

Reducción de colorantes azo por distintos grupos microbianos en consorcios anaerobios

Francisco J. Cervantes

División de Ciencias Ambientales, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT), Camino a la Presa San José 2055, Col. Lomas 4^a. Sección, C. P. 78216, San Luis Potosí, SLP, México. E-mail: fcervantes@ipicyt.edu.mx.

Palabras clave: aguas residuales, decoloración, colorantes azo, consorcio anaerobio

procesos de decoloración.

Key words: Anaerobic consortia, azo dyes, decolorization, wastewaters

RESUMEN

La industria textil es un sector productivo que demanda una gran cantidad de agua en sus procesos y los principales compuestos que utiliza en la tinción 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. El propósito de este trabajo es describir los procesos implicados en la reducción de colorantes azo en sistemas anaerobios de tratamiento de aguas residuales. Además, el trabajo describe el papel que juegan cada uno de los grupos tróficos involucrados en la reducción de estos contaminantes en consorcios anaerobios. Los principales grupos microbianos involucrados en la reducción de este tipo de contaminantes incluyen a las bacterias fermentativas, las arqueobacterias metanogénicas y a las bacterias sulfato-reductoras. También, se discute el papel que juegan los catalizadores con propiedades de oxidorreducción, para potenciar la participación de microorganismos anaerobios en los

ABSTRACT

The textile industry is a manufacturing sector demanding a large amount of water in its processes and azo compounds constitute the major class of dyes utilized in dye-baths. Due to a poor degree of fixation in fabrics, an important fraction of azo dyes ends up in textile wastewaters. The aim of this review is to describe the main processes involved on the reduction of azo dyes in anaerobic wastewater treatment systems. Furthermore, the paper explains the role of different syntrophic groups, commonly found in anaerobic microbial consortia, on the reduction of these contaminants. The main microbial groups involved on the reduction of azo dyes include fermentative bacteria, methanogenic archaea and sulfate-reducing bacteria. Moreover, the manuscript also describes the role of redox mediators to enhance the input of anaerobic microorganisms on the anaerobic decolorization of azo dyes.

INTRODUCCIÓN

Los colorantes azo son ampliamente utilizados en diferentes sectores industriales como la fabricación de textiles, alimentos, cosméticos y fármacos (dos Santos *et al.*, 2007). El sector que más demanda colorantes azo es el textil, ya que representan más del 70% de los colorantes usados

durante la tinción de telas. Se estima que hasta un 50% de los colorantes utilizados en la industria textil termina en las aguas descargadas por este sector industrial debido a su bajo grado de fijación en las telas (van der Zee, 2002). La descarga de los colorantes azo al ambiente representa un serio problema por las implicaciones que tiene tanto para

la salud pública como para los ecosistemas. En efecto, muchos colorantes azo y sus productos de degradación (aminas aromáticas) pueden generar alergias, mutaciones o cáncer. Además, la descarga de estos contaminantes a ecosistemas acuáticos impide el desarrollo de las plantas debido a que la coloración que producen inhibe la fotosíntesis. Aunado a lo anterior, muchos colorantes han sido reportados como tóxicos para la vida acuática (dos Santos *et al.*, 2006a).

El sector textil es una de las industrias que requiere mayor cantidad de agua para los procesos de producción. Para la fabricación de telas de algodón, por ejemplo, la demanda de agua varía entre 120 y 750 m³/ton, mientras que para la elaboración de fibras de nylon y de poliéster, la demanda es entre 100-150 y 60-130 m³/ton, respectivamente (Cervantes, 2007).

Considerando todo lo anterior, es evidente que este sector industrial requiere de sistemas de tratamiento de aguas eficientes que permitan reutilizar sus efluentes a través de circuitos cerrados. Los sistemas biológicos han emergido como una alternativa viable para el tratamiento de efluentes del sector textil. Los colorantes azo no pueden ser degradados eficientemente en sistemas biológicos aerobios convencionales. Lo anterior, es debido a que existen múltiples grupos funcionales altamente oxidados en su estructura, que compiten con el oxígeno por los electrones disponibles en los bioreactores aerobios. Sin embargo, bajo condiciones anaerobias, estos compuestos pueden ser reducidos a aminas aromáticas, las cuales no son biodegradadas normalmente en reactores anaerobios, pero sí en sistemas aerobios. Por lo tanto, el esquema planteado para lograr la mineralización completa de los colorantes azo, es la combinación de un sistema biológico anaerobio seguido de otro aerobio (Field *et al.*, 1995). De hecho, múltiples reportes en la literatura indican la factibilidad de esta estrategia con lo cual se pueden lograr altos niveles de eliminación de materia orgánica y de color (dos Santos *et al.*, 2007). Sin

embargo, muchos colorantes azo son reducidos muy lentamente en reactores anaerobios (van der Zee *et al.*, 2001) por lo que la primera etapa del esquema planteado (etapa anaerobia) es considerada como la etapa limitante en la mayoría de los casos. Para contrarrestar lo anterior, varios catalizadores con propiedades óxido-reductoras (redox) han sido aplicados a sistemas de tratamiento anaerobios logrando un aumento de varios órdenes de magnitud en la velocidad de reducción de una amplia gama de colorantes azo (dos Santos *et al.*, 2006b; dos Santos *et al.*, 2007).

El propósito de este artículo es describir los procesos implicados en la reducción de colorantes azo en sistemas anaerobios de tratamiento de aguas residuales. Además, el trabajo describe el papel que juegan cada uno de los grupos tróficos involucrados en la reducción de estos contaminantes en consorcios anaerobios.

ESTRUCTURA Y CARACTERÍSTICAS DE LOS COLORANTES AZO

Los colorantes son compuestos aromáticos que absorben energía electromagnética en el rango visible (350-700 nm). Presentan en su estructura grupos cromóforos, que se caracterizan por un sistema de electrones deslocalizados, con dobles enlaces conjugados y auxocromos, cuyos grupos funcionales se caracterizan por la capacidad de donar electrones. Los grupos cromóforos más comunes son: azo ($-N=N-$), carbonilo ($-C=O$), nitro ($-NO_2$), y quinona ($O=C-C=O$). Los auxocromos más importantes son los grupos amino ($-NH_2$), carboxilo ($-COOH$), sulfonato ($-SO_3H$), e hidroxilo ($-OH$) (van der Zee, 2002).

