

IPICYT

**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

**Biotransformación anaerobia de iopromida,
empleando sustancias húmicas insolubles como
mediadores redox**

Tesis que presenta

Aracely Sarai Cruz Zavala

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias Ambientales

Director de la Tesis:

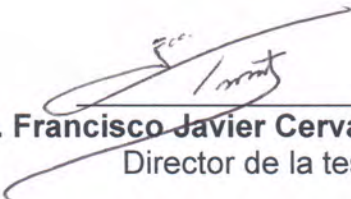
Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo

San Luis Potosí, S.L.P., Agosto del 2015




Constancia de aprobación de la tesis

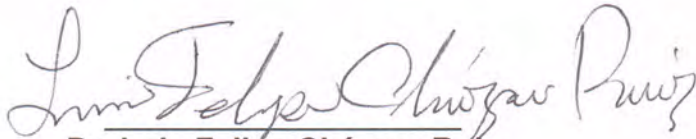
La tesis ***“Biotransformación anaerobia de iopromida, empleando sustancias húmicas insolubles como mediadores redox”*** presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias Ambientales fue elaborada por **Aracely Sarai Cruz Zavala** y aprobada el **siete de agosto del dos mil quince** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.



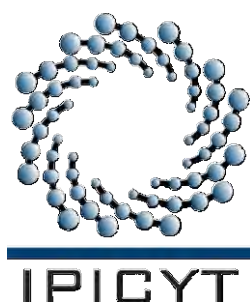
Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo
Director de la tesis



Dr. Vladimir Alonso Escobar Barrios
Miembro del Comité Tutorial



Dr. Luis Felipe Cházaro Ruiz
Miembro del Comité Tutorial



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en los Laboratorios de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo

Este trabajo ha sido financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (proyecto SEP-CONACYT-155656) y por la Fundación Marcos Moshinsky (Cátedra Marcos Moshinsky 2013-2014). Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, 296830) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 020 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias Ambientales está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 7 días del mes de agosto del año 2015, se reunió a las 10:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Vladimir Alonso Escobar Barrios	Presidente	IPICYT
Dr. Luis Felipe Cházaro Ruiz	Secretario	IPICYT
Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS AMBIENTALES

sustentó la C.

Aracely Sarai Cruz Zavala

sobre la Tesis intitulada:

Biotransformación anaerobia de iopromida, empleando sustancias húmicas insolubles como mediadores redox

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo


El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 12:33 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 7 días del mes de agosto de 2015.


Mtra. Yvonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



ÍNDICE

Sección	Página
Dedicatorias	vii
Agradecimientos	viii
Lista de Tablas	ix
Lista de Figuras	x
Lista de acrónimos y símbolos	xiii
Resumen	xvi
Abstract	xviii
1. Introducción	1
2. Antecedentes	2
2.1 Sustancias Húmicas	2
2.1.1 Ácidos Húmicos	4
2.1.2 Humiatos: Interacción de las SH con metales y minerales	7
2.2 Mediador Redox	8
2.2.1 Sustancias Húmicas como Mediador Redox	10
2.2.1.1 Sustancias húmicas inmovilizadas como Mediador Redox	11
2.3 Medio de contraste yodado: iopromida	13
2.3.1 Propiedades de la iopromida	15
2.3.2 Biodegradación de iopromida	17
2.3.2.1 Biodegradación de compuestos haloaromáticos	18
2.3.3. Deshalogenación Reductiva	20
2.3.3.1 SH en procesos de deshalogenación reductiva.	21
2.4 Proceso de granulación	23
3. El problema	26
3.1 Justificación del estudio	27
3.2 Hipótesis	28

3.3 Objetivo general	29
3.3.1 Objetivos específicos	29
4. Metodología	30
4.1 Síntesis y caracterización de complejos insolubles HA-M	30
4.2 Porcentaje de metal en los complejos HA-M	30
4.3 Determinación de la actividad catalítica redox	31
4.3.1 Capacidad Aceptora de Electrones (CAE)	31
4.3.2 Análisis electroquímicos: Voltamperometría cíclica	32
4.4 Biotransformación anaerobia de la iopromida empleando complejos insolubles HA-M como MR.	33
4.4.1 Biotransformación anaerobia en cultivos en lote.	34
4.4.2 Biotransformación anaerobia en reactores en continuo	34
5. Resultados y discusión	36
5.1 Caracterización fisicoquímica de los humiados sintetizados	36
5.1.1 Fracciones de hierro en HA-Fe	39
5.1.2 Grupos funcionales en las estructuras HA-M: FTIR	42
5.2 Actividad catalítica redox de los humiados HA-M	49
5.2.1 CAE de los humiados	49
5.2.2 Análisis de Voltamperometría cíclica	51
5.3 Biotransformación anaerobia de iopromida empleando complejos insolubles HA-M como MR	58
6. Conclusiones	67
7. Bibliografía	69

Dedicatorias

Quiero dedicar este trabajo primeramente a **DIOS** nuestro señor por brindarme la oportunidad de culminar mis estudios de maestría, para contribuir al desarrollo de nuestro país.

A mi familia, por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad; muchos de mis logros se los debo a ustedes entre los que se incluye este. Gracias por motivarme y darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba, a ustedes mi corazón y mi agradecimiento.

Y por supuesto a ti, **Mi amor**, por tu paciencia y comprensión, tú ayuda ha sido fundamental, has estado conmigo en los momentos turbulentos. Este proyecto no fue fácil, pero estuviste motivándome y ayudándome hasta donde tus alcances lo permitían, te lo agradezco mucho,
TE AMO.

Agradecimientos

Primeramente agradezco al IPICYT y en especial a la División de Ciencias Ambientales por haberme aceptado y abrirme las puertas de su seno científico para poder estudiar mi maestría, así como a los diferentes profesores y técnicos que elaboran en esta institución, que brindaron su conocimiento y apoyo para poder culminar este trabajo de tesis.

Un agradecimiento singular le debo al Dr. Francisco Cervantes Carrillo, que como director de esta tesis, me ha orientado, apoyado y corregido en mi labor científica con un interés y una entrega que sobrepasado, todas las expectativas que, como alumna, deposite en su persona.

Y para finalizar, agradezco a mis compañeros y amigos de estos dos años de la maestría, ya que gracias al compañerismo, amistad y apoyo moral han aportado en un alto porcentaje a mis ganas de seguir adelante en mi carrera profesional.

Lista de Tablas

Tablas	Página
1. Sustancias Húmicas inmovilizadas (Martínez et al. (38))	11
2. Ejemplos de concentración (ng L ⁻¹) de iopromida en diferentes aguas.	14
3. Características de la iopromida	16
4. Características de gránulos importantes para el funcionamiento de un sistema de tratamiento anaerobio de flujo ascendente	24
5. Análisis elemental de las sustancias húmicas	36
6. COT y concentración de los metales divalentes hierro y calcio presentes en las muestras lote α	37
7. COT y concentración de los metales divalentes hierro y calcio presentes en las muestras lote β	37
8. Fracciones de Fe presentes en el complejo HA-Fe	38
9. CAE de leonardita del lote α (α HA) y complejos	49
10. CAE de la leonardita del lote β (β HA) y complejos	50
11. Velocidad y porcentaje de reducción en la biotransformación en lote de la iopromida	59
12. Concentración de metales Ca y Fe en los efluentes de R-Ca y R-Fe, respectivamente	61
13. Velocidad de reducción y porcentaje de reducción en la biotransformación de iopromida en bio-reactores en continuo.	62

Lista de Figuras

Figura	Página
1. Curva de titulación ácido-base para ácidos húmicos. Gráfico de ΔQ (mol/kg) en función del pH	4
2. Estructura hipotética sencilla de HA sugerida por Flaig (1960)	4
3. Red estructural de HA de Leonardita sugerida por Schulten (1994)	5
4. Compuestos Químicos acoplados con un núcleo de benceno en HA Schulten (1999)	6
5. Formas de unión de HA, cationes polivalentes y diferentes estructuras. Stevenson (1985)	7
6. Mecanismo propuesto para la reducción anaerobia de contaminantes electrofílicos y Fe(III) utilizando mediadores redox. CMO, compuestos más oxidados; CPH, compuestos polihalogenados; CDH, compuestos deshalogenados; CN, compuestos nitroaromáticos	10
7. Estructura química de la iopromida	16
8. Esquema de degradación de 3-Clorobenzoato	21
9. Reacciones que intervienen en una biotransformación reductiva de contaminantes electrofílicos	23
10.(a) Humiados de hierro (II) HA-Fe liofilizado del lote α (b) Humiato de hierro (II) HA-Fe liofilizado del lote α	36
11. Porcentaje de COT y metales divalentes de hierro y calcio en la leonardita	38
12. Porcentaje de COT y del Ca en los complejos HA-Ca	38
13. Porcentaje de COT y del Fe en los complejos HA-Fe.	39
14. Gráfico de la conformación porcentual de Fe presente en los complejos α HA-Fe	40
15. Gráfico de la conformación porcentual de Fe presente en los complejos β HA-Fe	41

16. Espectros FTIR de las muestras (a) Leonardita del lote α ; Leonardita del lote β	(b)	43
17. Espectros FTIR de las muestras (a) Leonardita del lote α ; (b) Humiato α HA-Ca		45
18. Espectros FTIR de las muestras (a) Leonardita del lote β ; (b) Humiato β HA-Ca		46
19. Espectros FTIR de las muestras (a) Leonardita del lote α ; (b) Humiato α HA-Fe		47
20. Espectros FTIR de las muestras (a) Leonardita del lote β ; (b) Humiato β HA-Fe		48
21. a. Voltamperograma del medio mineral [BCO]; b. Voltamperograma de la muestra de Leonardita [HA]		51
22. Voltamperogramas de la muestra de Leonardita antes del pulso de potencial [HA] y después [HA-DR], ambos en dirección catódica		52
23. a. Voltamperograma del humiato de calcio [HACa] antes del pulso de potencial de -0.302 V (vs. Ag/AgCl/KCl(sat.)); b. Voltamperograma del humiato de calcio [HACa-DR] después del pulso de potencial.		53
24. a. Voltamperograma del humiato de calcio [HAFc] antes del pulso de potencial de -0.302 V (vs. Ag/AgCl/KCl(sat.)); b. Voltamperograma del humiato de hierro [HAFc-DR] después del pulso de potencial		54
25. Voltamperograma del humiato de calcio [HA-Ca] y del buffer de fosfatos [Bco]		55
26. Voltamperogramas del humiato de calcio antes [HA-Ca] y después [HA-Ca_DR] del pulso de potencial de -0.302 V (vs. Ag/AgCl/KCl(sat.)).		56
27. Voltamperogramas del humiato de hierro [HA-Fe] y del buffer de fosfatos [Bco]		57
28. Voltamperograma del humiato de hierro antes [HA-Fe] y después [HA-Fe_DR] de del pulso de potencial de -0.302 V (vs. Ag/AgCl/KCl(sat.)).		57
29. Disminución de la concentración de iopromida en las pruebas en lote después de 32 días de incubación (Estéril) Control estéril; (Lodo)		

Control con lodo anaerobio activo; (HA) Sistema con α HA como MR; (HAFe) Sistema con α HA-Fe	58
30. Porcentaje de Remoción de DQO durante la operación de los reactores antes y durante la biotransformación de iopromida en continuo (a) R-Co Bio-reactor control sin MR; (b) R-Fe Bio-reactor con HA-Fe como MR; (c) R-Ca Bio-reactor con HA-Ca como MR.	60
31. Disminución de la concentración de iopromida en bio-reactores UASB que operaron en continuo por 52 días. R-Co: Bio-reactor control sin MR; R-Fe: Bio-reactor con HA-Fe como MR; R-Ca: Bio-reactor con HA-Ca como MR	61
32. Reacciones redox involucradas en la biotransformación de la iopromida empleando humiatsos como MR en un reactor UASB.	63
33. Micrografías de SEM de muestras del lecho de lodos del bio-reactor R-Ca con el MR HA-Ca. (a) Gránulos formados en el lecho de lodos, 50 aumentos; (b) Acercamiento de un gránulo de la micrografía (a), 250 aumentos; (c) y (d) Superficie de dos gránulos diferentes, 4000 aumentos	64
34. Análisis químico EDS de la zona mostrada en la micrografía SEM de la superficie de un gránulo con 4000 aumentos, imagen (c) de la Figura 32.	65
35. Micrografías de SEM de muestras del lecho de lodos del bio-reactor R-Fe con el MR HA-Fe. (a) Gránulos formados en el lecho de lodos, 50 aumentos; (b) Acercamiento de un gránulo de la micrografía (a), 250 aumentos; (c) y (d) Superficie de dos gránulos diferentes, 4000 aumentos.	65
36. Análisis químico EDS de la zona mostrada en la micrografía SEM de la superficie de un gránulo con 4000 aumentos, imagen (d) de la Figura 34.	66

Lista de acrónimos y símbolos

PTAR	Planta de tratamiento de aguas residuales
ICM	Medio de contraste iodado
HS	Sustancias húmicas
MR	Mediadores redox
MRH	Microorganismos reductores de humus
AOX	Haluros orgánicos adsorbibles
K_{ow}	Coefficiente de reparto octanol-agua
SRT	Tiempo de retención de sólidos
MS	Espectrometría de Masas
OECD	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos
HX	Representación de un halogenuro de hidrógeno
CO₂	Dióxido de carbono
UASB	Reactor anaerobio de flujo ascendente
E_{0'}	Potencial redox estándar
NOM	Materia orgánica natural
HA	Ácidos húmicos
FA	Ácidos fúlvicos
Fe	Metal hierro
AQDS	Antraquinona-2-6-disulfonato
pKa	Logaritmo de la constante de disociación ácida
ΔQ	Cambio en la cantidad de calor
PY-GC/MS	Pirolisis-cromatografía de gases/espectrometría de masas

Py-FIMS	Pirolisis-espectrometría de masas con ionización de campo
RMN ¹³C	Resonancia Magnética nuclear de ¹³ C
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
LD₅₀	Dosis letal media
ED₅₀	Dosis efectiva media
HCA	Hexacloroetano
Ea	Energía de activación
mM	Concentración milimolar
HA-M	Forma general de nombrar los complejos insolubles sintetizados
HA-Fe	Humiato de hierro
HA-Ca	Humiato de calcio
COT	Carbono orgánico total
ICP-AES	espectroscopia de emisión atómica de plasma acoplado por inducción
CAE	Capacidad aceptora de electrones
VC	Voltamperometría cíclica
CA	Cronoamperometría
EHS	Electrodo estándar de hidrógeno
SSV	Sólidos suspendidos volátiles
R-Co	Reactor en continuo control
R-Ca	Reactor en continuo con HA-Ca
R-Fe	Reactor en continuo con HA-Fe
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
α HA	Ácidos húmicos del lote α

α HA-Ca	Humiato de Calcio del lote α
α HA-Fe	Humiato de Hierro del lote α
β HA	Ácidos húmicos del lote β
β HA-Ca	Humiato de Calcio del lote β
β HA-Fe	Humiato de Hierro del lote β
IHSS	Sociedad Internacional de Sustancias húmicas

Resumen

Biotransformación anaerobia de iopromida, empleando sustancias húmicas insolubles como mediadores redox.

