instead, a favorable effect was observed in the elimination of nitrate, since the elimination percentages reached up to $56 \pm 1.4\%$ in the presence of acetate, and $80 \pm 0.39\%$ with methanol.

Key words: anaerobic process, aromatic amines, cosubstrates, denitrification..

Resumen

Diferentes industrias como textil, papelera, cosmética y farmacéutica son un sector público que producen una gran cantidad de aguas residuales, las cuales son vertidas a los mantos acuíferos, ríos y lagos, sin darles un tratamiento conveniente, lo cual genera grandes problemas de contaminación. Algunos estudios han demostrado que al degradar el colorante rojo allura se ocasiona el rompimiento del enlace azo, provocando la activación de aminas aromáticas como anilina y *p*-cresidina siendo éstas una problemática hacia el sector público y ambiental. El objetivo de este proyecto fue evaluar el efecto de cosustratos, en condiciones desnitrificantes, en la eliminación de las aminas aromáticas anilina y *p*-cresidina. Inicialmente se estudió el comportamiento de las aminas aromáticas anilina y *p*-cresidina por separado, y después en mezcla a una concentración de 50 mg/l, obteniendo un porcentaje de remoción $40.5 \pm 2.1\%$ para la *p*-cresidina, continuando el resto del estudio con esta amina ya que no se presentó una eliminación favorable para anilina. Se realizaron cinéticas por un periodo de 216 horas cada una, por separado, para evaluar el efecto del acetato de

*Autor de correspondencia
Email: edna.meza@itson.edu.mx
ISSN 2594-0384 (Electrónica)

sodio y metanol como cosustratos a una concentración de 50 mg/l. Los porcentajes de remoción de *p*-cresidina fueron de $22.7 \pm 1.01\%$ utilizando metanol y $22.8 \pm 1.43\%$ con acetato de sodio, mostrando que el cosustrato no contribuyó al proceso de oxidación de la amina; en cambio, se observa un efecto favorable en la eliminación de nitrato, ya que los porcentajes de eliminación llegaron hasta un $56 \pm 1.4\%$ en presencia de acetato y $80 \pm 0.39\%$ con metanol.

Palabras claves: proceso anaerobio, aminas aromáticas, cosubstratos, desnitrificación.

Introducción

En México el problema de la contaminación del agua es cada día más preocupante ya que el continuo crecimiento de la población, así como el desarrollo industrial, agrícola y comercial, demandan cada vez mayor cantidad de agua, lo que ha provocado una sobreexplotación del recurso y la generación de agua residual, así como su vertido a los cuerpos de agua, provoca una mayor afectación del ecosistema lo que agrava el problema (Piña, 2007). Por otro, lado el desperdicio y manejo inadecuado del agua por parte de los usuarios son factores de impacto que contribuyen a la escasez cada vez más marcada del agua en el país.

La industria textil es un sector productivo que demanda una gran cantidad de agua en sus procesos y los principales compuestos que utiliza en el teñido de telas son los colorantes azo. Debido a que muchos de estos colorantes tienen un grado de fijación muy bajo en las telas, una cantidad importante termina en las aguas residuales generadas por este tipo de empresas. Con el aumento en la demanda de productos textiles, esta industria ha incrementado los volúmenes de descargas de aguas residuales, siendo este uno de los principales problemas de contaminación en el mundo (Cervantes, 2008).

Los colorantes sintéticos son compuestos orgánicos altamente solubles en agua, y se utilizan en el teñido principalmente de textiles y alimentos. La mayor parte de estos compuestos tiene como característica un doble enlace nitrógeno-nitrógeno (N=N). La generación de efluentes que contiene este colorante, constituyen uno de los mayores problemas de contaminación ya que durante el proceso de teñido de un 15 - 50% del colorante utilizado queda remanente y se vierte como agua residual sobre los cuerpos de agua (Ríos *et al.*, 2013).

Las descargas de colorantes en el medio ambiente deben evitarse no sólo por razones estéticas, sino también porque el colorante azo y los productos

derivados del rompimiento del enlace azo son tóxicos a la vida acuática y mutagénicos a los humanos (Weisburger, 2002). Al eliminar el colorante de las aguas residuales, se rompen enlaces tipo azo que trae como consecuencia la generación de las aminas aromáticas.