Los colorantes pueden clasificarse con base en el color, la estructura química, y el método para la aplicación del color (dos Santos *et al.*, 2006b). De acuerdo con un compendio de la Asociación Americana de Textiles y Colorantes, mismo que es actualizado cada 3 meses, existen en el mercado cerca de 28,000 colorantes comerciales. Basándose en el método de aplicación, los

colorantes se catalogan en 15 clases distintas: ácidos, reactivos, complejos metálicos, directos, básicos, mordientes, dispersos, solventes, fluorescentes, sulfurados, aniónicos, a la tina, pigmentos, entre otros (van der Zee, 2002).

El 70% de los colorantes que se producen comercialmente está representado por colorantes tipo azo. (Zollinger, 1987). Este grupo de colorantes se caracteriza por ser reactivos, y formar enlaces

covalentes entre los grupos $-OH$, $-NH$ o $-SH$, y las fibras de algodón, lana, seda, y nylon. Estos colorantes son empleados principalmente para producir coloraciones amarillas, naranjas y rojas (Christie, 2001). En la Fig. 1 se muestra la estructura de algunos colorantes tipo azo. La capacidad de los colorantes para adherirse a las fibras está en función del tipo de colorante que se emplee, al igual que sus características físicas y químicas.

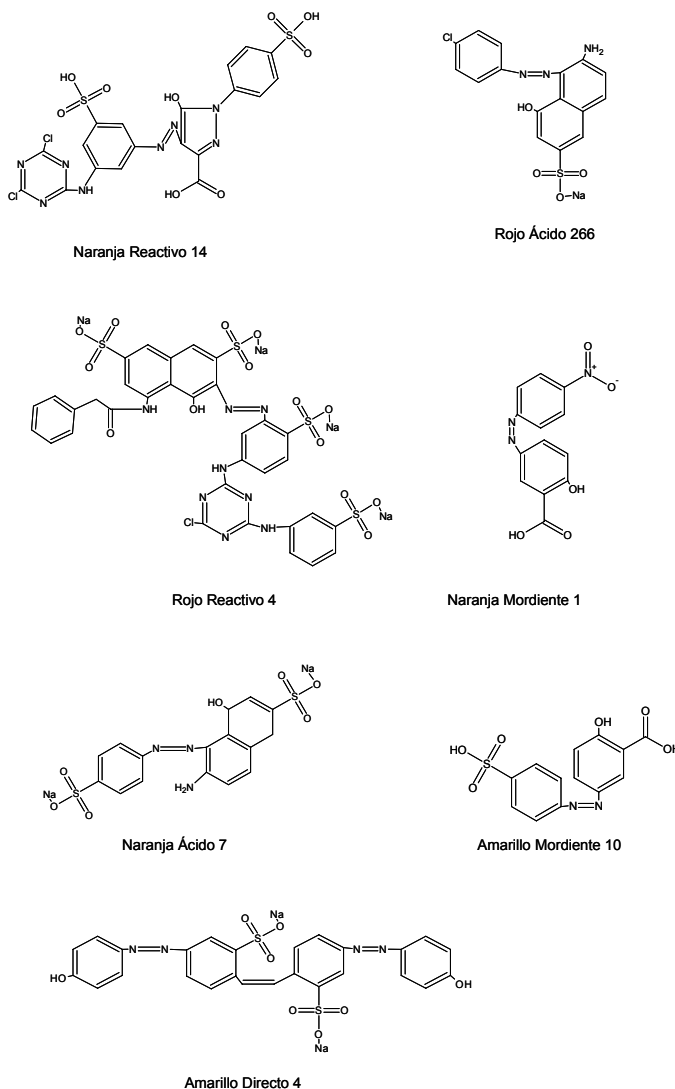


Fig. 1. Estructura química de algunos colorantes tipo azo (van der Zee *et al.*, 2002)

PROCESOS INVOLUCRADOS EN LA DIGESTIÓN ANAEROBIA

La digestión anaerobia consiste en una serie de reacciones que, en ausencia de oxígeno, degradan la materia orgánica hasta metano y dióxido de carbono como productos finales. Básicamente, el proceso global de digestión anaerobia se puede dividir en tres etapas, de acuerdo con el modelo propuesto por McInerney & Bryant (1981). Las relaciones complejas entre los diferentes grupos microbianos involucrados en la digestión anaerobia se esquematizan en la Fig. 2.

En la primera etapa, llamada acidogénesis, los polímeros y otras sustancias complejas son hidrolizadas y fermentadas para dar productos

compuestos simples como el ácido acético, que es el principal precursor del metano, y ácidos grasos volátiles (AGV), como propiónico, butírico, láctico y valérico, etanol e hidrógeno. En la segunda etapa, con las reacciones de acetogénesis, los ácidos grasos son transformados en ácido acético e hidrógeno. En la tercera etapa, se lleva a cabo la metanogénesis, principalmente mediante dos tipos de reacciones; la acetoclástica que consiste en la descarboxilación del ácido acético y la hidrogenotrófica que consiste en la reducción del dióxido de carbono con hidrógeno.

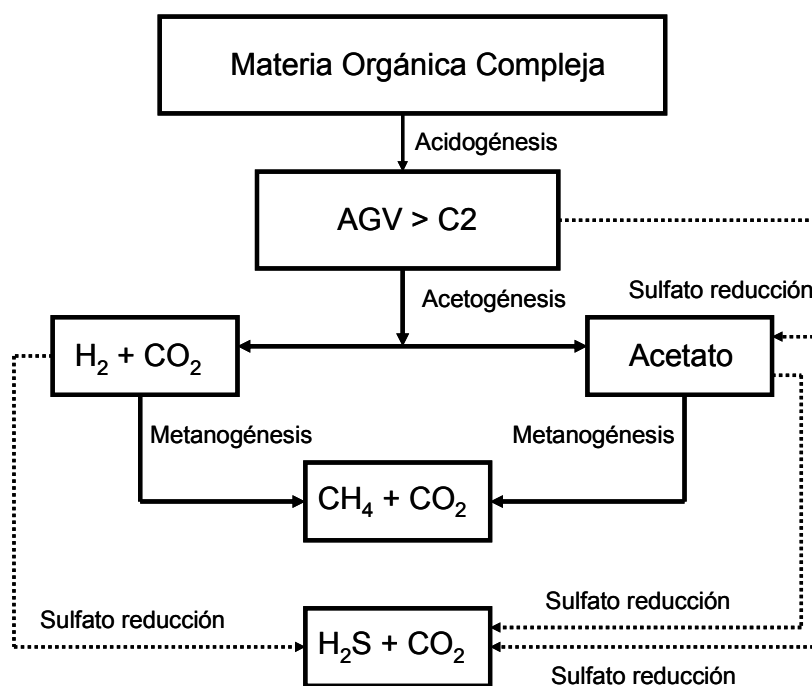


Fig. 2. Principales procesos involucrados en la digestión anaerobia de materia orgánica y su relación con la sulfato reducción.