PALABRAS CLAVE: Iopromida, biotransformación, humiados, mediador redox

Las sustancias húmicas (HS) y sus análogos quinonas han sido extensamente estudiadas en procesos de biotransformación reductiva, actuando como mediadores redox, incrementando la velocidad de reducción de una amplia gama de contaminantes recalcitrantes, como colorantes azo, compuestos nitroaromáticos y compuestos polihalogenados, pero su potencial no ha sido explotado a escala real, debido a que presenta ciertas limitaciones, como su alta solubilidad en medio acuoso, que dificulta mantenerlos en los sistemas de tratamiento de aguas residuales. Existe toda una línea de investigación sobre la inmovilización de sustancias húmicas en diversas matrices para resolver este problema, en este trabajo se logra por primera vez, co-inmovilizar sustancias húmicas y un consorcio de microorganismos reductores de humus, a través del proceso de granulación que se lleva a cabo en los reactores tipo UASB desarrollando un nuevo concepto de inmovilización sin requerir un material de soporte físico. Estas sustancias húmicas co-inmovilizadas conservan las ventajas de los ácidos húmicos, mediadores redox solubles, baratos, eficientes y amigables con el ambiente para las biotransformaciones en condiciones anaerobias.

La actividad catalítica de los gránulos formados, se probó en la biotransformación de un contaminante modelo iopromida, medio de contraste iodado, considerado uno de los compuestos polihalogenados de alto riesgo del que se requiere trabajar en tratamientos que faciliten su eliminación de las aguas residuales. Los tratamientos biológicos anaerobios no habían sido estudiados para este tipo de contaminante por lo que resultaba de sumo interés su estudio.

La biotransformación de la iopromida en condiciones anaerobias fue posible y acelerada por la presencia de los humiados de hierro y calcio, mediadores redox insoluble, obteniendo un 80% en la biotransformación de la iopromida muy por encima del porcentaje de reducción (30%) cuando no se utiliza un mediador redox en bio-reactores tipo UASB en continuo a un TRH de 30 h, después de 38 días de operación, con un periodo de adaptación de las bacterias de siete días.

En contraste en la experimentación en lote se logró una transformación del 100% del contaminante utilizando el humiato de hierro como mediador redox después de 32 días de incubación, duplicando la velocidad de reducción del contaminante usando como mediador redox el humiato de calcio.

Abstract

Iopromide anaerobic biotransformation using insoluble humic substances as redox mediators.

KEYWORDS: Iopromide, biotransformation, humiates, redox mediator

Humic substances (HS) and their analogs quinones have been extensively studied in reductive biotransformation processes, acting as redox mediators, increasing the reduction rate of a wide range of recalcitrant contaminants as azo dyes, aromatic nitrocompounds and polyhalogenated compounds, but their untapped potential to scale, because it has certain limitations, as its high solubility in aqueous media, making it difficult to keep the systems in wastewater treatment. There is a whole line of research on the immobilization of humic substances in various matrices to solve this problem, this paper is achieved for the first time, co-immobilized humic substances and a consortium of reducing microorganisms in humus, through the process of granulation. It is carried out in the UASB reactors developing a new concept of immobilization without requiring a physical support material. These co-immobilized humic substances retain the benefits of humic acids, soluble, inexpensive, efficient and friendly to the environment redox mediators for biotransformations under anaerobic conditions.

The catalytic activity of the granules formed, was tested in the biotransformation of a contaminant iopromide model, iodinated contrast, considered one of the polyhalogenated compounds at high risk of work required to facilitate their removal treatment of wastewater. Anaerobic biological treatments have not been studied for this type of pollutant so it was very important that they study.

Iopromide biotransformation anaerobically possible and accelerated by the presence of iron and calcium humiats insoluble redox mediators, obtaining 80% by biotransformation iopromide well above the reduction percentage (30%) when redox

mediator UASB bioreactors continuously at an HRT of 30 hours after 38 days of operation, with a period of adaptation of the bacteria is used seven days.

In contrast batch experimentation transformation contaminant 100% was achieved using the iron humiato as redox mediator after 32 days of incubation, doubling the rate of reduction of pollutant using the redox mediator humiato calcium.

1. INTRODUCCIÓN

La presente tesis es una investigación que tiene por objetivo principal desarrollar una forma de inmovilización de mediadores redox (MR) solubles, sin la necesidad de un soporte físico. Se buscó co-inmovilizar un consorcio que contenía microorganismos reductores de humus (MRH) y una sustancias húmicas (SH) insoluble; con propiedades físicas y químicas que le permitieron actuar como un MR en estado sólido, conservando las ventajas de los ácidos húmicos (HA), MR solubles; baratos y eficientes para la biotransformación reductiva de contaminantes recalcitrantes, a través del proceso de granulación.

En el escrito se manejan las siguientes secciones:

En un primer apartado se presentan los antecedentes de la investigación, aspectos teóricos sobre la procedencia y clasificación de las SH, así como los avances que se tienen en relación a su actividad como MR; De igual manera se da a conocer el contaminante modelo que se utilizó para determinar la actividad catalítica en el transporte de electrones, en una biotransformación anaerobia.

La sección dos aborda el problema, la justificación así como la relevancia de la investigación, incluyendo la hipótesis y los objetivos del proyecto, lo que permite entrar de lleno a la metodología experimental, que se describe en la siguiente sección. La metodología abarca desde la síntesis de las SH insolubles, su caracterización y la capacidad que tienen para el transporte de electrones así como las pruebas con el contaminante modelo.

Posteriormente se analizan y discuten los resultados obtenidos de la parte experimental para finalizar en la última sección con las conclusiones y algunas recomendaciones para futuras investigaciones.

2. ANTECEDENTES

2.1 Sustancias Húmicas.

Las sustancias húmicas, quizá mejor descritas como sustancias recalcitrantes, de color oscuro, son compuestos orgánicos heterogéneos producidos como subproductos del metabolismo microbiano, son los materiales orgánicos más ampliamente distribuidos en el planeta ⁽⁶⁰⁾ y que presentan un importantes rol en el transporte de metales y la fertilidad del suelo. ⁽³⁸⁾ Los primeros esfuerzos por caracterizar este material dio como resultado el siguiente esquema de fraccionamiento basado en solubilidad en condiciones ácidas o alcalinas: humina, la fracción insoluble de las SH, formada por humiatos; ácidos húmicos (HA), la fracción soluble en condiciones alcalinas, pero no en condiciones ácidas (pH generalmente < 2); y ácidos fúlvicos (FA), la fracción soluble en cualquier condición de pH.

Uno de los modelos para describir las SH es la asociación supramolecular, en que muchas moléculas orgánicas relativamente pequeña y diversas, forman agrupaciones unidas por enlaces de hidrógeno (puentes de H) e interacciones hidrófobas, llamadas Clusters. ^(46, 60) Un resultado de este modelo es el concepto de estructura micelar, es decir, una disposición de las moléculas orgánicas en solución acuosa para formar regiones hidrofílicas exteriores e hidrofóbicas en el interior.

Las SH se caracterizan por su color (desde el amarillo al negro), su variado peso molecular y por la presencia de grupos funcionales oxigenados (carboxílicos, OH de ácidos fenólicos, OH alcohólicos, y C=O de quinonas). Son ubicuas en el medio natural, encontrándose tanto en medio ambientes terrestres como acuáticos, tal es así que representan el 60-70% de la materia orgánica del suelo y el 30-50% de la materia orgánica del agua superficial.

Son componentes muy importantes del suelo, afectando sus propiedades físicas y químicas y aumentando la fertilidad del mismo. En sistemas terrestres y acuáticos las SH afectan la química, los ciclos y la biodisponibilidad de elementos químicos,

como también el transporte y degradación de xenobióticos y compuestos orgánicos naturales, comportándose como un mecanismo de autodepuración. Además, su alto contenido de grupos ácidos (carboxílicos y fenólicos, principalmente) le otorgan propiedades reguladoras del pH; además, gracias a la presencia de grupos funcionales con actividad redox hace que funcionen como: 1) un electro-aceptor terminal para respiración microbiana, 2) Un transportador de electrones entre un electro-donador y un electro-aceptor y 3) Un electro-donador para la reducción microbiana de electro-aceptores más oxidados. ⁽²⁾

Las SH son agentes quelantes, que incrementan la disponibilidad de óxidos de Fe (III), promoviendo una mayor biodegradación de hidrocarburos por la reducción del Fe (III) por microorganismos en comparación con algunos otros compuestos quelantes sintéticos.⁽³⁶⁾ Se observó que las bacterias *Geobacter metallireducens* y *Shewanella alga* pudieron usar ácidos húmicos (HA) y compuestos húmicos modelo (antraquinona-2-6-disulfonato [AQDS]) como electro-aceptores terminales acoplado a la oxidación anaerobia de acetato e hidrógeno.⁽³⁷⁾ El término de microorganismo reductor de humus (MRH) se usa generalmente para aquellos que poseen la capacidad de acoplar la oxidación de sustratos orgánicos o hidrógeno a la transferencia extracelular de electrones a SH sin tener en cuenta la vinculación con el crecimiento microbiano.

Las propiedades ácido-base de las SH se determinan por varios sitios con diversas energías de enlace. Los tipos más dominantes son los grupos carboxílicos, con pK_a entre 3 y 5, y fenólicos, con pK_a entre 8 y 10. Como resultado, la dependencia con el pH de la carga (debida a disociación) de las sustancias húmicas presenta una curva suave, con una disociación que aumenta progresivamente en un amplio rango de pH. Más aún, las propiedades ácido-base varían entre diferentes muestras, tanto en la cantidad total de sitios como en sus fuerzas de acidez relativas. En la Figura 1 se muestran una curva experimental de enlace húmico-protón (curva de titulación ácido base). ⁽⁵⁾

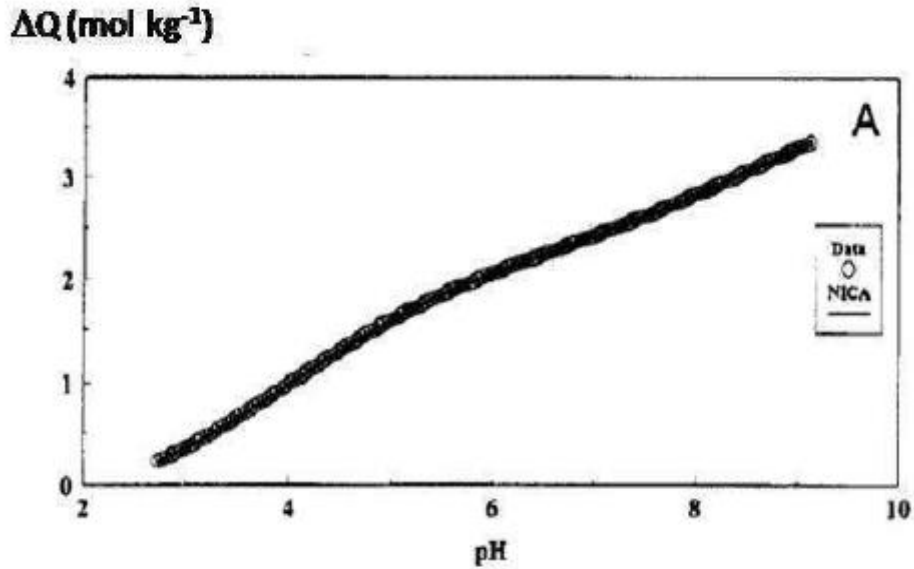


Figura 1. Curva de titulación ácido-base para ácidos húmicos. Gráfico de ΔQ (mol/kg) en función del pH.

2.1.1 Ácidos Húmicos.

Los HA del suelo consisten en micelas poliméricas basadas en anillos mono o poli aromáticos que presentan puentes por $-O-$, $-CH_2-$, $-NH-$, $N=$, $-S-$ y otros átomos o grupos moleculares⁽⁵⁸⁾. La Figura 2 muestra una estructura hipotética sencilla de HA según lo sugerido por Flaig⁽¹⁸⁾ que contiene varios grupos reactivos OH y COOH.