Los colorantes tienden a tener una gran persistencia en el medio ambiente, ya que generalmente se elaboran para tener una estabilidad química y fotolítica (Van der Zee *et al.*, 2003). Al momento de tratar el colorante con los procesos anaerobios, se activan aminas aromáticas ya mencionadas anteriormente, trayendo grandes consecuencias negativas, ya que su eliminación bajo estas condiciones es muy lenta, requiriendo además de procesos aerobios para completar su oxidación.

Las aminas son derivados orgánicos del amoniaco con uno o más grupos alquilo o arilo enlazados al átomo de nitrógeno (Wade, 2011). Una de las características importante de las aminas aromáticas es su potencial de toxicidad, ya que poseen una cierta actividad cancerígena. En general, todas las aminas son consideradas muy tóxicas por ingestión, inhalación y absorción dérmica (Garrigós, 2003).

Las aminas aromáticas son derivados de los hidrocarburos aromáticos, como el benceno, tolueno, naftaleno, antraceno y difenilo, por sustitución del grupo amino, estas constituyen un gran grupo de compuestos de interés técnico y comercial. A partir de estas se pueden obtener gran diversidad de colorantes, tras la degradación de estos colorantes aparecen las aminas aromáticas. No obstante también se utilizan para la producción de fármacos, herbicidas, insecticidas y demás sustancias químicas.

Las aminas aromáticas producto de la degradación del rojo allura pueden ser diversas debido a la complejidad del colorante. También es posible que se encuentren a niveles traza en muestras de colorante, como en el estudio realizado por Richfield-Fratz *et al.* (1989) en el que se extrae por solventes el rojo allura de una solución acuosa, y a

su vez las aminas libres fueron trasferidas a una solución ácida, para posteriormente caracterizarse por cromatografía líquida de alto desempeño encontrando en lotes comerciales de rojo 40, trazas de 4-nitro-*p*-cresidina, *p*-cresidina y la anilina. Tales aminas fueron también identificadas por Lancaster y Lawrence (1991), lo cual nos sugiere la presencia de estos compuestos en los efluentes con altas concentraciones de rojo allura, después de la reducción del colorante. Debido a esto, es necesaria la búsqueda de procesos para la eliminación eficiente de las aminas aromáticas y además requieran de menores costos de operación que los procesos aerobios utilizados convencionalmente después de la reducción del colorante para la eliminación de las aminas, podría continuarse con la aplicación de un proceso anaerobio, aprovechando otras estrategias que mejoren estos procesos como el uso de cosustratos que se ha implementado anteriormente con estos compuestos (Haug *et al.*, 1991; Razo-Flores *et al.*, 1997).

El proceso biológico de desnitrificación consiste en la transformación de los nitratos a nitrógeno molecular, en ausencia de oxígeno (Arriechi *et al.*, 2011). Se contempla que el proceso de desnitrificación biológica tiene la capacidad de contribuir a la eliminación de las aminas aromáticas; según Meza-Escalante (2011), este proceso es altamente selectivo para la eliminación de nitrato, acoplado a la oxidación de materia orgánica así como algunos compuestos inorgánicos. Se ha demostrado la capacidad de este proceso de eliminar compuestos considerados recalcitrantes como los compuestos fenólicos y tolueno (Martínez *et al.*, 2007, Meza-Escalante *et al.*, 2008)

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la aplicación de un proceso desnitrificante para la eliminación de aminas aromáticas, anilina y *p*-cresidina, así como el efecto de cosustratos, con el fin de complementar la eliminación del colorante rojo allura bajo condiciones anaerobias.

Materiales y métodos

Estabilización de biomasa

Se instaló un reactor UASB de 0.755 l con un Tiempo de Retención Hidráulica (TRH) de 2 días en promedio. El reactor operó bajo condiciones desnitrificantes, utilizando el acetato de sodio como única fuente de carbono y el nitrato de sodio como única fuente de nitrógeno. Se midió la

concentración de biomasa presente en el reactor, como sólidos suspendidos volátiles (SSV), frecuentemente se obtuvo muestra del influente y efluente de reactor para determinar DQO, nitratos (N-NO_3^-) y nitritos (N-NO_2^-) y con ello determinar las condiciones y la eficiencia del proceso biológico.