Acidogénesis: hidrólisis y fermentación

Consiste en la hidrólisis de las macromoléculas y en la fermentación de los monómeros y oligómeros (ácidos grasos, carbohidratos, aminoácidos y compuestos aromáticos) para producir principalmente AGV de dos a cinco átomos de carbono, ácidos dicarboxílicos, como el

succinato, alcoholes (metanol y etanol), CO₂ e H₂. En este nivel intervienen reacciones de interconversión de algunos metabolitos que permiten que el producto sea fermentado después por un grupo complementario de bacterias fermentativas. Por ejemplo, la formación de propionato, a partir del succinato o del lactato, la

reducción carboxilativa del propionato (C₃) en butirato (C₄), entre otras reacciones (Rittman & MacCarty, 2001). Las bacterias acidogénicas más representativas pertenecen a los géneros *Clostridium*, *Streptococcus* y *Propionibacterium*, las cuales presentan altas tasas de fermentación en un amplio intervalo de pH (5-9) y tienen una mayor velocidad de crecimiento comparada con la de los otros grupos microbianos involucrados en la digestión anaerobia. Las bacterias que utilizan el H₂ como fuente de energía (hidrogenotróficas) juegan un papel muy importante en esta etapa, ya que impiden la acumulación de H₂ en los digestores, lo cual inhibiría el proceso global de digestión anaerobia debido a que muchas reacciones serían termodinámicamente no viables (Rittman & MacCarty, 2001).

Acetogénesis

Este proceso consiste en la conversión de los AGV y alcoholes en acetato, H₂ y CO₂. Lo llevan a cabo un grupo de bacterias acetogénicas productoras obligadas de hidrógeno (OHPA, por sus siglas en inglés). Para ello es preciso que el H₂, producido en la acidogénesis y en la acetogénesis,

tenga un sumidero continuo, para que el equilibrio termodinámico de las reacciones se desplace hacia la liberación de energía libre (pasando de una $\Delta G' > 0$ a una $\Delta G' < 0$). En caso contrario, se inhibirán las bacterias OHPA debido a un impedimento termodinámico del proceso global (Tabla 1). Las arqueobacterias metanogénicas hidrogenotróficas son las encargadas de consumir el H₂ producido en las dos etapas anteriores. Lo anterior, implica una transferencia de H₂ entre especies, la cual funciona armónicamente en consorcios anaerobios gracias a la relación sintrófica tan estrecha entre las bacterias OHPA y las arqueobacterias hidrogenotróficas. Esta relación sintrófica es muy importante, ya que permite la producción continua de acetato a partir de los otros AGV presentes en un digestor. La presión parcial de H₂, en digestores anaerobios, no deberá exceder de 10⁻⁴ atm para que las reacciones sean favorables desde el punto de vista termodinámico. Las arqueobacterias metanogénicas tienen una alta afinidad por el H₂, lo cual permite que los niveles de H₂ usualmente se encuentren por debajo de 10⁻⁶ atm en los digestores (Monroy-Hermosillo, 1998).

Tabla 1. Estequiometría y cambio de energía libre de Gibbs (ΔG°) de algunas reacciones acetogénicas^a

Reacción	ΔG° (kJ/mol)
CH ₃ CHOHCOO ⁻ + 2 H ₂ O → CH ₃ COO ⁻ + HCO ₃ ⁻ + H ⁺ + 2 H ₂	- 4.2
Lactato	
CH ₃ CH ₂ OH + H ₂ O → CH ₃ COO ⁻ + H ⁺ + 2 H ₂	+ 9.6
Etanol	
CH ₃ CH ₂ CH ₂ COO ⁻ + 2 H ₂ O → 2 CH ₃ COO ⁻ + H ⁺ + 2 H ₂	+ 48.1
Butirato	
CH ₃ CH ₂ COO ⁻ + 3 H ₂ O → CH ₃ COO ⁻ + HCO ₃ ⁻ + H ⁺ + 3 H ₂	+ 76.1
Propionato	
4 CH ₃ OH + 2 CO ₂ → 3 CH ₃ COOH + 2 H ₂ O	- 2.9
Metanol	
2 HCO ₃ ⁻ + 4 H ₂ + H ⁺ → CH ₃ COO ⁻ + 4 H ₂ O	- 70.3
Bicarbonato	

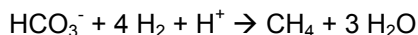
^aTomada de Monroy-Hermosillo, 1998.

Metanogénesis

Es el último proceso bioquímico implicado en la digestión anaerobia y consiste en la producción de metano a partir de un pequeño grupo de sustratos que incluye la mezcla H_2/CO_2 , el formiato, el acetato, el metanol y las metil-aminas. Algunos microorganismos metanogénicos pueden utilizar también etanol, ciclopentanol y 2-propanol como donadores de electrones para reducir el CO_2 . En la mayoría de los digestores anaerobios, los principales sustratos son la mezcla H_2/CO_2 , el formiato y el acetato. Este último, representa el origen del 73% del metano producido.

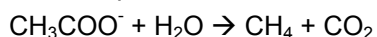
Los dos principales grupos de arqueobacterias metanogénicas son:

- 1) Hidrogenotróficas no acetoclásticas. Utilizan la mezcla H_2/CO_2 y en su mayoría, el formiato. Los géneros más representativos son *Methanobrevibacter* y *Methanobacterium*. La reacción ocurre de acuerdo con la siguiente estequiometría:



$$\Delta G^{\circ} = -135 \text{ kJ/reacción}$$

- 2) Acetoclásticas. Utilizan el acetato como principal fuente de carbono y energía. La reacción ocurre de acuerdo con la siguiente estequiometría:



$$\Delta G^{\circ} = -31 \text{ kJ/reacción}$$

Este grupo de arqueobacterias metanogénicas se subdivide en dos:

- i) las del género *Methanosarcina* que, además del acetato, pueden utilizar metanol, metil-aminas y algunas cuantas especies, hidrógeno
- ii) las del género *Methanosaeta*, antiguamente conocido como *Methanothrix*, que utilizan únicamente acetato como fuente de energía.