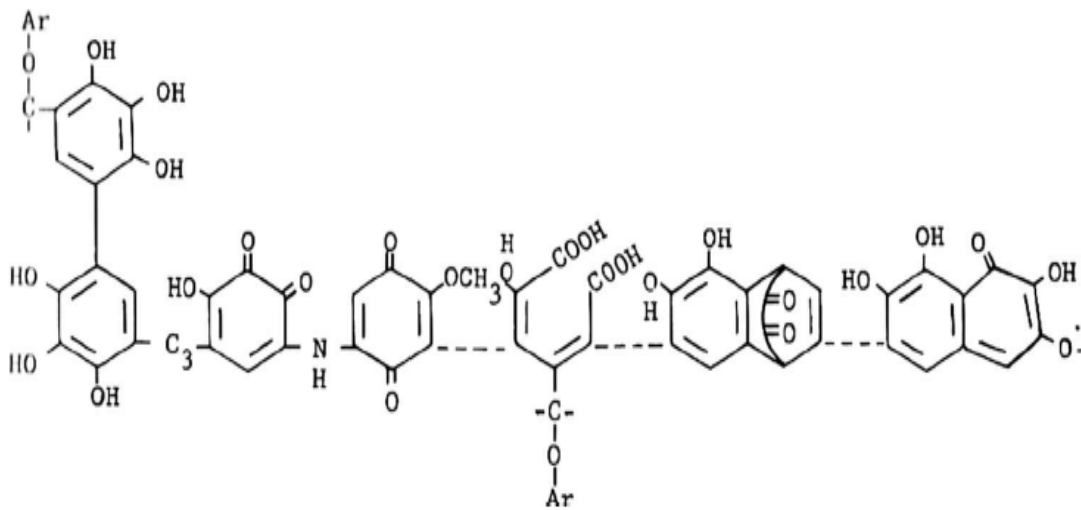


Figura 2. Estructura hipotética sencilla de HA sugerida por Flaig (1960)

Schulten⁽⁵³⁾ sugirió una red estructural a base de carbono más compleja para los HA del suelo que se muestran en la Figura 3. Este modelo se construyó con base en los datos analíticos recopilados por PY-GC/MS, Py-FIMS, RMN ¹³C y por la degradación química oxidante y reductora de varias preparaciones de HA. No solo se compone de estructuras aromáticas químicamente acopladas, si no de restos alifáticos.

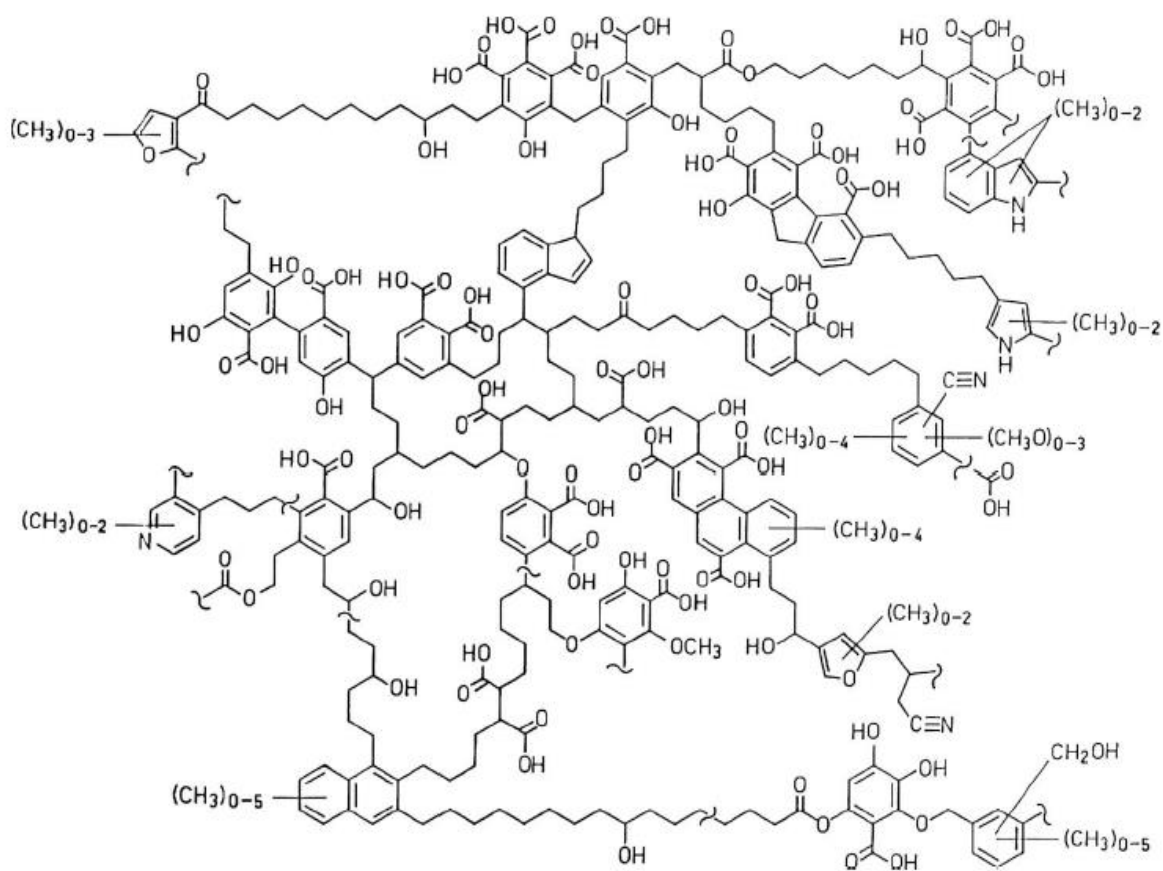


Figura 3. Red estructural de HA de Leonardita sugerida por Schulten (1994)

El mismo autor ⁽⁵⁴⁾ sugirió una amplia variedad de isómeros aromáticos a que están acoplados con núcleos aromáticos en HA (Figura 4).

En una reciente revisión Sutton y Sposito ⁽⁶⁰⁾ designaron a los HA como colecciones de diversos componentes de masa molecular relativamente baja, formando

asociaciones dinámicas y estabilizadas por interacciones hidrófobas y enlaces por puente de hidrógeno. De todas maneras la estructura de Schulten y Schnitzer es importante porque allí pueden apreciarse los principales grupos funcionales y las partes aromáticas y alifáticas del mismo, que determinan el comportamiento de estas sustancias y sobre todo su interacción con cationes, que es un tema importante en esta tesis.

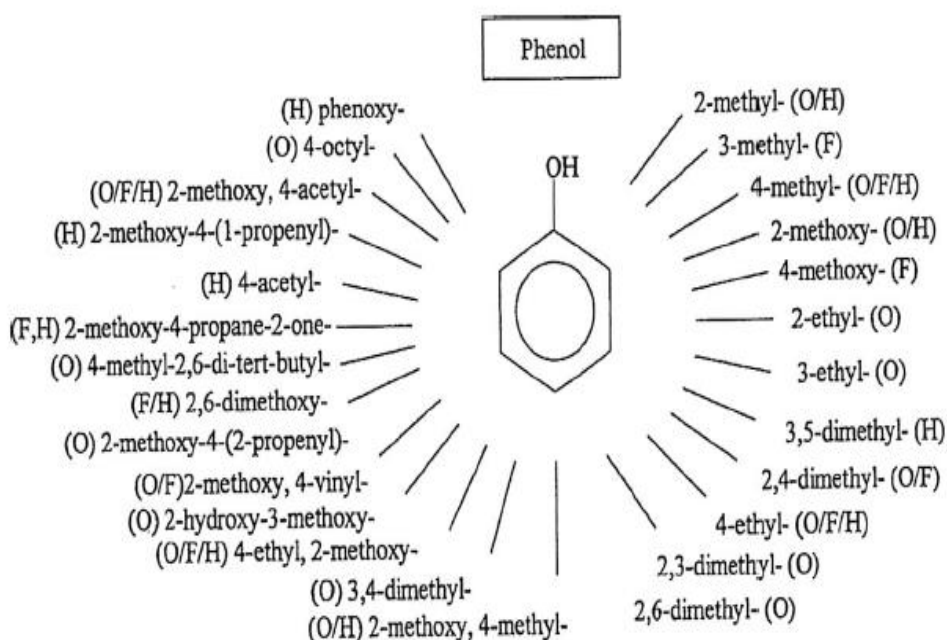


Figura 4. Compuestos Químicos acoplados con un núcleo de benceno en HA Schulten (1999)

De manera general pueden describirse como residuos aromáticos y alifáticos unidos covalentemente, con grupos carboxílicos, fenólicos y alcoxi principalmente, aunque también se ha propuesto la existencia de ésteres de sulfato y fosfato, semiquinona e hidroquinonas.⁽²⁶⁾ Por su ya mencionado alto contenido de residuos aromáticos - alifáticos y el contenido relativamente bajo de grupos carboxílicos ionizables, las sustancias húmicas se agregan fácilmente y precipitan al alcanzar neutralización de sus cargas.

2.1.2 Humiados: Interacción de las SH con metales y minerales.

Las SH poseen un rol determinante en el comportamiento y destino de los iones metálicos en el ambiente. En un medio ambiente se establece una competencia entre iones nocivos para los organismos vivos (Pb, As, Cd, etc.) como los naturales del medio (Ca, Na, Mg, etc.) y los protones por los sitios de enlace de las sustancias húmicas, por lo que aún una baja concentración de metales pesados puede alterar las concentraciones libres típicas de iones como Ca(II) y Mg(II), sumado a los efectos tóxicos de los primeros. Los FA, debido a sus pesos moleculares más pequeños y su mayor contenido de grupos funcionales ácidos, pueden formar complejos metálicos más solubles, biodisponibles y móviles que los formados por los HA. Por lo tanto, los FA pueden actuar como transportadores de iones metálicos en solución en suelos, mientras que los HA tienden a inmovilizar y acumular los iones metálicos en las fases sólidas, formando humiados.

Entonces, como ya se mencionó en ambientes naturales los HA están asociados con minerales y metales. ⁽⁵⁸⁾ Las formas de unión entre HA, los cationes de metales polivalentes y diferentes estructuras alifáticas se muestran esquemáticamente en la Figura 5.

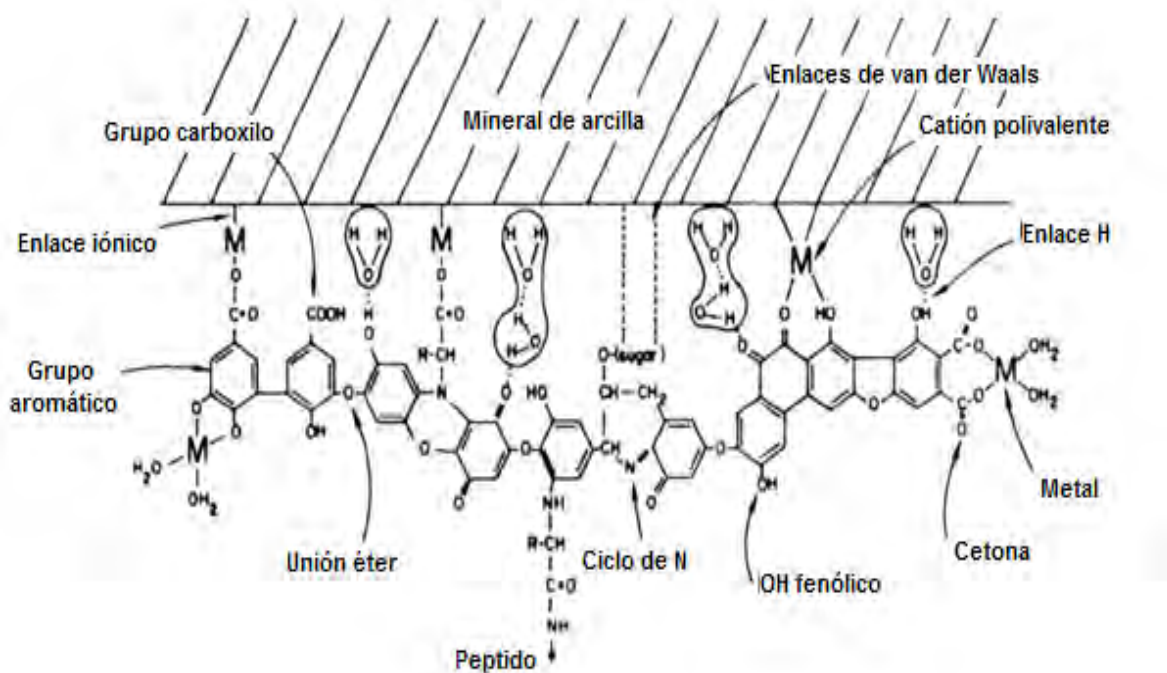


Figura 5. Formas de unión de HA, cationes polivalentes y diferentes estructuras. Stevenson (1985)

Hay dos clases principales de grupos funcionales con particular importancia: grupos carboxílicos y fenólicos, que a su vez son los que otorgan las características ácido base a estas sustancias. También pueden estar presentes grupos amino, sulfhidrilos y quinonas, y poseer fuertes interacciones con trazas de iones metálicos. Sin embargo, como su número es mucho menor, su contribución al enlace de iones es también generalmente pequeño, aunque bajo ciertas condiciones puede ser sustancial. ⁽⁶⁾

Los intentos por encontrar modelos que describan el enlace de cationes (sobre todo metálicos, además del protón) a sustancias húmicas se inició hace varios años. ^(36,58) Este tipo de modelos se enfoca en obtener la especiación de algunos iones metálicos en ambientes naturales, de manera directamente relacionada con los estudios de riesgo ambiental. Las constantes de enlace de metal obtenidas eran condicionales, dependiendo su valor de las condiciones experimentales. Idealmente, las constantes de enlace deberían ser una propiedad intrínseca de la sustancia húmica, no variando con la química de la solución. La capacidad de tener en cuenta competición entre metal y protón y, sobre todo, entre dos metales resulta un desafío para dichos modelos. Estas dificultades son inevitables cuando se tratan de SH, que se originan por la complejidad propia del sistema. Las bases de esta complejidad son la heterogeneidad de sitios de enlace, la estequiometría variable de las reacciones de enlace y la presencia de interacciones electrostáticas, es por ello que aún falta mucho por indagar en el comportamiento de los complejos formados con las SH.