Cinéticas control

Se realizaron dos experimentos en lote, una cinética abiótica y una cinética con biomasa inerte, con el propósito de identificar la capacidad de los microorganismos de realizar el proceso de oxidación de las aminas aromáticas. Se suministró a cada botella 50 mL de sustrato, 5 mL de anilina y 5ml de *p*-cresidina, a una concentración de 600 mg/l de cada amina con el fin de obtener una concentración dentro de cada botella de 50 mg/l. La diferencia entre las cinéticas fue la presencia de biomasa en una de ellas, la cual se sónico con el fin de romper las paredes de los microorganismos y tener como resultado una biomasa inactiva o muerta. Se realizaron por duplicado y se tomó muestra de cada botella a las 0, 48 y 196 horas para la realización de los análisis correspondientes.

Cinéticas bióticas

Las cinéticas bióticas se realizaron en botellas serológicas de 160 mL, por duplicado. Se utilizó un volumen de 60 mL con una concentración de 50 mg/L de cada amina, inicialmente, se realizaron experimentos con las aminas por separado y posteriormente, con la mezcla de las mismas. A cada botella se le agregó 2 g SSV/L de biomasa ya estabilizada, después se les realizó un purgado con helio con el fin de desplazar el oxígeno y generar una atmósfera anaerobia. Posteriormente, se selló y se volvió a purgar ahora el espacio de cabeza con el mismo fin. Las botellas permanecieron en incubación a temperatura constante de 30 °C y en agitación a 250 rpm para garantizar la homogenización de la fase líquida y el contacto con la biomasa. Se tomaron muestras en los tiempos 0, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 192 y 216 h, para realizar los análisis respectivos.

La cinética biótica con cosustrato consistió en la evaluación de la participación de metanol y acetato de sodio como posibles cosustratos en el proceso desnitrificante para la eliminación de aminas aromáticas. Se realizaron botellas por duplicado, a cada botella se le agregó 45 ml de sustrato, 5 ml de anilina, 5 ml de *p*-cresidina, cada una de las aminas

con una concentración inicial de 50 mg/L y por último se añadió 5 ml de cada sustrato para obtener una concentración de 50 mg/L de metanol y acetato respectivamente, para cada experimento. Se siguió el mismo procedimiento para la cinética biótica, tomándose muestras en diferentes tiempos (0, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 192 y 216 h), para realizar los análisis correspondientes.

Métodos de análisis

El método utilizado para la determinación de DQO es el HACH, la determinación de nitratos se realizó con el método 418-A y los nitritos con el método 419 de los métodos estándar del APHA (2012). La determinación de sólidos suspendidos volátiles se llevó a cabo también con el método estándar (APHA, 2012).

La medición de anilina se realizó mediante un espectrofotómetro Spectroquant Pharo 300 a una longitud de onda de 193 nm, de la misma manera, la *p*-cresidina se midió a una longitud de onda de 202 nm. Para la cuantificación de las aminas aromáticas en mezcla, se desarrolló un método en el HPLC, marca Agilent Technologies 1200-60,90 SERIES con una Columna Bonus RP C18 5 μ M 4.6 x 250 mm y detector de diodos. En la fase móvil se utilizó una mezcla por gradiente de metanol-agua 80-20% por gradiente con un flujo de 0.8 ml/min. La lectura se realizó a una longitud de onda de 235 nm para ambas aminas.

Resultados y discusión

Cinéticas controles

Las cinéticas controles tuvieron una duración de 192 horas. En las pruebas abióticas, no se presentó cambio significativo en las concentraciones de las

aminas en cada cinética con relación al tiempo. La anilina inicialmente tuvo una concentración de 49.95 mg/l y finalizó con 47.71 mg/l con un porcentaje de remoción de $4.5 \pm 0.89\%$. La *p*-cresidina presentó un comportamiento similar teniendo un valor inicial de 41.78 mg/l y final de 38.73 mg/l con un porcentaje de remoción de $7.29 \pm 1.86\%$. Para las cinéticas con biomasa inerte, la anilina presentó solamente un porcentaje de remoción de $5.40 \pm 0.47\%$. Por otra parte, la prueba con *p*-cresidina inició con una concentración de 51.53 mg/l y finalizó con 47.33 mg/l, lo que representaría un porcentaje de remoción de $8.15 \pm 3.7\%$.