Los microorganismos metanogénicos pertenecen a las *Archaeobacteria*, un grupo filogenético distinto de los *Eukaryotes* y *Prokaryotes*. Las arqueobacterias difieren de las bacterias en la composición del DNA y de su pared

celular. Las arqueobacterias metanogénicas contienen ácido murámico en su pared celular, lo cual las hace ser no susceptibles a la acción de antibióticos (penicilina, vancomicina y cefalosporina) que afectan la pared celular de las bacterias. Las arqueobacterias metanogénicas son anaerobias estrictas muy sensibles al oxígeno que requieren potenciales redox menores a -330 mV para crecer de manera óptima (Macarie & Guyot, 1995).

Sulfato reducción

Muchos efluentes industriales, como los generados de fábricas de textiles, alimentos marinos y papel, contienen elevadas concentraciones de sulfato. Estas aguas residuales, al ser tratadas en sistemas anaerobios, permiten el crecimiento de bacterias sulfato-reductoras (BSR), las cuales aprovechan una amplia gama de sustratos orgánicos para reducir el sulfato hasta sulfuro. La sulfato reducción se define como el proceso respiratorio mediante el cual las BSR obtienen energía al utilizar al sulfato como aceptor final de electrones (Rittman & McCarty, 2001).

La presencia de sulfato en aguas residuales incrementa considerablemente la complejidad de las rutas de biodegradación en un digestor anaerobio (Fig. 2). Bajo este escenario, las BSR compiten con los otros grupos tróficos involucrados en la digestión anaerobia (acidogénicos, acetogénicos y metanogénicos) por los sustratos disponibles en el agua residual a tratar. Desde el punto de vista termodinámico y cinético, las BSR superan a las arqueobacterias metanogénicas durante su crecimiento en sistemas anaerobios (Tabla 2). La competencia entre estos dos procesos es de suma importancia, dado que determina en qué grado se generarán los dos principales productos de estos procesos (sulfuro y metano). La importancia de esta competencia se incrementa cuando se tratan aguas residuales con una relación baja de materia orgánica (generalmente referida como demanda química de oxígeno, DQO) y

sulfato. Para descargas industriales con una relación DQO/sulfato mayor a 0.67, se contará con la cantidad de materia orgánica requerida para lograr la reducción completa del sulfato hasta sulfuro. Para lograr una eliminación completa de la DQO, además de la sulfato-reducción, deberá ocurrir también la metanogénesis de manera complementaria. Para los casos en los que la relación DQO/sulfato sea menor a 0.67, se requerirá la adición de sustrato complementario para lograr el proceso completo de reducción de

sulfato (Fernández-Polanco & García-Encina, 2006).

El sulfuro generado por las BSR juega un papel importante en la competencia de estas bacterias con los microorganismos metanogénicos, ya que ejerce un efecto tóxico sobre éstas. Sin embargo, en general, se ha reportado que para el tratamiento de efluentes cuya relación DQO/sulfato es mayor a 10, se puede lograr una alta eficiencia metanogénica, complementaria a la reducción de sulfato a sulfuro por las BSR (Fernández-Polanco & García-Encina, 2006).

Tabla 2. Estequiometría para la degradación de propionato, acetato e hidrógeno por bacterias sulfato-reductoras y arqueobacterias metanogénicas (ΔG° a 37°C en kJ/reacción)^a

Reacciones	ΔG°
Propionato	
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + 3 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ + 3 \text{H}_2$	+76.0
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + 0.75 \text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{HCO}_3^- + 0.75 \text{HS}^- + 0.25 \text{H}^+$	- 37.7
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + 1.75 \text{SO}_4^{2-} \rightarrow 3 \text{HCO}_3^- + 1.75 \text{HS}^- + 0.5 \text{H}^+ + 0.25 \text{OH}^-$	- 88.9
Acetato	
$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{HCO}_3^-$	- 31.0
$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow 2 \text{HCO}_3^- + \text{HS}^-$	- 47.6
Hidrógeno	
$4 \text{H}_2 + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + 3 \text{H}_2\text{O}$	- 32.7
$4 \text{H}_2 + \text{SO}_4^{2-} + \text{H}^+ \rightarrow \text{HS}^- + 4 \text{H}_2\text{O}$	- 38.1

^aTomada de Fernández-Polanco & García-Encina, 2006.

REDUCCIÓN DE COLORANTES AZO BAJO CONDICIONES ANAEROBIAS

La reducción anaerobia de colorantes azo consiste en la ruptura reductiva de los enlaces azo presentes en la estructura de estos compuestos. Es decir, los enlaces -N=N- son reducidos para formar aminas aromáticas. El primer reporte sobre la reducción de un colorante azo fue publicado por Brohm & Frohwein (1937), cuando estudiaron la reducción de colorantes utilizados en la industria alimentaria por bacterias lácticas aisladas del intestino humano. A partir de entonces, se derivaron múltiples estudios que describen la reducción de colorantes azo por diferentes

bacterias aisladas del tracto digestivo de mamíferos (McMullan *et al.*, 2001; Stolz, 2001; Rau *et al.*, 2002). Lo anterior, se explica por el impacto negativo que tienen las aminas formadas de la reducción de los colorantes azo, en la salud pública; muchas de estas aminas han sido identificadas como carcinogénicas (Brown & Devito, 1993).

Después, cuando la eliminación de colorantes de las aguas residuales se convirtió en un tema de investigación prioritario, se desarrollaron múltiples estudios que señalaron a una amplia gama de microorganismos facultativos o anaerobios estrictos capaces de reducir una gran variedad de colorantes

azo. Por lo anterior, por muchos años, se pensó que la reducción de los colorantes azo era un proceso fortuito y general de los microorganismos anaerobios, que no requería la intervención de enzimas específicas (van der Zee, 2002). Sin embargo, como se discutirá más adelante, existen microorganismos capaces de crecer utilizando colorantes azo como aceptores finales de electrones en su cadena respiratoria.