2.2 Mediador Redox.

Existe un alto potencial para convertir contaminantes que contienen grupos electrofílicos en sus estructuras, empleando bio-reactores anaerobios de alta tasa como los reactores tipo UASB. Sin embargo, la transformación reductora de estos compuestos recalcitrantes se da lentamente por cuestiones de toxicidad y limitaciones de transferencia de electrones lo que con lleva a obtener bajos rendimientos o incluso el colapso de los bio-reactores anaerobios.

Para combatir la limitación en la transferencia de electrones se han explorado los efectos catalíticos de diferentes compuestos, llamados mediadores redox (MR), en el transportadores de electrones, estos compuestos son moléculas orgánicas que se oxidan y reducen de manera reversible, lo que le confiere la capacidad de transportar electrones de una molécula a otra en diversas reacciones tipo redox.

Los MR actúan como un catalizador al acelerar las reacciones, pues disminuyen la energía de activación de la reacción total. ⁽⁶⁵⁾

Se ha observado que a veces resulta un pre-requisito el uso de estos mediadores para que la reacción proceda. Para el caso de contaminantes polihalogenados las reacciones redox que involucran la re-oxidación de MR que incluye la transferencia de electrones desde una reducción abiótica, materiales húmicos son los MR más estudiados. ⁽²³⁾

Para que el MR tenga un efectivo transporte de electrones, su potencial redox estándar (E^0) debe estar idealmente entre los potenciales de las semi-reacciones involucradas, aunque como la eficiencia también se ve influenciada por la energía de activación de la reducción y oxidación en comparación con la energía de activación de la reacción total no mediada, puede ocurrir que incluso los compuestos con E^0 menor que el donante de electrones primario o mayor que el aceptor final de electrones puede ser también efectiva.

Peijnenburg et al. ⁽⁴⁴⁾ demostró que la tasa de reducción de varios hidrocarburos halogenados mejoraba con el aumento de la cantidad de materia orgánica (NOM) en los sedimentos, debido a los grupos activos redox presentes que catalizaban la deshalogenación reductiva. Aunque se considera que los primeros investigadores que centran sus investigaciones en MR son Curtis & Reinhard ⁽¹²⁾ evidenciando la entrada de MR en la reducción de contaminantes polihalogenados.

2.2.1 Sustancias Húmicas como Mediador Redox.

El MR más adecuado en apoyo de la oxidación microbiana de compuestos orgánicos bajo condiciones anaerobias son ácidos húmicos y sus análogos quinoides⁽¹⁸⁾ En muchos estudios se ha indicado que el grupo principalmente responsable de la capacidad de transferencia de electrones en el humus son las quinonas.⁽¹⁷⁾ Aunque también se ha reportado que algunos grupos no quinona pueden ser parte en la transferencia de electrones.^(21,49)

La reducción microbiana de quinonas se puede vincular a la oxidación anaerobia de un gran variedad de sustratos orgánicos incluyendo alcoholes, ácidos grasos de cadena corta, monosacáridos, así como contaminantes prioritarios, tales como tolueno, cloruro de vinilo, dicloroetano y compuestos fenólicos ⁽⁶⁵⁾.

De igual manera la capacidad de transferencia de electrones de las quinonas y/o SH puede ser utilizada para soportar la transformación reductiva de contaminantes electrofílicos como colorantes azo, compuestos nitroaromáticos y compuestos halogenados, actuando como MR en reacciones que pueden ser bióticas (microbiológicas) y abióticas (Figura 6).⁽²⁾

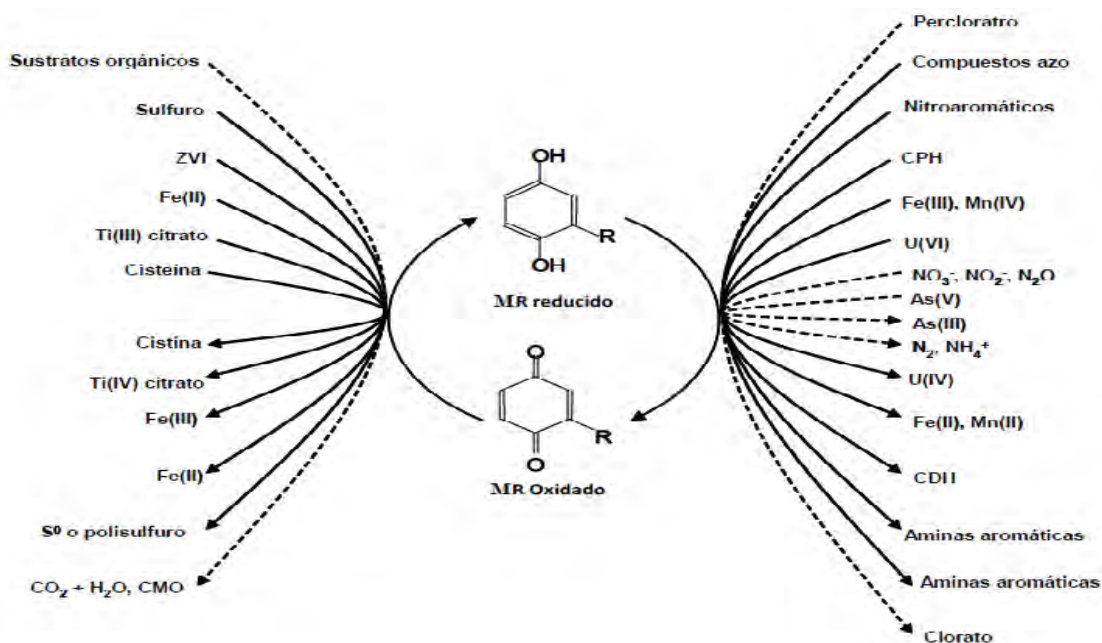


Figura 6. Mecanismo propuesto para la reducción anaerobia de contaminantes electrofílicos y Fe(III) utilizando mediadores redox. CMO, compuestos más oxidados; CPH, compuestos polihalogenados; CDH, compuestos deshalogenados; CN, compuestos nitroaromáticos ⁽⁵⁸⁾

Los procesos de biotransformación en condiciones anaerobias con SH como MR se han centrado en HA y sus análogos quinoides; hay pocos informes sobre los SH presentes en la naturaleza en estado sólido (humina). Sin embargo, se ha demostrado que los sedimentos en forma sólida tienen capacidad de transferir electrones y los complejos insolubles de HA fueron identificados como los MR.⁽⁵⁰⁾

Recientemente Zhang y colaboradores⁽⁶⁹⁾ determinaron que la presencia de humina es un requisito para la decoloración del pentaclorofenol (PCP) pues se involucra en la transferencia de electrones extracelular, junto con deshalogenación reductiva microbiana, sirviendo como receptor de electrones y donador de electrones.

2.2.1.1 Sustancias húmicas inmovilizadas como Mediador Redox

La biotransformación reductiva empleando SH y quinonas presenta ciertas limitaciones como lo es la solubilidad, que provoca la pérdida de MR en las lavadas de los reactores haciendo necesaria la adición continua de SH o quinonas para incrementar la velocidad de conversión, lo cual es económica y ambientalmente inviable. Una forma posible de erradicar el requisito de la adición continua de MR a biorreactores anaerobios es mediante su inmovilización.⁽⁵⁸⁾ En la Tabla 1 se muestran algunos avances relacionados con la inmovilización de sustancias húmicas.

Tabla 1. Sustancias Húmicas inmovilizadas (Martínez et al.⁽³⁸⁾)

Mediador Redox^a	Material inmovilizador	Mecanismo de inmovilización	Resultados^c
Ácidos húmicos y fúlvicos	Epoxipropilsilica Epoxypropilcelulosa Clorometilato Estireno-divinilbenceno Poliacrilamida	Enlaces covalente y atrapamiento	Buenas propiedades de adsorción y estabilidad hidrolítica
Ácidos Húmicos de Aldrich	Aminopropil silica Glutaraldehido activado Aminopropil silica	Enlaces físicos y químicos	Buenas propiedades de adsorción y estabilidad en un amplio rango de pH.

Mediador Redox	Material inmovilizador	Mecanismo de inmovilización	Resultados
Ácidos Húmicos	Silica gel	Enlaces covalentes	Buenas propiedades de adsorción y estabilidad térmica
Ácidos Húmicos	Matrices de silica	Enlaces covalentes	Buenas propiedades de adsorción y estabilidad
Ácidos húmicos	γ -Al ₂ O ₃ (20-50 μ m)	Adsorción	Buenas propiedades adsorción y estabilidad
Ácidos húmicos	γ -Al ₂ O ₃ (20-50 μ m)	Adsorción	Buenas propiedades adsorción y estabilidad
Ácidos húmicos	Mezcla de alginato de sodio e hidroxietil celulosa	Enlace covalente	Buenas propiedades de adsorción y estabilidad
Ácido húmicos	Composito quitosano/zeolita Surfactante modificado	Interacción electroquímica e interacciones hidrofóbica	Estabilidad térmica y la capacidad de adsorción de los HA decrece con el incremento del pH de la solución entre 4 a 12

El uso de SH inmovilizadas en la biotransformación anaerobia de contaminantes recalcitrantes no ha sido tan ampliamente estudiado como las quinonas modelo. El primer reporte fue publicado por Cervantes *et al.*⁽⁹⁾, donde se inmovilizo SH sobre resinas de intercambio aniónico y su aplicación en la reducción de tetracloruro de carbono y Rojo Reactivo 2. Alvarez *et al.*,⁽³⁾ por otro lado inmovilizaron ácidos fúlvicos en alúmina para la reducción de tetracloruro de carbono mostrando una buena capacidad catalítica durante la deshalogenación de tetracloruro de carbono, con una tasa de reducción de hasta 10.4 veces mayor respecto al control sin MR.

El modelo de granulación anaerobia utilizando nanopartículas cubiertas con SH, y MRH, se basa en la teoría del espagueti propuesta por Wiegant⁽²⁵⁾. El modelo indica el uso de cationes divalentes como calcio (Ca²⁺) para promover una mejor atracción electrostática entre las SH y los microorganismos. Tanto las nanopartículas cubiertas con SH como la membrana celular de los microorganismos están

negativamente cargadas a pH neutro, por lo que los iones Ca^{2+} ayudan a disminuir las fuerzas de repulsión entre las SH y los microorganismos. ⁽²¹⁾

2.3 Medio de contraste yodado: iopromida.

Los ICM de rayos X utilizados para obtener imágenes de tejidos blandos, son productos farmacéuticos aplicados en dosis elevadas de hasta 200 g, son biológicamente inertes y metabólicamente estables durante su paso a través del cuerpo, más del 80% de estas sustancias altamente hidrofílicas se excretan a través de la orina y terminan en aguas residuales. ⁽⁵⁷⁾ Se componen de un anillo de benceno que lleva tres átomos de yodo. Las restantes posiciones del anillo aromático son cadenas que determinan hidrofiliidad, la tolerancia farmacéutica y el comportamiento fármaco-cinético. ⁽²⁸⁾

Oleksy-Frenzel y colaboradores ⁽⁴³⁾ reportaron que los compuestos orgánicos que contiene yodo contribuyen significativamente a la concentración de Haluros Orgánicos Adsorbibles (AOX, siglas en ingles) en los efluentes de aguas residuales municipales, por lo cual los ICM contribuyen a este aumento en la concentración de AOX por el yodo unido orgánicamente en la estructura de estos medicamentos. El AOX originado a partir de los ICM muestra una eliminación baja en plantas de tratamiento de aguas residuales, lo que sugiere que presentan una muy baja biodegradabilidad. En los últimos años el uso de ICM ha aumentado considerablemente debido al fuerte incremento que han experimentado los procedimientos basados en la obtención de imágenes. Este hecho ha dado lugar a que el consumo mundial de los medios de contraste derivados del benceno triiodado sea de unas 3500 toneladas por año. ^(48,19) Como consecuencia, los ICM son vertidos al medio ambiente donde han sido detectados en aguas superficiales ^(48, 7, 61, 56, 30) y subterráneas ^(52, 61) e incluso en aguas destinadas a consumo humano. ^(7, 56, 30, 55)

Los ICM se pueden clasificar como iónicos o no iónicos, dependiendo de los sustituyentes presentes en las posiciones 1,3 y 5 del anillo bencénico. Los primeros,

poseen un grupo carboxílico terminal y en solución acuosa se encuentran disociados, lo que le confiere una mayor osmolaridad. Los de tipo no iónico, se obtienen mediante la combinación de un medio de contraste ácido con un azúcar o un alcohol polivalente, de manera que cuando se encuentra en disolución no se disocia, constituyendo una partícula eléctricamente neutra y poseen una baja osmolaridad, a este grupo pertenece la iopromida que es el ICM de estudio para este trabajo.