Cinética biótica anilina y *p*-cresidina a 50 ppm

En la figura 1a) se observa como la anilina presentó una disminución de la concentración durante las primeras horas de la prueba (12 h) para después permanecer estacionaria, logrando un porcentaje de remoción de $21.3 \pm 0.46\%$, esto podría ser debido a un efecto inhibitorio o tóxico de esta amina para los microorganismos. Por otro lado, se puede observar como hubo una disminución de la concentración de nitrato con un porcentaje de remoción de $52.9 \pm 0.8\%$.

En la figura 2a), se puede ver que la *p*-cresidina logró tener un comportamiento acoplado al compuesto nitrogenado, dando resultados favorables para el consumo de ambos sustratos. Esta amina obtuvo un porcentaje de remoción de 39.0 ± 5.2 y de nitrato $45.2 \pm 4.9\%$. Según Ullmann *et al.* (1992) las bajas eficiencias de remoción obtenidas pueden deberse a la poca degradación en los procesos anaerobios y a la ausencia de estrategias que favorezcan la oxidación de las aminas como la aplicación de mediadores redox.

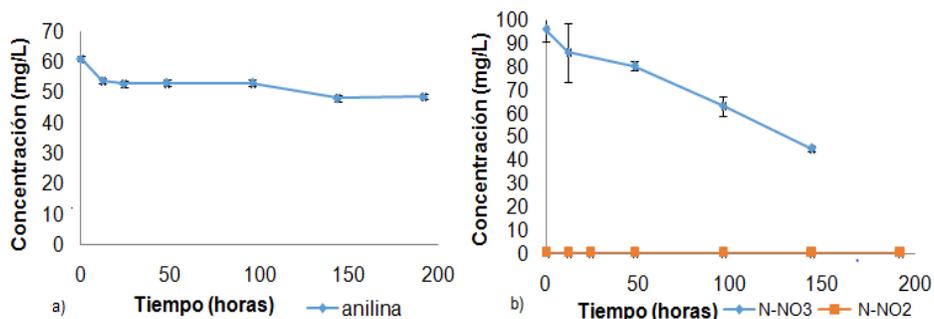


Figura 1. Comportamiento de anilina y compuestos nitrogenados en cinética biótica.

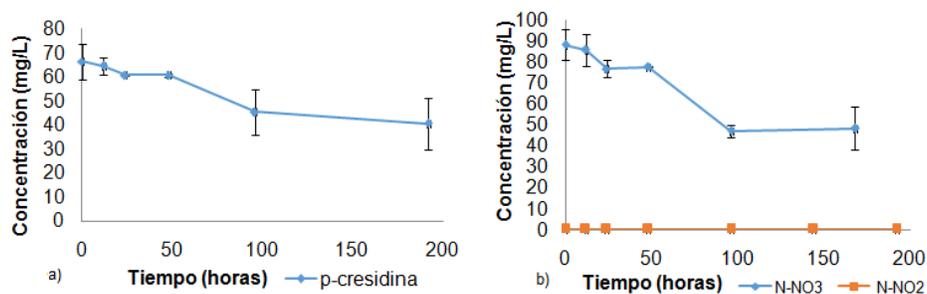


Figura 2. Comportamiento de *p*-cresidina y compuestos nitrogenados en cinética biótica.

Cinética biótica mezcla de aminas

Para la cinética biótica se utilizó una concentración de 50 mg/l de ambas aminas (*p*-cresidina y anilina), se presentó una disminución de la concentración de la *p*-cresidina, al cabo de 216 horas se obtuvo una remoción del $40.5 \pm 2.11\%$, una casi nula remoción de anilina, de la misma manera que en el experimento donde se encontraba como único sustrato orgánico, confirmando que no existe la capacidad por parte de los microorganismos de tomar esta amina como fuente de energía. Con respecto a la reducción del NO_3^- , se observó un proceso acoplado con la oxidación de las aminas, obteniéndose una eficiencia de eliminación de nitrato del $40 \pm 0.5\%$ en presencia de *p*-cresidina (datos no mostrados). Con base en estos resultados, para evaluar el efecto de los cosustratos, se continuó usando solamente *p*-cresidina.

De forma similar, Huerta (2007), realizó un estudio acerca de la biodegradación de una mezcla de aminas aromáticas, obteniendo como resultado que la población bacteriana inmovilizada fue capaz de degradar eficientemente una mezcla de sulfanílico y b-naftol, en cambio, para una concentración de 50 mg/l de sulfanílico y bencensulfonado de sodio, obtuvo un porcentaje de remoción de DQO de 33%, esto indica que el bencensulfato de sodio resultó ser inhibitorio o tóxico para la población bacteriana, lo que hizo que las eficiencias de remoción de esta mezcla fueran bajas.