Actualmente se conocen varios mecanismos mediante los cuales se reducen los colorantes azo (Fig. 3). El mecanismo más estudiado implica la reducción biológica de colorantes azo por una amplia gama de microorganismos anaerobios. Al respecto, se conocen diferentes formas de reducción microbiana; en algunos casos la reducción se lleva a cabo en el citoplasma de las bacterias, mientras que en otros casos, la reducción de los colorantes está asociada a enzimas de la membrana celular (dos Santos *et al.*, 2007). Otro mecanismo de reducción de colorantes azo involucra la participación de distintos mediadores redox que canalizan los electrones generados por

microorganismos, gracias a la oxidación de diferentes sustratos, hacia los enlaces azo de los colorantes. Se han reportado muchos mediadores redox capaces de acarrear los electrones durante procesos de reducción de colorantes azo, entre los que destacan aquellos que incluyen en su estructura quinonas o flavinas (dos Santos *et al.*, 2007). La participación de estos mediadores redox ha permitido acelerar el proceso de reducción de los colorantes azo, lo cual es de suma importancia ya que la reducción de estos compuestos está asociado a la desaparición del color de las aguas contaminadas. Es decir, el grupo cromóforo de estos colorantes es precisamente el (los) enlace(s) azo. También existen agentes químicos reductores, como el sulfuro, que son muy comunes en sistemas de tratamiento de aguas residuales y que son capaces de reducir químicamente a los colorantes azo; ya sea por reducción química directa, o bien, por reducción química asistida por un mediador redox (van der Zee *et al.*, 2000).

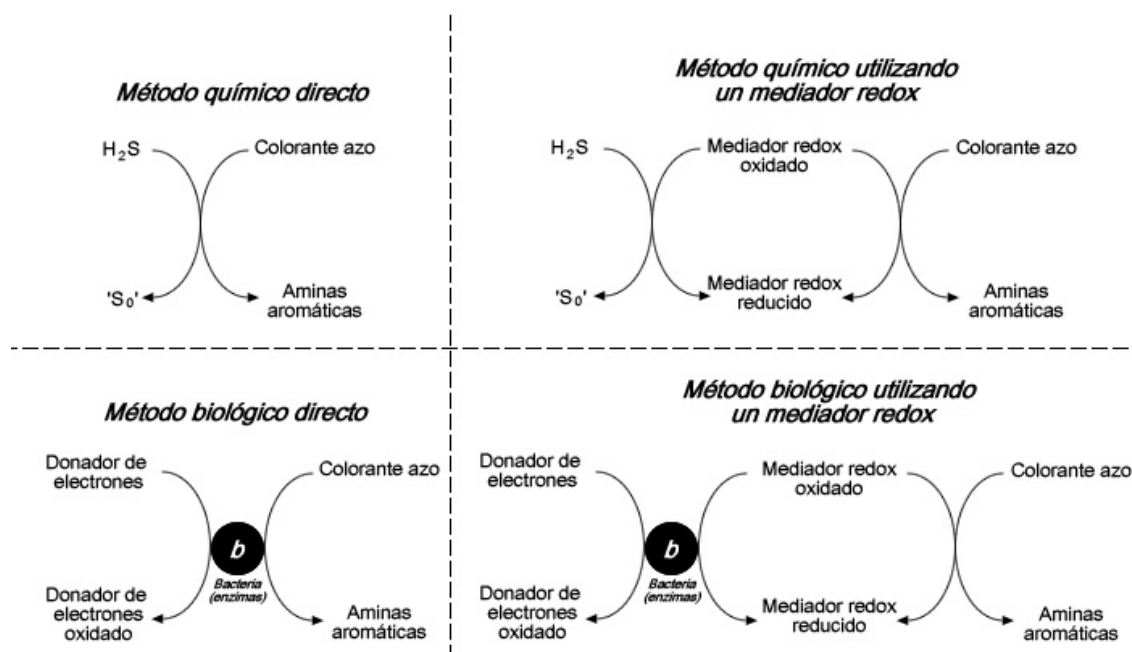


Fig. 3. Principales mecanismos biológicos y químicos implicados en la reducción de colorantes azo a aminas aromáticas (van der Zee *et al.*, 2002).

CONTRIBUCIÓN DE DIFERENTES GRUPOS MICROBIANOS DE CONSORCIOS ANAEROBIOS EN LA REDUCCIÓN DE COLORANTES AZO

Bacterias Fermentativas

Como se mencionó anteriormente, los primeros estudios sobre la reducción microbiana de colorantes azo se llevaron a cabo con bacterias fermentativas aisladas del tracto digestivo de mamíferos, debido a la importancia en salud pública que implica la generación de aminas aromáticas de

estos procesos. Más recientemente, se ha reportado una gran variedad de microorganismos fermentativos, que comúnmente forman parte de consorcios anaerobios de tratamiento de aguas residuales, capaces de reducir colorantes azo. La velocidad y el grado de reducción de estos colorantes depende del tipo de microorganismo, del tipo de colorante y de la concentración inicial probada (Tabla 3).

Tabla 3. Bacterias facultativas y anaerobias estrictas capaces de reducir colorantes azo^a

Organismo	Colorantes	Actividad	Decoloración (%)	Comentarios
		μ mol/mL/h		
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 3626	Amaranto	0.74	-	Concentración de colorante 0.033 mM.
	Naranja de Metilo	0.62	-	
	Naranja II	0.70	-	
	Tartrazina	0.67	-	
		μ mol/mL/h		Después de 6 horas de incubación.
<i>Bacteroides fragilis</i>	Amaranto	0.30	66.0	Concentración de colorante 0.1 mM.
	Naranja II	0.20	37.0	
	Tartrazina	0.08	9.0	
	Violeta Ácido 7	-	97.4	Después de 72 horas de incubación.
<i>Pseudomonas</i> GM3	Azul Reactivo 2	-	18.3	
	Verde Ácido 27	-	75.6	Concentración de colorante 100 mg L ⁻¹
	Rojo Ácido 183	-	20.1	
	Carmino Índigo	-	69.0	
		μ mol/min/g proteína		
<i>Sphingomonas xenophaga</i> BN6	Rojo Ácido 27	0.10	-	Concentración de colorante 0.1 mM.
	Naranja Ácido 20	0.10	-	
	Naranja Ácido 7	0.30	-	
	Rojo Ácido 14	0.20	-	
	Amarillo Ácido 23	0.10	-	
	Negro Ácido 1	0.30	-	
<i>Enterococcus faecalis</i>		AU x 10 ⁻² / mg proteína		
	Rojo de Metilo	1.81	99.4	Después de 20 horas de incubación.
	Naranja II	1.39	95.1	