Tabla 2. Ejemplos de concentración (ng L⁻¹) de iopromida en diferentes aguas.

Tipo de agua	Concentración (ng L⁻¹)	País	Referencia
Salida PTAR Agua Superficial Agua potable	1170-4030 20-361 <1.0	Corea (Sur)	Kim, S. D. et al. (2007)
Entrada PTAR Salida PTAR	6600 9300	España	Carballa, M. et al. (2004)
Entrada PTAR Salida PTAR Agua Superficial Agua Subterránea	7500 8100 100 <10	Alemania	Ternes, T. A., & Hirsch, R. (2000).
Entrada PTAR Salida PTAR Agua superficial Agua potable	<17 4.6 2.2 4.6	USA	Trenholm, R. A et al. (2006)
Agua Subterránea	168	Australia	Trenholm, R. A et al. (2006)
Salida PTAR	152-2670	Corea (Sur)	Trenholm, R. A et al. (2006)
Entrada PTAR Salida PTAR	10700 1580	Australia	Buseti, F. et al. (2008)
Agua superficial	76-100	Alemania	Seitz, W. et al. (2006)
Agua superficial Agua potable	1600 <50	Alemania	Putschew, A et al. (2001)
Salida PTAR Agua superficial Agua potable	3070 150 40	Alemania	Hirsch, R. et al. (2000)

La iopromida es uno de los más medios de contraste de rayos X detectados con mayor frecuencia en las PTAR donde de acuerdo a estudios de monitoreo de iopromida no se muestra su eliminación (Tabla 12).^(8, 52)

Ante esta situación, se han llevado a cabo estudios de degradación, tanto en procesos biológicos como químicos, obteniendo como resultado, la escasa degradación de la iopromida junto con una nula mineralización.^(12,7,22) El comportamiento de iopromida investigado en sistemas agua-sedimento revelaron una transformación en productos desconocidos después de un período de rezago de dos semanas, al ser la iopromida adsorbida por partículas de sedimento en menor medida,⁽³⁵⁾ debido a su baja lipofilicidad ($\log K_{ow} = -2,33$) y debido a la ausencia de cualquier indicación de interacciones específicas con sedimentos, una acumulación de iopromida en sedimentos puede ser un importante destino.⁽⁵⁷⁾

2.3.1 Propiedades de la iopromida.

De acuerdo a la IUPAC la iopromida se nombra como 1-N,3-N-bis(2,3-dihidroxipropil)-2,4,6-triiodo-5-[(2-metoxiacetil)amino]-3-N-metilbenzeno-1,3-dicarboxamida, se obtuvo en 1978 en los laboratorios de investigación de Schering, en Berlín y actualmente se emplea en angiografía, urografía y tomografía computarizada.⁽⁴⁰⁾

La iopromida es un derivado del 2, 4, 6- triyodobenceno, con tres átomos de yodo unidos al anillo aromático, dos amidas en la posición 1 y 3 con dos grupos hidroxilo y una amida en la posición 5 con un grupo éster. La toxicidad de este ICM está determinada por sus propiedades lipofílicas y por su capacidad de provocar eventos electrofisiológicos en los organismos vivos. La primera de estas capacidades, incrementa la afinidad del compuesto a las proteínas, su toxicidad y su predisposición para provocar reacciones generales en el organismo. Al tratarse de un ICM no iónico se presenta menor riesgo potencial para el medio ambiente ya que la hidrofilia y la ausencia de cargas eléctricas, se traduce en menor unión con proteínas, menor inhibición enzimática y escaso efecto sobre la función de las

membranas biológicas. ⁽²⁰⁾ Las características fisicoquímicas de la iopromida, así como las características preclínicas se enlistan en la Tabla 3.

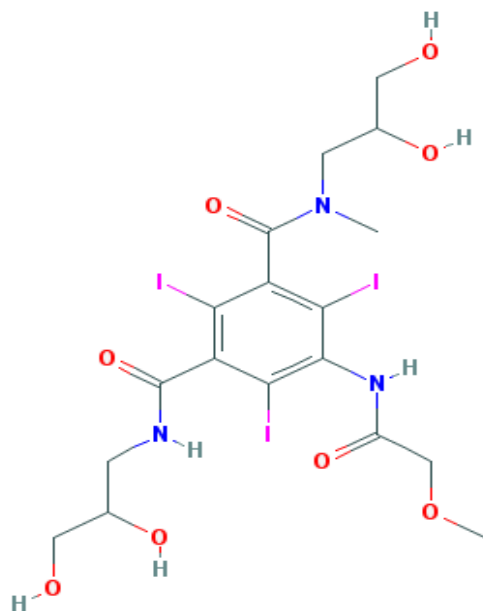


Figura 7. Estructura química de la iopromida

Tabla 3. Características de la iopromida

Propiedades Fisicoquímicas		Tolerancia ⁽⁶⁵⁾	
Peso Molecular	791	LD ₅₀ , ratón, intravenoso (g L/Kg)	16.5
% Yodo	48.1	LD ₅₀ , rata, intravenoso (g L/Kg)	11.4
Osmolalidad* (37°C) mmol Kg⁻¹ Soln: 300 mg l/mL Soln: 370 mg l/mL	607 792	ED ₅₀ , rata, intracerebral (mg L/Kg)	86
Viscosidad (37°C) mPa*s Soln: 300 mg l/mL Soln: 370 mg l/mL	4.8 9.6	ED ₅₀ , rata, intracisternal (mg L/Kg)	53
Coefficiente de Partición (1-butanol/buffer, pH 7.6)	0.14	ED ₅₀ , rata,arteria carotis (g L/Kg)	3
Densidad (37°)	1.322	ED ₅₀ , rata,arteria femoralis (g L/Kg)	>3.8

2.3.2 Biotransformación de iopromida.

Se ha demostrado que el ICM iopromida puede sufrir algún tipo de biotransformación en el proceso de lodos activados de plantas de tratamiento de aguas residuales, sin embargo la identidad y la suerte de sus metabolitos es desconocida.

Carballa et al. ⁽⁸⁾ investigó la eficiencia en la eliminación de iopromida en PTAR. Aunque este estudio se realizó en España, los resultados fueron similares a los reportados por Ternes et al. ⁽⁶¹⁾ para las PTAR alemanas. Otro estudio evaluó el efecto del SRT en la eliminación de iopromida en experimentos a escala de laboratorio con diferentes SRT (1, 12 a 15, y 30 días), en la planta funcionando con un SRT de 1 día no se observó la eliminación significativa, sin embargo al aumentar el SRT las concentraciones disminuyeron en los efluentes. ⁽¹¹⁾

Kalsh⁽²⁸⁾ y Joss et al.⁽²⁷⁾ confirmaron que en reactores de lodos activados discontinuos la iopromida se transformó en dos metabolitos durante 54 h de incubación con el lodo activado fresco.⁽²⁸⁾ La transformación comenzó sin una fase de demora y el 85% de la iopromida estaba sujeta a la degradación primaria. Aunque se hicieron intentos para caracterizar los dos metabolitos en este estudio, la formación de depósitos de yoduro inorgánico en el medio de ensayo sugirió la desiodación parcial de iopromida. Lecouturier et al. ⁽³⁴⁾ también reportó la desyodación de ácido 5-amino-2,4,6-triyodoisoftálico, un precursor y un intermediario en la degradación anaerobia de ICM en los lodos de aguas residuales. La conversión de 5-amino-2,4,6-triyodoisoftálico ocurrió sólo cuando se adicionó un electrodonador, produciendo tres intermediarios de la desiodación reductora. Dos de los metabolitos se identificaron como ácido 5-amino-2,4-diiodoisoftálico y el ácido 5-aminoisoftálico ácido y se planteó como hipótesis que el tercero era un compuesto intermedio monoiodado.

Pérez et al.⁽⁴⁵⁾ informaron de la biotransformación de iopromida en reactores discontinuos con lodos activados convencionales y lodo activado nitrificante obtenido de PTAR municipales. La concentración de iopromida disminuyó exponencialmente sin ninguna fase de latencia en el reactor de lodos activados.

Para el día 2, la concentración de iopromida se redujo a casi el 50% y después de 9 días la biotransformación completa primaria fue de aproximadamente 90%. Estos hallazgos fueron similares a los datos de biodegradación de Kalsh⁽²⁸⁾ para lodos activados que mostró que después de una incubación durante 54 h el 85% del fármaco original se había convertido en dos metabolitos. El patrón de fragmentación de espectrometría de masas (MS) de iopromida y sus metabolitos reveló que el anillo yodado se mantuvo intacto y ocurrió una mínima transformación en las cadenas laterales durante la biotransformación, no se obtuvo información sobre la desiodación de la iopromida.

Estudios de biodegradabilidad de iopromida en un medio mineral a pH neutro con un inóculo mixto de microorganismos anaerobios derivados de una PTAR, se llevó a cabo según el ensayo normalizado de la OECD 301E⁽⁵⁷⁾ pero no se observó disminución en la concentración de iopromida durante el período de prueba de 28 días. Dando seguimiento a este estudio, se prolongó la duración del experimento a 95 días para estudiar la degradación. Los autores investigaron la degradación primaria de iopromida a diferentes concentraciones (0,1, 1, y 100 mg L⁻¹) en agua inoculada con lodos activados de una PTAR municipal. Utilizaron un sistema de ensayo que simulaba el alcantarillado de una planta de tratamiento en conformidad con la guía 303A de la OECD. Las concentraciones del influente era de 1 mg L⁻¹ hacia arriba, la iopromida fue casi cuantitativamente transformado en un solo metabolito después de un período de latencia de entre 31 a 38 días. Para la concentración más baja (0.1 mg L⁻¹) la degradación fue lenta y se inició el día 15 del experimento.

2.3.2.1 Biodegradación de compuestos haloaromáticos.

Los compuestos aromáticos halogenados son un amplio grupo de sustancias que la industria química ha sintetizado durante años para su empleo en todo tipo de aplicaciones. Como consecuencia, estas sustancias se han ido incorporando al medioambiente ya que a menudo son lanzados en cantidades sustanciales, son tóxicos y resistentes a la degradación, y puede acumularse en los sedimentos y

biota. La recalcitrancia biológica de compuestos halogenados se relaciona con el número, tipo y posición de los sustituyentes halógeno. ⁽⁴²⁾

El enlace carbono-halógeno se considera cada vez más recalcitrante con el aumento de la electronegatividad del sustituyente. Las sustancias halogenadas con uno o pocos sustituyentes se cree son más fácilmente degradables que los correspondientes compuestos polihalogenados. El enlace carbono-halógeno puede ser roto bien por deshalogenación enzimática (catalizada por enzimas específicas) o por deshalogenación química espontánea de intermediarios inestables. En cuanto a la deshalogenación enzimática del enlace carbono-halógeno, se conocen siete mecanismos ⁽³⁹⁾ hasta el momento:

- Deshalogenación reductora: Reacción de transferencia de dos electrones que implica la liberación del halógeno tal como un ion halogenuro y su sustitución por hidrógeno.
- Deshalogenación oxigenolítica: Estas reacciones son catalizadas por monoxigenasas (o dioxigenasas), que llevan uno (o dos) átomos de oxígeno molecular en el sustrato.
- Deshalogenación hidrolítica: En el curso de estas reacciones, catalizada por hidrolasas, el sustituyente halógeno se reemplaza en una reacción de sustitución nucleofílica por un grupo hidroxilo que se deriva de agua.
- Deshalogenación tiolítica: en las bacterias que usan el diclorometano, hay una sustitución nucleofílica con grupo sulfihídrico catalizando la formación de un conjugado de glutatión S-clorometilo.
- Sustitución intramolecular: desplazamiento nucleofílico intramolecular, es un mecanismo involucrado en la deshalogenación de haloalcoholes vecinales.
- Deshidrohalogenación: En la deshidrohalogenación, HX se elimina de la molécula, lo que lleva a la formación de un doble enlace.

- Hidratación: Una adición catalizada por la hidratasa de una molécula de agua a un enlace insaturado puede producir deshalogenación de compuestos vinílicos.

Las reacciones de deshalogenación anaerobia son de especial interés ambiental. Tales reacciones han sido intensamente investigado con contaminantes alifáticos y alicíclicos. Los halógenos de arilo pueden ser liberados de una molécula sólo por reducción o reacciones de deshalogenación hidrolíticas. Eliminación de haluro por hidroxilación se informó con mayor frecuencia para los compuestos aromáticos heterocíclicos, ⁽³²⁾ mientras que la deshalogenación reductiva es comúnmente asociada con sustancias aromáticas homocíclicos. ^(27,67)

2.3.3. Deshalogenación Reductiva.

La deshalogenación reductiva es un medio importante para la biodegradación de numerosos compuestos, de igual manera para varios compuestos es la única reacción para llegar a la biodegradación de ciertos contaminantes como los bifenilos policlorados (BPC) altamente clorados, hexaclorobencenos (HCB), tetracloroetileno (TCE), y el pentaclorofenol (PCP). Generalmente, este tipo de reacciones se ven favorecidas en ambientes altamente reductores condiciones anaerobias y se encuentra a menudo como el paso inicial en la biotransformación anaerobia de compuestos más haloaromáticos.