Cinéticas con cosustrato

Los sustratos evaluados fueron acetato de sodio y metanol, ya que son compuestos de fácil oxidación biológica. En la figura 3 se puede observar el comportamiento de *p*-cresidina utilizando los cosustratos mencionados anteriormente, en ambos

casos se obtuvo el mismo porcentaje de remoción para las aminas con valores promedio del 22%.

Melgoza y Buitrón (2001), estudiaron la influencia del tipo de cosustrato en la fase reductiva del proceso anaerobio/aerobio para la degradación del *p*-nitrofenol, usando acetato de sodio, agua residual y propiónico, obteniendo resultados más favorables en la eficiencia de remoción de *p*-nitrofenol al utilizar el ácido propiónico como cosustrato. Por el contrario, el acetato de sodio no tuvo un impacto favorable en la eliminación de *p*-cresidina en el presente trabajo, como tampoco lo fue el metanol, esto puede deberse a que los cosustratos utilizados están compitiendo con la amina debido a su fácil oxidación en un proceso desnitrificante. En el caso de la eliminación de nitrato, se obtuvo un $80.3 \pm 0.39\%$ reducción del N-NO_3^- con metanol y un $56.6 \pm 1.35\%$ de reducción de N-NO_3^- con acetato. Estos porcentajes de remoción de nitratos son mayores en presencia de cosustrato, esto puede deberse a una mayor concentración de sustrato y el proceso cuenta con una mayor cantidad de sustrato donador de electrones, lo que puede ocasionar el aumento de la eficiencia de reducción del nitrato.

Conclusiones

Al evaluar la eliminación de las aminas aromáticas anilina y *p*-cresidina mediante un proceso desnitrificante, se concluye que este proceso tiene una capacidad media de eliminar la amina *p*-cresidina a 50 ppm, obteniéndose eficiencias de remoción del $39.0 \pm 5.2\%$ y del $40.5 \pm 2.1\%$, estando en mezcla con anilina con 50 ppm de cada amina. En el caso de la anilina, se obtuvo una pobre eliminación al estar por separado ($21.3 \pm 0.46\%$) y no pudo ser eliminada al estar en mezcla con *p*-

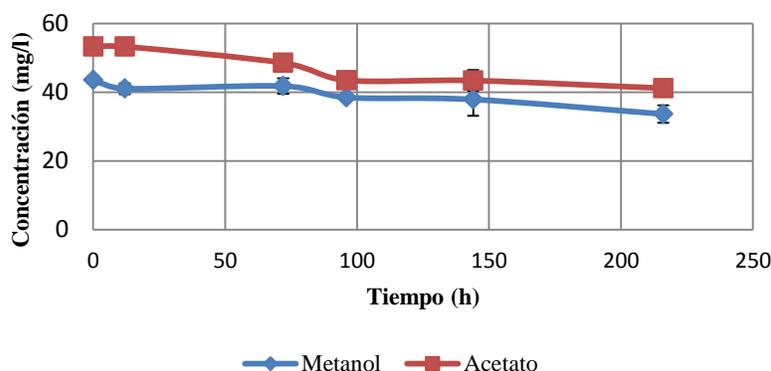


Figura 3. Cinética *p*-cresidina con cosustratos (acetato y metanol).

cresidina, obteniéndose solo una eliminación del $1.6 \pm 0.4605\%$. Al evaluar los distintos cosustratos, para la oxidación de *p*-cresidina, se obtuvo un porcentaje de remoción de $22.7 \pm 1.01\%$ con metanol y un $22.8 \pm 1.4\%$ con acetato, lo que nos indica que el cosustrato no contribuyó a la oxidación de la amina, ya que las eficiencias de consumo se vieron reducidas en un 20% aproximadamente. En cambio, se observa un efecto favorable en la eliminación de nitrato, ya que los porcentajes de eliminación llegaron hasta un $56 \pm 1.4\%$ en presencia de acetato y $80 \pm 0.39\%$ con metanol, lo cual sería de beneficio para la eliminación simultánea de este nutriente.