	Naranja G	1.20	64.1	Concentración de
	Amaranto	1.37	99.5	colorante 0.2 mM

	Tartrazina	-	4.0	
	Amarillo Sunset	-	9.0	Después de 150
<i>Acidaminococcus</i>	Naranja de Metilo	-	66.0	minutos de incubación.
<i>fermentans</i>	Naranja II	-	72.0	Concentración de
	Amaranto	-	5.0	colorante 2 mM
	Rojo Alura 40	-	0.0	

	Tartrazina	-	4.0	
	Amarillo Sunset	-	22.0	Después de 150
<i>Eubacterium</i>	Naranja de Metilo	-	79.0	minutos de incubación.
<i>biforme</i>	Naranja II	-	81.0	Concentración de
	Amaranto	-	19.0	colorante 2 mM
	Rojo Alura 40	-	11.0	

^aTomada de dos Santos *et al.*, 2007.

Es importante señalar que las bacterias hidrolíticas y fermentativas juegan un papel importante en el tratamiento de efluentes de la industria textil, ya que estas descargas contienen, además de una gran cantidad de colorantes azo, diferentes polímeros, como el almidón, utilizados durante la fabricación y el acabado de las telas (dos Santos *et al.*, 2006a).

En experimentos recientes se estudió en detalle el papel que juegan las bacterias fermentadoras de la glucosa en la reducción de diferentes colorantes azo. Para tal efecto, se llevaron a cabo incubaciones de lodo anaerobio granular utilizando vancomicina y 2-bromo-etano-sulfonato de sodio (BES) como inhibidores selectivo de las bacterias fermentativas y arqueobacterias metanogénicas, respectivamente (dos Santos *et al.*, 2006a). Los cultivos inhibidos con vancomicina presentaron una decoloración muy pobre de los colorantes estudiados, debido a que se impidió la fermentación de la glucosa y, por consiguiente, el proceso anaerobio en general. Mientras tanto, los cultivos inhibidos con BES, en los cuales sólo estaban activas las bacterias acidogénicas, mostraron la misma capacidad para reducir los colorantes azo, comparado con los cultivos en los que no se agregó

ningún inhibidor. Lo anterior, indica entonces que las bacterias fermentadoras de la glucosa juegan un papel destacado durante la decoloración de este tipo de contaminantes. En los cultivos inhibidos con BES, los principales productos de fermentación obtenidos fueron acetato, propionato, butirato, y etanol, evidenciando los principales grupos de bacterias fermentativas implicadas en el proceso de decoloración (dos Santos *et al.*, 2006a).

Arqueobacterias Metanogénicas

El papel específico de las arqueobacterias metanogénicas en la reducción de colorantes azo se desconocía hasta hace poco, aunque se asumía que podrían jugar un papel importante ya que las altas tasas de decoloración observadas en digestores anaerobios estaban relacionadas con una alta producción de biogás (van der Zee *et al.*, 2001; dos Santos *et al.*, 2005). Fue hasta los estudios recientes, desarrollados por dos Santos *et al.* (2006a), en los que se evidenció claramente el papel que podrían jugar algunos microorganismos metanogénicos en la reducción de colorantes azo. En primera instancia, se observó que la actividad metanogénica de un lodo anaerobio granular fue

despreciable durante la reducción de rojo reactivo 2, rojo reactivo 4 y naranja reactivo 14, cuando se utilizaron sustratos directos de la metanogénesis (acetato, metanol, formiato e hidrógeno). La actividad metanogénica de este consorcio metanogénico sólo se recuperó cuando los colorantes ya habían sido reducidos. De hecho, en cultivos selectivamente inhibidos con BES, en los que se utilizó el hidrógeno y el formiato como donadores de electrones, se observó incluso un aumento en la velocidad de decoloración comparado con los controles incubados sin BES. Lo anterior, podría sugerir que los microorganismos metanogénicos no están implicados en la reducción de colorantes azo. Sin embargo, otros experimentos relacionados indicaron claramente la participación de arqueobacterias metanogénicas en la reducción de colorantes azo. Cultivos puros de *Methanosarcina barkeri* y de una especie relacionada al género *Methanothermobacter* (especie NJ1) redujeron al rojo reactivo 2 utilizando hidrógeno como donador de electrones. Ambas cepas metanogénicas pudieron incluso reducir el colorante aún en presencia del inhibidor de la metanogénesis (BES). Los estudios revelaron que no hubo actividad metanogénica, durante la reducción de rojo reactivo 2, lo cual sugiere que estos microorganismos utilizaron una vía metabólica alterna, en la que no está involucrada la acetil-coenzima M, para generar los electrones requeridos para la reducción del colorante. Otro cultivo de *Methanothermobacter thermoautotrophicus* ΔH no fue capaz de reducir el mismo colorante directamente, pero la adición de riboflavina en el medio de cultivo, como mediador redox, permitió una rápida decoloración de este compuesto (dos Santos *et al.*, 2006a). Lo anterior, indica que algunos acarreadores de electrones podrían jugar un papel muy importante para permitir a algunos microorganismos metanogénicos a participar en procesos de decoloración en sistemas anaerobios de aguas residuales.

Bacterias sulfato reductoras

Las aguas residuales de la industria textil usualmente contienen una concentración alta de sulfato. El sulfato es un aditivo común en las tintas de tinción o puede ser generado a partir de compuestos sulfurados más reducidos, como el sulfuro y la ditionita, que son utilizados en los procesos de tinción de telas (van der Zee *et al.*, 2003). La presencia del sulfato en sistemas anaerobios aplicados en el tratamiento de efluentes de la industria textil, podría tener un efecto importante considerando los siguientes puntos: 1) el sulfato podría competir con los colorantes azo por los electrones disponibles en los digestores anaerobios; 2) la generación de electrones a partir de la oxidación de diferentes sustratos, ligado a la sulfato-reducción, podría promover la reducción de colorantes azo a través de cofactores que canalicen los electrones hacia estos contaminantes; y 3) el sulfuro generado de la sulfato-reducción podría contribuir, a través de reacciones químicas, en la reducción de colorantes azo (van der Zee *et al.*, 2003; Cervantes *et al.*, 2007).