Básicamente la deshalogenación reductiva implica el desplazamiento de un halógeno de la molécula con la adición concurrente de electrones a la molécula. Referente al mecanismo un sustrato orgánico o H₂ reducido puede ser la fuente donadora de electrones y protones. Aunque, la deshalogenación podría ocurrir en una reducción de dos pasos por un donador de electrones (oxidación del sustrato orgánico) y con la abstracción de protones del disolvente. ⁽¹⁶⁾

Las primeras investigaciones se hicieron por Horowitz et al.⁽²³⁾ y Sulfita et al.⁽⁵⁹⁾ Ellos encontraron que un consorcio aislado de lodos podían degradar una serie de benzoatos clorados meta sustituidos, donde se observó la pérdida de cloruros sin

alteración del anillo aromático. Cuando se eliminaron sucesivamente todos los átomos de cloro, la ruptura del anillo llevó a metano y CO₂

Dolfing y Tiedje⁽¹³⁾ establecieron un consorcio degradante de 3-clorobenzoato, que se forma de tres microorganismos clave el encargado de la decloración (DCB-1), el degradador de benzoato (BZ-1) y el litótrofo metanógeno (cepa *Methanospirillum* PM-1). El cloro liberado del anillo aromático se recuperó en cantidades estequiométricas como ion cloruro. El poder reductor necesario para la decloración se obtuvo a partir del hidrógeno producido en la oxidación acetogénica del benzoato. Una tercera parte de este hidrógeno se consume a través de la decloración reductiva, mientras que dos tercios se dejaron para los metanógenos.

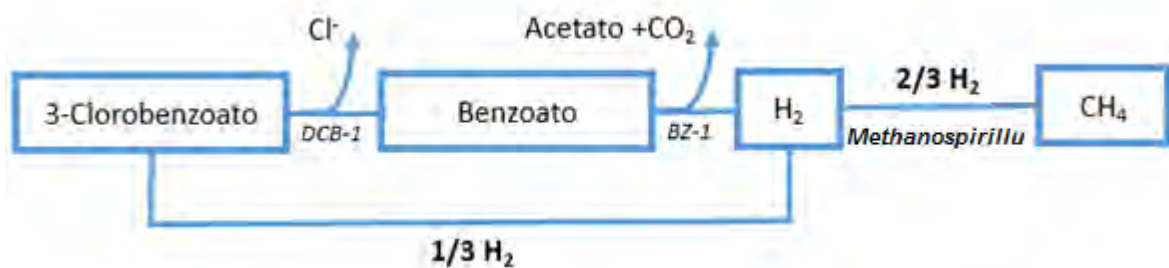


Figura 8. Esquema de degradación de 3-Clorobenzoato

2.3.3.1 SH en procesos de deshalogenación reductiva.

Van der Zee & Cervantes⁽⁶⁵⁾ describieron que el pH, temperatura, potencial redox, donadores de electrones y origen de las SH, están directamente relacionados con el papel que tienen estos MR durante transformaciones reductivas bióticas o abióticas. Hay estudios que hablan sobre el efecto del pH en los procesos de decloraciones reductivas en presencia de diferentes MR. Por ejemplo, las incubaciones abióticas para la decloración reductiva de hexacloroetano (HCA) por sulfuro (0.25mM), en presencia de ácidos húmicos del suelo (HA, 25mg C/l), mostró una relación directa entre la constante de velocidad (k) de primer orden para la reducción de HCA y el pH. El valor de k aumentó hasta ~ 5 veces variando el pH

7.2 a 8.0, la dependencia en el pH se atribuyó a la desprotonación de los grupos redox activos en HA. ⁽¹²⁾

Lo que se refiere a la temperatura, las velocidades de reacción se mejoran al aumentar la temperatura debido a que un mayor número de moléculas alcanzan una energía cinética mayor a la energía de activación (E_a). A Menor energía de activación en las reacciones mediadas se implica que la presencia de un MR facilita a los reactivos alcanzar su estado reactivo, acelerando así la transferencia de electrones. ⁽⁶⁵⁾

En lo que se refiere al potencial redox E^0 de un MR debe idealmente estar entre las dos semireacciones, la dehalogenación reductiva del contaminante captador de electrones y la oxidación de un donante de electrones primario. En otras palabras, el potencial redox de las SH deberá ser más bajo o más negativo que el potencial del contaminante electrofílico e idealmente mayor y menos negativo que el donador primario de electrones ⁽⁶⁵⁾

Dos medias reacciones están en juego durante una deshalogenación reductiva mediada por MR: 1) la reducción de grupos activos redox por un donante de electrones y la posterior deshalogenación reductiva del compuesto halogenado por el MR reducido (Figura 9). Por lo tanto, la velocidad de reacción global depende la capacidad del donante de electrones externo para transferir electrones a la MR y en la capacidad de la MR reducido para canalizar los electrones al compuesto a deshalogenar.

Según los datos experimentales disponibles en la literatura, la reducción del MR por diferente procesos químicos y biológicos, procede generalmente más rápido que la posterior transferencia de electrones de la reducción del MR a compuestos polihalogenados. Por ejemplo, la reducción de AQDS y HA por sulfuro se produce dentro de unas pocas horas⁽¹⁵⁾ mientras que la dechloración reductiva de diferentes compuestos policlorados por AQDS o HA reducido demanda varios días de incubación.^(10,12)

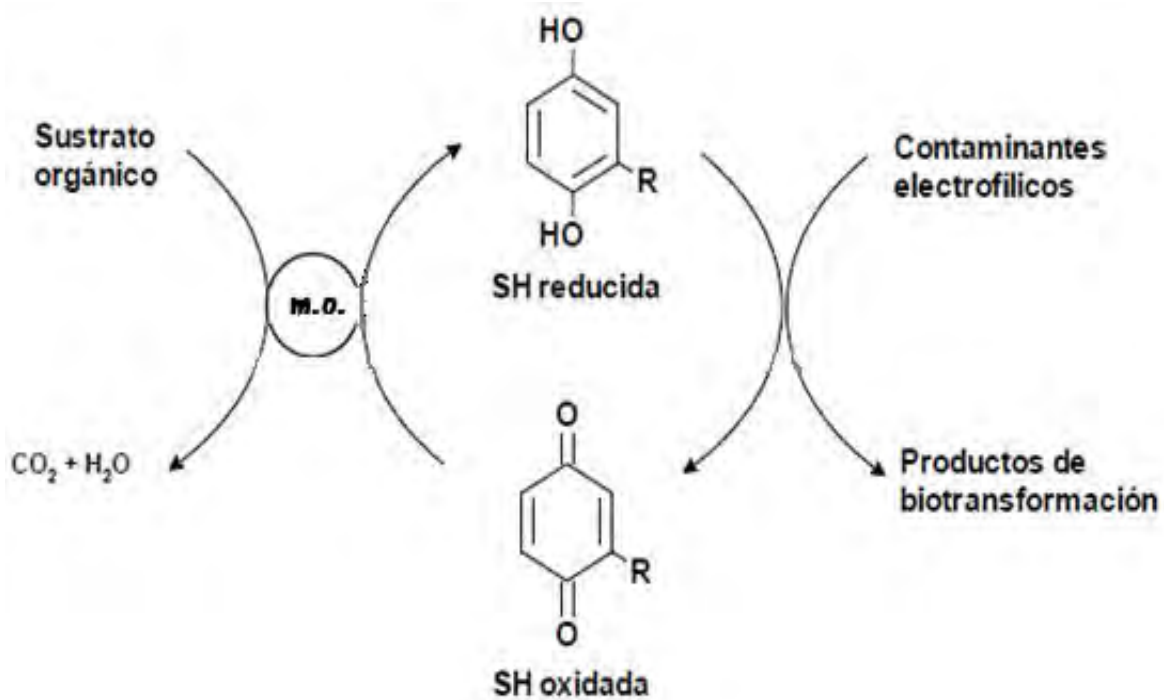


Figura 9. Reacciones que intervienen en una biotransformación reductiva de contaminantes electrofílicos

2.4 Proceso de granulación.

El reactor anaerobio de manto de lodos de flujo ascendente (UASB, por sus siglas en inglés) desarrollado por el Dr. Gatzke Lettinga y colaboradores en los años 70 en la Universidad de Wageningen (Países Bajos), inspirado en las publicaciones de Dr. Perry McCarty es el sistema de tasa alta más ampliamente utilizado para el tratamiento anaerobio de aguas residuales. Es un bio-reactor tubular que opera en continuo formando biomasa granular.

El concepto de reactor UASB se basa en los altos niveles de retención de biomasa a través de la formación de los gránulos de lodo. La clave para los bio-reactores anaerobios UASB es la inmovilización de microorganismos adecuadas para la degradación o transformación del contaminante en cuestión. La alta retención de lodo requerida sólo puede cubrirse usando biomasa inmovilizada.

La transformación de la biomasa anaerobia floculante en agregados estables se ha estudiado ampliamente. Aunque algunas de estas investigaciones se centraron en agregados de lodo acidificantes ^(41, 25, 1) o en gránulos desnitrificantes ⁽⁶⁴⁾, el término “lodo granular” se ha usado casi exclusivamente para agregados metanogénicos desarrollados en reactores de flujo ascendente.

El lodo granular se define como la biomasa con algunas propiedades muy específicas que lo hacen adecuado para sistemas de tratamiento de aguas residuales de flujo ascendente, pueden considerarse micro-ecosistemas que incluyen especies bacterianas necesarias para degradar o transformar contaminantes orgánicos presentes en aguas residuales a las que este expuesto. Las características que debe tener son: velocidad de sedimentación elevada y una alta actividad metanogénica. ⁽²⁴⁾ Morfológicamente son caracterizadas como partículas de forma regular relativamente grande ($d > 0,5$ mm) y con una superficie bien definida junto con una densidad relativamente alta. ⁽²⁵⁾

En esencia un gránulo es una forma particular de biopelícula, el cual corresponde a una asociación de varios microorganismos que están en interdependencia mutua. Diversos tipos de consorcios han sido descritos como flóculos, “pellets”, lodo floculento y gránulos. Según Dolfig (1987) “pellets” y gránulos son aglomerados con una estructura densa, que aún luego de sedimentar presentan una apariencia bien definida. En cambio, flóculos y lodo floculento presentan una estructura menos compacta y después de sedimentar forman una capa macroscópicamente homogénea. La Tabla 4 enumera las características más importantes de los gránulos.

Tabla 4. Características de gránulos importantes para el funcionamiento de un sistema de tratamiento anaerobio de flujo ascendente

Característica	Descripción
Actividad Biológica	Lo más importante es la actividad de conversión y eliminación de los componentes orgánicos de aguas residuales. En el caso de reactores UASB los factores más críticos son la actividad metanogénica específica y/o la capacidad específica de reducción de sulfatos.

Característica	Descripción
Velocidad de sedimentación	En reactores de flujo ascendente es primordial una alta velocidad de sedimentación del lodo granular para la retención de biomasa.
Fuerza mecánica	Una buena retención de biomasa en el reactor es de suma importancia para un proceso estable. Los gránulos deben ser lo suficientemente estables y resistentes a la fuerza de desintegración (cizallamiento) y las fuerzas relacionada con la formación de gas internamente para evitar la pérdida de biomasa
Desarrollo	El desarrollo de lodo granular se basa en un proceso continuo de auto-inmovilización de bacterias; los gránulos de lodo consisten en una fracción pequeña de material de soporte inerte.

3. EL PROBLEMA

El tratamiento de efluentes que contienen contaminantes recalcitrantes ha representado un problema consecuente hasta épocas actuales a nivel mundial, el reto es desarrollar sistemas eficientes para el tratamiento de efluentes que contienen este tipo de contaminantes. Existen algunas plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) en operación tanto en México como en otras partes del mundo que han demostrado claramente que los sistemas anaerobios pueden obtener altas eficiencias durante el tratamiento de efluentes industriales con algunos tipos de contaminantes recalcitrantes.⁽³¹⁾

El avance que las técnicas analíticas han experimentado en los últimos años ha permitido detectar la presencia de una serie de compuestos en las aguas naturales y residuales denominados “contaminantes emergentes”, cuyo efecto en el medio ambiente ha comenzado a suscitar inquietud. Entre estos contaminantes se incluyen pesticidas, fármacos, productos de higiene personal y fitoquímicos.⁽³³⁾ Tal es el caso de los medios de contraste yodados (ICM), empleados para la obtención de imágenes de los tejidos blandos mediante la mejora de la absorción de los rayos X, que se han detectado en concentraciones mayores en efluentes de PTAR, aguas superficiales, aguas subterráneas e incluso en agua potable que las presentadas en décadas pasadas.⁽⁵⁸⁾

Se sabe que muchos compuestos químicos orgánicos halogenados presentes en el medio ambiente son altamente resistentes a la degradación. Sin embargo, hay investigaciones que ponen de manifiesto que al someter inicialmente estos contaminantes a reacciones de deshalogenación, se puede vencer su persistencia en el ambiente.⁽³²⁾ Sin embargo, la transformación reductiva se da muy lentamente debido a las limitaciones de transferencia de electrones y por efectos de toxicidad en los consorcios microbianos anaerobios que provoca el mal funcionamiento o incluso el colapso de los bio-reactores anaerobios.^(32,29)

Durante las últimas dos décadas, se ha demostrado que el uso de sustancias húmicas (SH) y sus análogos quinonas, por la capacidad de transferencia de electrones que presentan, pueden soportar la transformación reductiva de contaminantes electrofílicos como es el caso de los compuestos halogenados, actuando como mediadores redox (MR) incrementado la velocidad de reducción en varios órdenes de magnitud, y en algunos casos es un requisito esencial para que ocurra la reacción.⁽⁶⁶⁾ Sin embargo, su potencial como mediador redox a una escala real no se ha visto explotado debido a que presenta ciertas limitaciones, como su alta solubilidad en medio acuoso, que dificulta mantenerlos en los sistemas de tratamiento de aguas residuales en los que son aplicados.