Referencias

- APHA, (2012). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, twenty-second ed. APHA-AWWA-WEF, Washington, D.C.
- Arriechi, G., Contreras, J., & Marcano, L. (2011). Evaluación del proceso de desnitrificación en el módulo 4 de la planta de tratamiento de aguas residuales La Mariposa 1. *Revista Ingeniería UC*. 18(3): 74-85.
- Cervantes, F. J. (2008). Reducción de colorantes azo por distintos grupos microbianos en consorcios anaerobios. *BioTecnología*. 12(3): 1-15.
- Garrigós, M. D. C. (2003). Desarrollo de métodos analíticos para la determinación de compuestos tóxicos constituyentes de colorantes azo. Tesis Doctoral, Universidad de Alicante, España.
- Haug, W., Schmidt, A., Nörtemann, B., Hempel, D. C., Stolz, A., & Knackmuss, H. J. (1991). Mineralization of the sulfonated azo dye Mordant Yellow 3 by a 6-aminonaphthalene-2-sulfonate-degrading bacterial consortium. *Applied and environmental microbiology*. 57(11): 3144-3149.
- Huerta, M., Salazar, H., Márquez, E., Juárez, C., Santoyo, F., Ruiz, N. y Galíndez, J. (2007). Biodegradación de mezclas de aminas aromáticas por una población bacteriana inmovilizada en piedras de río. Memorias del XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, México.
- Lancaster, F. E., & Lawrence, J. F. (1991). Determination of total non-sulphonated aromatic amines in tartrazine, sunset yellow FCF and allura red by reduction and derivatization followed by high-performance liquid chromatography. *Food Additives & Contaminants*. 8(3): 249-263.
- Martínez, S., Cuervo-López, F. M., & Gomez, J. (2007). Toluene mineralization by denitrification in an up flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. *Bioresource technology*. 98(9): 1717-1723.
- Melgoza, R. M. y Buitrón, G. (2001). Influencia del tipo de cosustrato en la fase reductiva del proceso anaerobio/aerobio para la degradación del *p*-nitrofenol. Memorias del IX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, México.
- Meza-Escalante, E. R., Texier, A. C., Cuervo-López, F., Gómez, J., & Cervantes, F. J. (2008). Inhibition of sulfide on the simultaneous removal of nitrate and *p*-cresol by a denitrifying sludge. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 83(3): 372-377.

- Meza-Escalante, E. R. (2011). La desnitrificación como estrategia a la contaminación generada por aguas residuales compuestas. *Ide@s CONCYTEG*. 6(71): 617-625.
- Piña, S. (2007). Decoloración biológica del colorante azul diecto 2 en un filtro anaerobio/aerobio. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Razo-Flores, E., Donlon, B., Lettinga, G., & Field, J. A. (1997). Biotransformation and biodegradation of N-substituted aromatics in methanogenic granular sludge. *FEMS microbiology reviews*. 20(3-4): 525-538.
- Ríos, N., Carranza, R. J., García, R. C., Blanco, A., García, B., & Mendizábal, E. (2013). Eliminación de colorantes de disoluciones acuosas utilizando sulfato de quitosano. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 14(5): 257-263.
- Richfield-Fratz, N., Baczyński, W. M., Miller, G. C., & Bailey, J. E. (1989). Isolation, characterization and determination of trace organic impurities in FD&C Red No. 40. *Journal of Chromatography A*. 467: 167-176.
- Santis N., A. (2013). Estudio de la producción de lipasas por fermentación en estado sólido a partir de residuos ricos en grasa. Impacto ambiental y posibles usos. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de Barcelona, España.
- Ullmann, F., Gerhartz, W., Yamamoto, Y. S., Campbell, F. T., Pfefferkorn, R., & Rounsaville, J. F. (1985). Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry. Weinheim, Federal Republic of Germany: VCH.
- Van Der Zee, F. P., Bisschops, I. A., Lettinga, G., & Field, J. A. (2003). Activated carbon as an electron acceptor and redox mediator during the anaerobic biotransformation of azo dyes. *Environmental science & technology*. 37(2): 402-408.
- Wade, L. (2011). *Química orgánica. Volumen 2*. Editorial Pearson Educación. México.
- Weisburger, J.H. (2002). Comments on the history and importance of aromatic and heterocyclic amines in public health. *Mutation Research*. 506-507: 9-20.