Varios estudios se han desarrollado con el fin de esclarecer qué mecanismos son más importantes durante la reducción de colorantes azo bajo condiciones sulfato-reductoras. Lo anterior surge debido a que, a pesar de los múltiples trabajos que sugieren la participación de BSR en procesos de decoloración, los mecanismos involucrados no han sido elucidados (Cervantes *et al.*, 2007). Algunos estudios señalan que tanto la actividad biológica ligada a la sulfato-reducción, como la reducción por sulfuro generado por BSR, son importantes en los procesos de reducción de colorantes azo. En un estudio reciente se encontró que la reducción de naranja reactivo 14 ocurrió de manera simultánea con la reducción de sulfato en un cultivo con lodo anaerobio granular (Cervantes *et al.*, 2006). En el mismo trabajo se encontró que la reducción de NR14 por sulfuro, en incubaciones abióticas, no procedió de manera significativa, pero la adición de riboflavina como mediador redox,

propició una alta tasa de decoloración de NR14 por sulfuro. Estudios posteriores corroboraron la contribución de la riboflavina en la transferencia de electrones del sulfuro hacia la reducción de distintos colorantes azo (Cervantes *et al.*, 2007). La adición de riboflavina en estos estudios aumentó hasta 44 veces la velocidad de reducción de colorantes azo comparado con los controles sin riboflavina. También, en incubaciones de un lodo granular bajo condiciones sulfato-reductoras, se observó que la reducción del sulfato sólo ocurría durante la preincubación (sin colorantes) o bien, después de que los colorantes habían sido completamente reducidos. Por lo tanto, se concluyó que el principal mecanismo de reducción de los colorantes azo fue mediante la reducción química por el sulfuro producido durante el periodo de preincubación, en presencia de riboflavina.

Bacterias Azo-Reductoras (BAR)

Hasta hace poco tiempo, se consideraba que los procesos bacterianos de reducción de colorantes azo ocurrían a través de mecanismos enzimáticos no específicos presentes en una

amplia diversidad de bacterias anaerobias (Stolz, 2001). Sin embargo, recientemente, se han encontrado evidencias de que algunos microorganismos son capaces de acoplar la oxidación anaerobia de diferentes sustratos orgánicos a la utilización de colorantes azo como aceptor final de electrones en su cadena respiratoria (Kudlich *et al.*, 1997; Hong *et al.*, 2007). La primera BAR reportada fue *Sphingomonas* sp. BN6, en la cual se encontraron actividades azo-reductoras tanto en el citoplasma como en diferentes fracciones de la membrana celular (Kudlich *et al.*, 1997). En cambio, la actividad azo-reductora detectada en *Shewanella decolorationis* S12 ocurrió casi exclusivamente en la membrana celular, con muy poca actividad en el periplasma y citoplasma (Hong *et al.*, 2007). El mecanismo bioquímico propuesto para la reducción de colorantes azo por *S. decolorationis* S12 incluye la participación de una formiato deshidrogenada, una hidrogenasa, citocromo P450, menaquinona y finalmente, una azoreductasa ubicada en la parte externa de la membrana celular (Fig. 4).

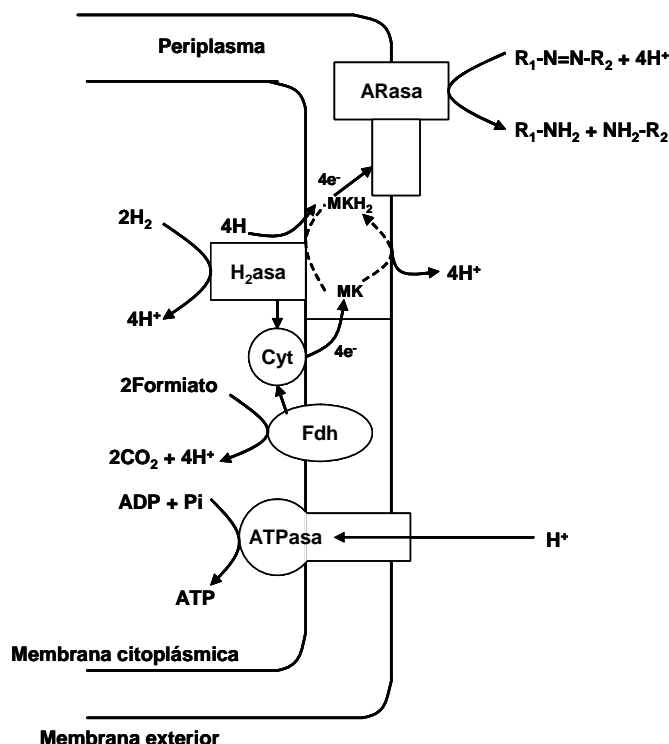


Fig. 4. Sistema de transporte de electrones propuesto para la reducción de colorantes azo por *Shewanella decolorationis* S12. H₂asa, hidrogenasa; Fdh, formiato deshidrogenada; cyt, citocromo P450; MK, menaquinona; MKH₂, menahidroquinona; ARasa, azoreductasa (Hong *et al.*, 2007).

La información disponible en la literatura y que se ha discutido en el presente trabajo, indica claramente que los principales grupos microbianos involucrados en la digestión anaerobia y en la reducción de sulfato, pueden contribuir significativamente en la reducción de colorantes azo. La forma en que interactúan los diferentes grupos tróficos que intervienen en procesos de decoloración se resume en la Fig. 2. De todos los grupos descritos anteriormente, se sabe que aquellos que utilizan hidrógeno, formiato y glucosa, como fuente de energía, son los que rinden las tasas de decoloración más altas. Mientras tanto, microorganismos que utilizan acetato o metanol muestran una capacidad de decoloración menor, comparada con las obtenidas con los sustratos mencionados anteriormente (dos Santos *et al.* 2007). Además de los microorganismos que participan en la digestión anaerobia, existen BAR que pueden jugar un papel importante en procesos de decoloración, en reactores anaerobios de tratamiento de aguas residuales; sobre todo considerando que las BAR reportadas hasta el momento en la literatura, pueden estar presentes en los consorcios anaerobios de tratamiento de aguas residuales (Pearce *et al.*, 2003)

CONCLUSIONES

Las recientes evidencias mostradas en la literatura indican que varios grupos tróficos comúnmente encontrados en consorcios anaerobios de tratamiento de aguas residuales juegan un papel importante en la reducción de colorantes azo. Los principales grupos microbianos involucrados en la reducción de este tipo de contaminantes incluye a las bacterias fermentativas, las arqueobacterias metanogénicas y a las bacterias sulfato-reductoras. Algunos mediadores redox, como la riboflavina, al estar presentes en consorcios anaerobios facilitan la participación de microorganismos en los procesos de decoloración.