3.1 Justificación del estudio.

La detección frecuente de muchos compuestos farmacéuticos en el medio ambiente se ha convertido en una preocupación creciente debido a su potencial para dañar el medio ambiente y sus efectos negativos en la salud humana. Entre los fármacos que han sido detectados en los sistemas acuáticos, por su potencial peligrosidad destacan los anticonceptivos, analgésicos, antiinflamatorios, esteroides, antibióticos, antiepilépticos y medios de contraste utilizados en las exploraciones con fines de diagnóstico. Dentro de éstos, nos centramos en los medios de contraste iodados empleados en el diagnóstico mediante técnicas de imagen, debido a su resistencia frente a tratamientos convencionales de las aguas residuales urbanas, lo cual origina una creciente acumulación en el entorno. Los ICM se consideran uno de los compuestos polihalogenados de alto riesgo y, por tanto, es necesario trabajar en tratamientos que faciliten su eliminación de las aguas residuales. Con base en los estudios revisados en la literatura, la deshalogenación reductiva de contaminantes halogenados se ha centrado principalmente en compuestos clorados, sin embargo resulta de sumo interés explorar esta vía para la biotransformación de contaminantes yodados como lo son los ICM.

Aunque se han realizado extensos estudios en procesos de biotransformación reductiva empleando quinonas y sustancias húmicas, la realidad es que su

potencial para tratar contaminantes en aguas residuales de diversas industrias no se ha visto explotado.

Un impedimento importante para la utilización de MR a base de quinonas y SH a escala real, es la solubilidad, pues al presentar una alta solubilidad en medio acuoso facilita que el MR se lave de los reactores, haciendo necesaria la adición continua de SH o quinonas para incrementar la velocidad de transformación, lo cual es económicamente y ambientalmente inviable.

Para evitar la adición continua de MR a los bio-reactores anaerobios se han implementado técnicas para lograr su inmovilización y aunque actualmente se están estudiando varias opciones, es necesario considerar las desventajas que estas técnicas de inmovilización tienen; por ejemplo, la pérdida gradual de la capacidad del MR, ya sea debido al lavado en los bio-reactores o la disrupción del material de inmovilización y las limitaciones de transferencia de masa, porque una fracción mayor de los MR queda atrapada dentro del material de inmovilización. Entonces, si en lugar de intentar inmovilizar las SH en una matriz, utilizamos SH insolubles, como los humiados, que permitan el fácil transporte de electrones, ahorraríamos el proceso de inmovilización y se mantendría la capacidad catalítica inicial del MR; además, al ser un sólido puede formar parte de los gránulos integrados por consorcios que incluyen microorganismos reductores de humus (MRH).

Ciertamente siguiendo esta investigación, en un futuro podría permitir la aplicación de MR para mejorar los sistemas de tratamiento de aguas residuales con contaminantes susceptibles a la reducción empleando un MR de bajo costo presente en sistemas terrestres y acuáticos.

3.2 Hipótesis

Empleando una sustancia húmica en estado sólido como mediador redox y un lodo activo con microorganismos reductores de humus será posible la biotransformación de un medio de contraste de rayos-X, iopromida.

3.3 Objetivo general.

Co-inmovilizar sustancias húmicas insolubles con microorganismos reductores de humus, con propiedades físicas y químicas que le permitan actuar como un mediador redox en la biotransformación reductiva de contaminantes recalcitrantes.

3.3.1 Objetivos específicos.

- Determinar la capacidad catalítica redox de humiados de hierro y calcio a través de su caracterización con el fin de conocer su potencial como MR.
- Evaluar el efecto catalítico que tienen estos complejos insolubles como MR en procesos de biotransformación reductiva de la iopromida por un lodo granular en el que se han co-inmovilizado humiados de Fe o Ca con MRH.

4. METODOLOGÍA

4.1 Síntesis y caracterización de complejos insolubles HA-M.

En el desarrollo de esta tesis se emplearon HA provenientes de la leonardita de dos lotes diferentes obtenidos de la mina de Gascoyne Dakota Norte y adquiridos de la Sociedad Internacional de Sustancias Húmicas (IHSS). El tratamiento previo que se hace a la leonardita para obtener los HA consistió en disolver en agua desionizada una concentración de 2.15 g L^{-1} de leonardita que contiene cerca del 70% de HA en agitación por 12h, posteriormente se centrifuga (9900 rpm/ 15 min), con el fin de eliminar las partículas insolubles. Una vez centrifugada la solución de HA se adicionaron los gramos necesarios de $\text{Fe}(\text{SO}_4) \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (sulfato ferroso heptahidratado) o $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ (Cloruro de calcio dihidratado) para tener una concentración de 5mM de Fe^{2+} y 0.1 M de Ca^{2+} , con agitación rápida. Se ajustó el pH de la mezcla de reacción a $\text{pH} = 7$ utilizando NaOH 0.1N (Hidróxido de sodio) y se dejó reaccionando a una temperatura de 30°C por 7 días manteniendo el pH. Transcurrido el tiempo de reacción el complejo precipitado se colecta por centrifugación (9900 rpm/20 min) y se liofiliza.

Para la caracterización de los complejos insolubles sintetizados HA-M [M: $\text{Fe}(2+)$, $\text{Ca}(2+)$] y los HA de la leonardita se realizó un análisis de carbono orgánico total en el analizador COT marca Shimadzu TOC-V_{CSN} , a través de la técnica de ICP-AES se determinó la concentración del metal divalente y por espectrofotometría de infrarrojo en un rango de $400\text{-}4000 \text{ cm}^{-1}$ usando un espectrofotómetro infrarrojo con transformada de Fourier marca Thermo Nicolet modelo 6700 a temperatura ambiente mediante la técnica de pastilla con KBr se identificaron los grupos funcionales presentes.

4.2 Porcentaje de metal en los complejos HA-M.

En el caso específico de los humiados HA-Fe fue necesario determinar las diferentes fracciones del hierro mediante extracciones consecutivas a temperatura ambiente:

- a. Cloruro de Magnesio (MgCl_2) 1 M, pH 7 para conocer la fracción del hierro intercambiable
- b. Acetato de Sodio (CH_3COONa) 1 M, pH 5 para la determinación la fracción del hierro soluble en ácido
- c. Pirofosfato de Sodio ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$) 0.1 M, pH 10 representa la fracción del hierro ligada orgánicamente

En los procesos de extracción se emplearon 0.5 g de HA-Fe y 50 mL de la solución de extracción durante 24 h. Una vez transcurrido el tiempo, el extracto se separó por centrifugación (15,000 g por 10 min), este proceso se hizo por triplicado. El complejo HA-Fe después de cada tratamiento se enjuaga con agua destilada hasta neutralizar.

El contenido total de metal en HA-M y la fracción pobremente disponible del HA-Fe (representada por el hierro presente en la fracción del residuo después del paso “c” de la extracción) se analizó el contenido de metal después de digerir con ácido perclórico y ácido nítrico por ICP-AES en el sobrenadante.

4.3 Determinación de la actividad catalítica redox.

Para probar la actividad catalítica que estos complejos insolubles HA-M tenían en procesos de óxido-reducción se utilizaron dos análisis. El primero nos indicó la capacidad que tenían estos compuestos para transferir electrones mientras que el segundo fue una prueba electroquímica para obtener su potencial de oxidación y reducción de estos compuestos.

4.3.1 Capacidad Aceptora de Electrones (CAE).

Los experimentos para calcular la CAE de los complejos sus HA precursores se realizaron en una cámara anaeróbica. Una concentración de 2 g L^{-1} de los complejos

HA-M y de HA se suspendieron en tubos con 5 mL de una solución buffer de NaHCO_3 (pH 6.8) que en el caso de la determinación biológica contenía acetato de sodio a una concentración 0.22 mM y una suspensión de células de *G. sulfurreducens* que se incubaron por 7 días a 30 °C. Por otro lado para el caso de la determinación química la incubación se hizo en presencia de 4 pellets de paladio (Pd) con atmósfera de hidrógeno y agitación (150 rpm).

Para cuantificar la cantidad de electrones transferidos al complejo de HA-M, se preparó el reactivo ferrocina disolviendo 0.02% de ferrocina en buffer HEPES 50 mM a un pH de 7. Después de centrifugar las muestras se tomó 0.2 mL y se colocó en un tubo con 0.2 mL de una solución de citrato férrico 30 mM y en otro tubo se coloca únicamente la muestra, posteriormente se adicionó el mismo volumen de HCl 0.5 M a cada uno de los tubos y se deja reaccionar por 120 min.

Una vez transcurrido el tiempo se tomaron 0.2 mL del extracto ácido y se colocaron en los tubos que contenían el reactivo de ferrocina después de 30 min. Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro UV-Visible Thermo spectronic Aquamate a una longitud de onda de 562nm.

La diferencia entre la concentración de las muestras con citrato y sin citrato proporcionó la CAE. La concentración de Fe (II) se usó para calcular el número de equivalentes de electrones transferidos de las muestras a Fe (III).

4.3.2 Análisis electroquímicos: Voltamperometría cíclica.

Las mediciones de voltamperometría cíclica (VC) se realizaron bajo condiciones anaeróbicas con un potenciostato Bio-Logic SAS VSP-110-240Vac, en celda con arreglo de tres electrodos, la cual consistió en un electrodo de referencia Ag/AgCl/KCl(sat.), una malla de platino (6.5 cm²) como contraelectrodo y como electrodo de trabajo se usó un electrodo de carbón vítreo.

Realizamos dos técnicas diferentes para obtener los voltamperogramas cíclicos (vc) con las siguientes condiciones: La primera técnica consistió en tener los complejos insolubles HA-M en una suspensión del medio mineral mismo que se

empleó como electrolito [0.022 M], el electrodo de trabajo tuvo una superficie de 196 mm², los voltamperogramas se realizaron a una velocidad de barrido de 0.010 Vs⁻¹ en medios con una concentración de la muestra de 2.5 g L⁻¹ y un intervalo de potencial de -1.0 a 1.0 V dirección catódica - anódica (vs. Ag/AgCl/KCl(sat.)). Se obtuvieron voltamperogramas de los complejos insolubles HA-M y de HA provenientes de la leonardita, después de reducirlos con un pulso de potencial de -0.5 V (vs EHS) o -0.302 V (vs. Ag/AgCl/KCl(sat.)) durante 2.5 h., utilizando el mismo medio mineral como electrolito que contenía NH₄Cl, CaCl₂·2H₂O, MgSO₄·7H₂O, K₂HPO₄ y NaHCO₃. Como control, se realizó la VC del medio mineral en ausencia de los humiados, después de la aplicación del pulso de potencial -0.5 V (vs EHS) o -0.302 V (vs. Ag/AgCl/KCl(sat.)) durante 2.5 h.

La segunda técnica esta reportada para medir compuestos insolubles, se parte de una suspensión madre de HA-M [5 g L⁻¹], se toman 2 µL de la suspensión y se deposita por goteo sobre la superficie del electrodo de trabajo de carbón vítreo con una área de 250 mm², dejando reposar con el fin de evaporar el agua. Los voltamperogramas se realizaron con una velocidad de barrido de 0.010 V s⁻¹ y un intervalo de potencial de -1.0 a 1.0 V, dirección catódica - anódica (vs. Ag/AgCl/KCl(sat.)) usando como electrolito un buffer de fosfatos [0.2 M] a pH 7. Al igual que la técnica anterior se aplicó un pulso de potencial de -0.5 V (vs EHS) o -0.302 V (vs. Ag/AgCl/KCl(sat.)) durante 20 min.

4.4 Biotransformación anaerobia de la iopromida empleando complejos insolubles HA-M como MR.

El efecto catalítico de los complejos insolubles HA-M sintetizados se probó en la biotransformación de un ICM, la iopromida, realizando pruebas en lote y en reactores en continuo.

4.4.1 Biotransformación anaerobia en cultivos en lote.

Para la parte de experimentación en lote se utilizaron botellas serológicas de 120 mL inoculadas con un cultivo anaerobio, a una concentración de 25 g SSV L⁻¹ de un lodo activo de la planta de tratamiento de aguas de la cervecería modelo ubicada en Sonora, México, manteniendo una transferencia serial con 5 % del volumen del inóculo, 6 mM glucosa y 120 ppb de iopromida con 100 mL del medio mineral y 2000 mg L⁻¹ de COT de los complejos HA-M o de la leonardita según el caso.

El medio mineral consistió en 0.28g L⁻¹ NH₄Cl ; 0.01 g L⁻¹ CaCl₂·2H₂O ; 0.1 g L⁻¹ MgSO₄·7H₂O ; 0.25 g L⁻¹ K₂HPO₄ ; 1 mL de elementos traza solución SL-10⁽²⁸⁾ , 1 mL de solución Se/W⁽²⁸⁾ por litro y 5g L⁻¹ NAHCO₃.

Se prepararon cuatro sistemas, dos eran controles, uno estéril y otro con cultivo anaerobio activo sin SH. Los tres sistemas restantes contenían los compuestos que funcionarían como MR, la leonardita (HA) y HA-Fe, cada uno de los sistemas se hizo por triplicado con el fin de corroborar resultados.

Para seguir la degradación del ICM iopromida, se midió la concentración en el sobrenadante de los sistemas mediante un análisis de HPLC durante 32 días consecutivos.