REFERENCIAS

- Brohm K & Frohwein E (1937) Nachweis von durch Säueringentfarbten künstlichen Eigelbfrabststoffen in Milchspeiseeis. *Zbl. Lebensmitt. Forsch.* 73: 30.
- Brown MA & Devito SC (1993) Predicting azo dye toxicity. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 23: 249-324.
- Cervantes FJ (2007) Increase business competitiveness with water recycling. *Asian Water* 3:14-17.
- Cervantes FJ, Enríquez JE, Mendoza-Hernández MR, Razo-Flores E & Field JA (2006) The role of sulphate reduction on the reductive decolorization of the azo dye reactive orange 14. *Water Sci. Technol.* 54: 171-177.
- Cervantes FJ, Enríquez JE, Galindo-Petatán E, Arvayo H, Razo-Flores E & Field JA (2007) Biogenic sulphide plays a major role on the riboflavin-mediated decolourisation of azo dyes under sulphate reducing conditions. *Chemosphere*, 68: 1082-1089.
- Christie R (2001) *Colour Chemistry*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, United Kingdom.
- dos Santos AB, de Madrid MP, de Bok FAM, Stams AJM, van Lier JB & Cervantes FJ (2006a) The contribution of fermentative bacteria and methanogenic archaea to azo dye reduction by a thermophilic anaerobic consortium. *Enz. Microbial. Technol.* 39: 38-46.
- dos Santos AB, Cervantes FJ & van Lier JB (2007) Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: perspectives for anaerobic biotechnology. *Biores. Technol.* 98: 2369-2385.
- dos Santos AB, Traverse J, Cervantes FJ & van Lier JB (2005) Enhancing the electron transfer capacity and subsequent colour removal in bioreactors by applying thermophilic anaerobic

- treatment and redox mediators. *Biotechnol. Bioeng.* 89: 42-52.
- Dos Santos AB, Bisschops IAE & Cervantes FJ (2006b) Closing process water cycles and product recovery in textile industry: perspective for biological treatment. *In: Advanced Biological Treatment Processes for Industrial Wastewaters: Principles & Applications.* Cervantes FJ, Pavlostathis SG & van Haandel A (eds). IWA Publishing. pp. 298-320.
- Fernández-Polanco M & García-Encina PA (2006) Application of biological treatment systems for sulphate-rich wastewaters. *In: Advanced Biological Treatment Processes for Industrial Wastewaters: Principles & Applications.* Cervantes FJ, Pavlostathis SG & van Haandel A (eds). IWA Publishing. IWA Publishing. pp. 213-236.
- Field JA, Stams AJM, Kato M & Schraa G (1995) Enhanced biodegradation of aromatic pollutants in cocultures of anaerobic and aerobic bacterial consortia. *Antonie van Leeuwenhoek*, 67: 47-77.
- Hong Y, Xu M, Guo J, Xu Z, Chen X & Sun G (2007) Respiration and Growth of *Shewanella decolorationis* S12 with an Azo Compound as the Sole Electron Acceptor. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 64-72.
- Kudlich M, Keck A, Klein J & Stolz A (1997) Localization of the enzyme system involved in anaerobic reduction of azo dyes by *Sphingomonas* sp. strain BN6 and effect of artificial redox mediators on the rate of azo dye reduction. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3691-3694.
- Macarie H & Guyot JP (1995) Use of ferrous sulphate to reduce the redox potential and allow the start-up of UASB reactors treating slowly biodegradable compounds. *Environ. Technol.* 16: 1185-1192.
- McInerney MJ & Bryant MP (1981) Basic principles of bioconversions in anaerobic digestion and methanogenesis. *In: Biomass conversion process for energy and fuels.* Sofer SS & Zabrosky OR (eds). Plenum Publishing Corp. New York. pp. 277-296.
- McMullan G, Meehan C, Conneely A, Nirby N, Robinson T, Nigam P, Banat IM, Marchant R & Smyth WF (2001) Mini review: Microbial decolourisation and degradation of textile dyes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 81-87.
- Monroy-Hermosillo OA (1998) Modelamiento y control de un sistema de digestión anaerobia en dos etapas. Tesis de grado de Doctor en Ciencias. Universidad Autónoma Metropolitana. México, D. F. pp. 3-10.
- Pearce CI, Lloyd JR & Guthrie JT (2003) The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: a review. *Dyes Pigments*, 58: 179-196.
- Rau J, Maris B, Kinget R, Samyn C, van den Mooter G & Stolz A (2002) Enhanced anaerobic degradation of polymeric azo compounds by *Escherichia coli* in the presence of low-molecular-weight redox mediators. *J. Pharm. Pharmacol.* 54: 1471-1479.
- Rittman BE & McCarty PL (2001) Biotecnología del Medio Ambiente: Principios y Aplicaciones. Mc Graw Hill, Madrid.
- Stolz A (2001) Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 69-80.
- van der Zee FP (2002) Anaerobic azo dye reduction. Tesis de grado de Doctor en Ciencias Ambientales. Wageningen University, The Netherlands, pp. 142.
- van der Zee FP, Bisschops IAE, Blanchard VG, Bouwman RHM, Lettinga G & Field JA (2003) The contribution of biotic and abiotic processes

during azo dye reduction in anaerobic sludge.

Water Res. 37: 3098-3109.

van der Zee FP, Bouwman RHM, Strik DPBTB, Lettinga G & Field JA (2001) Application of redox mediators to accelerate the transformation of reactive azo dyes in anaerobic bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* 75: 691-701.

van der Zee FP, Lettinga G & Field JA (2000) The role of (auto)catalysis in the mechanism of anaerobic azo dye reduction. *Water Sci. Technol.* 42: 301-308.

Zollinger H (1987) *Color Chemistry: Syntheses, properties and applications of organic dyes pigments.* VCH, New York.