4.4.2 Biotransformación anaerobia en reactores en continuo.

Tres bio-reactores UASB se utilizaron para la biotransformación de la iopromida en continuo, que operaron con un THR de 30 h, en un cuarto de temperatura controlada (28 ± 1 °C). Los bio-reactores fueron llamados R-Co (Bio-reactor control, en que no se adicionó ningún MR), R-Ca Bio-reactor usando como MR el complejo insoluble HA-Ca) y R-Fe (Bio-reactor con el complejo HA-Fe como MR). Todos los reactores son de vidrio de 35 cm de altura y 5 cm de diámetro con un volumen total de 300 mL, inoculados con 25 g L⁻¹ de SSV de un consorcio metanogénico obtenido del lodo activo de la planta de tratamiento de una cervecería de Sonora, México, previamente activado. Los reactores R-Ca y R-Fe contenían 5 g L⁻¹ de COT del complejo insoluble HA-M.

Para obtener una distribución homogénea en los reactores, el lodo metanogénico granular se disgregó usando un tamiz de 250 μm . Los reactores fueron alimentados con glucosa (2 g DQO L^{-1}) y peptona (1 g DQO L^{-1}) como sustrato. El medio mineral consistía en 0.28g L^{-1} NH_4Cl ; 0.1 g L^{-1} $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0.1 g L^{-1} $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0.25 g L^{-1} K_2HPO_4 ; 0.032g L^{-1} FeSO_4 ; 5 g L^{-1} NaHCO_3 y 1 mL de elementos traza solución. Se operaron primero en lote durante un fin de semana para evitar pérdidas de los complejos insolubles por el lavado de reactores. Posteriormente, se operó en modo continuo por siete semanas. La adición del contaminante iorpomida se inició transcurridas tres semanas de estar en continuo con una concentración de 400 ppb, se realizaron mediciones cada tercer día a través de análisis con HPLC, se determinó la concentración de los metales por ICP-AES en el efluente de los reactores para contabilizar la pérdida del metal en los complejos HA-M, así como la DQO para el porcentaje de remoción de la biomasa.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Caracterización fisicoquímica de los humiados sintetizados.

La caracterización de los compuestos se inició obteniendo el análisis elemental de la leonardita (Tabla 5) y determinando la concentración de los metales en las dos diferentes muestras de leonardita y sus respectivos complejos insolubles sintetizados de calcio (HA-Ca) y hierro (HA-Fe), posteriormente se determinó el contenido de COT en cada una de las muestras ya mencionadas que se presentan en las Tablas 6 y 7.

Tabla 5. Análisis elemental de las sustancias húmicas

Muestra	% C	% H	% O	% N	% S	% P	% Ceniza (p/p)
Leonardita HA ^a	63.81	3.70	31.27	1.23	0.76	< 0.01	2.58

^a Datos provistos por IHSS (<http://www.humicsubstances.org/sources.html>) para ambos lotes de leonardita.

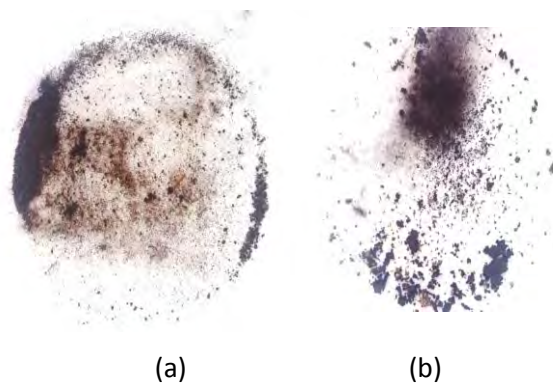


Figura 10. (a) Humiados de hierro (II) HA-Fe liofilizado del lote α (b) Humiato de calcio (II) HA-Ca liofilizado del lote α

La figura 10 muestra fotografías de los humiados divalentes de leonardita del lote α una vez liofilizados. A simple vista es posible apreciar una diferencia en el color de los compuestos, el complejo insoluble HA-Fe presenta una coloración ligeramente rojiza mientras el complejo HA-Ca permanece del color de su precursor un tono café muy oscuro, en el caso de los humiados del lote β ambos complejos presentan la

misma coloración oscura de su precursor, es decir no hay una diferencia a simple vista como en el caso del lote α .

Tabla 6. COT y concentración de los metales divalentes hierro y calcio presentes en las muestras lote α

Muestra	COT [mg/g seco]	Fe [mg Fe/g]	Ca [mg Ca/g]
α HA	585.52 \pm 6.32	0.639 \pm 2.95x10 ⁻⁵	9.63 \pm 9.11x10 ⁻⁵
α HA-Fe	136.58 \pm 1.93	120.48 \pm 2.72x10 ⁻³	-
α HA-Ca	525.07 \pm 3.29	-	92.58 \pm 1.11x10 ⁻³

Tabla 7. COT y concentración de los metales divalentes hierro y calcio presentes en las muestras lote β

Muestra	COT [mg/g seco]	Fe [mg Fe/g]	Ca [mg Ca/ g]
β HA	572.64 \pm 6.32	3.499 \pm 2.4 x 10 ⁻⁴	9.75 \pm 4.07 x10 ⁻⁵
β HA-Fe	130.39 \pm 1.93	107.11 \pm 5.88x 10 ⁻⁵	5.75 \pm 3.05 x 10 ⁻⁵
β HA-Ca	507.57 \pm 3.29	3.030 \pm 1.14 x 10 ⁻⁴	112.32 \pm 1.16 x 10 ⁻⁴

En las gráficas de la Figura 11 se compara la composición porcentual de los metales y el COT presentes en las muestras de leonardita de ambos lotes. Es posible observar que, la mayor diferencia se encuentra en el porcentaje de hierro, que en el caso del lote β es dos órdenes de magnitud mayor, lo que indica que la leonardita del lote β contiene complejos de Fe en mayor proporción que el lote α . Sin embargo, en el caso del calcio ambos lotes contienen alrededor del 1% del total, entonces se puede decir que en la materia prima original naturalmente se forman en mayor proporción complejos de calcio que de hierro, lo cual concuerda con estudios previos en los que el calcio es el metal en mayor proporción en la humina.⁽⁶⁹⁾

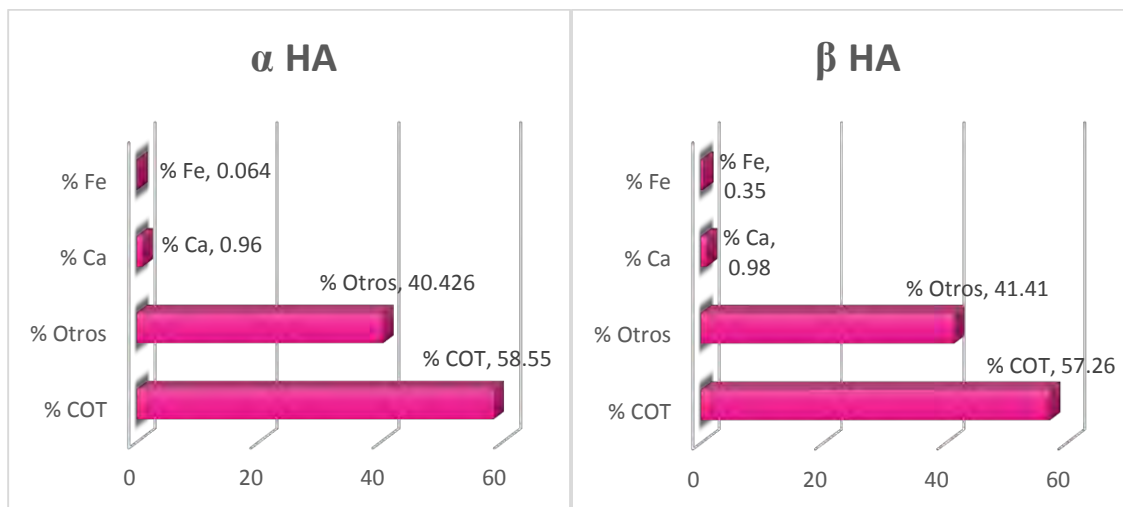


Figura 11. Porcentaje de COT y metales divalentes de hierro y calcio en la leonardita.

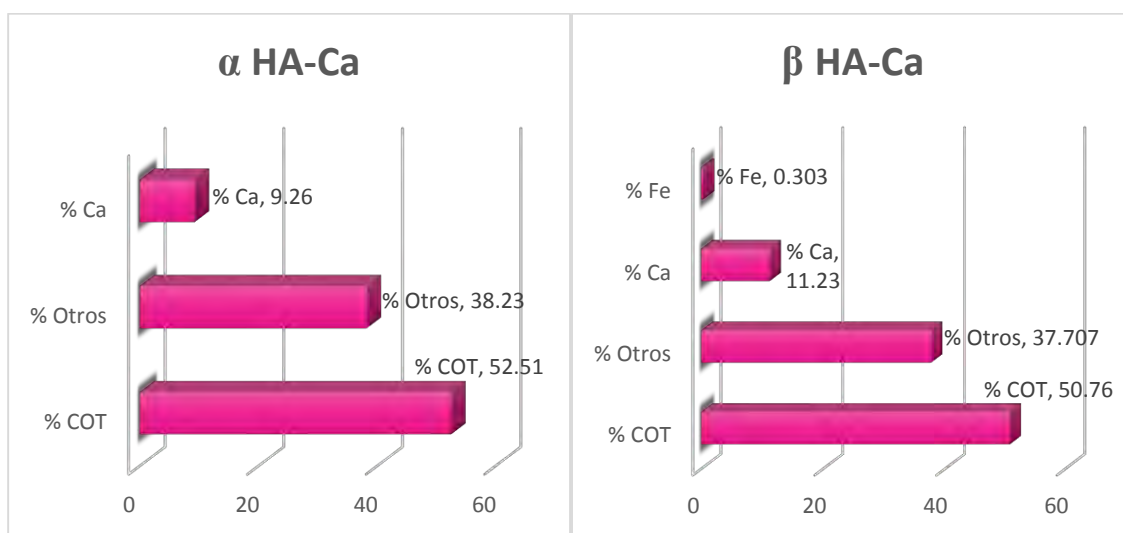


Figura 12. Porcentaje de COT y del Ca en los complejos HA-Ca.

El porcentaje de Fe que se acompañó en el caso del HA-Fe en promedio es de 11% aproximadamente, muy similar al porcentaje de Ca acompañado en HA-Ca; además, algo que llama la atención en este compuesto es la disminución en el contenido de COT con respecto a la materia prima (HA), fenómeno que no se observa en el complejo de calcio HA-Ca. Una de las características químicas del ion Fe^{2+} utilizado para la síntesis del HA-Fe es su alto carácter oxofílico por lo cual en su estructura se esperan moléculas de agua coordinadas, que incrementan los

porcentajes de oxígeno e hidrógeno que se observan en la tabla 5, entonces con este incremento es de esperarse que el porcentaje de carbono total disminuya drásticamente y se refleje claramente en el % de COT de las gráficas de la Figura 13.

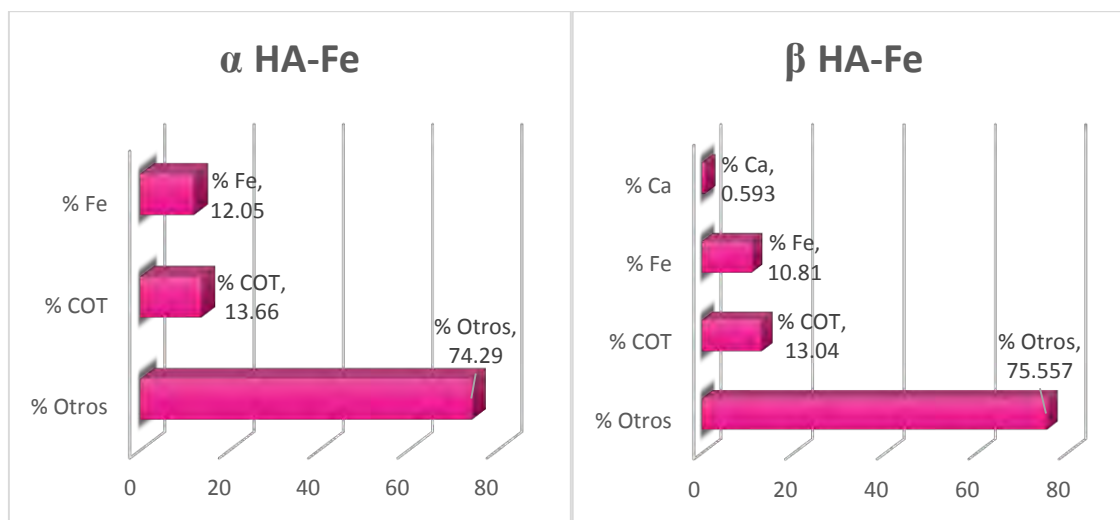


Figura 13. Porcentaje de COT y del Fe en los complejos HA-Fe.

Se esperaba que el metal divalente se encontrara anclado a través de enlaces coordinados formando un complejo y no absorbido en la red de los ácidos húmicos; sin embargo, con ese primer análisis se determinó la presencia de alrededor del 10% del metal en el complejo, pero el identificar la manera en que el metal se encuentra requería de un análisis más detallado de su estructura.

5.1.1 Fracciones de hierro en HA-Fe

En el caso específico de los complejos de HA-Fe, se realizó un análisis de extracción consecutivas con el fin de determinar las fracciones de hierro presentes en los humiados, para elucidar el comportamiento en condiciones de pH diferentes e identificar como se encuentra el hierro en la estructura. Por tratarse de extracciones consecutivas el porcentaje en cada una dependerá de la extracción previa. Se inició

con un pH neutro que es el pH en el que trabajan la mayoría de los bio-reactores y posteriormente se probó un pH de 5 que puede presentarse en bio-reactores cuando tenemos un exceso en la concentración de ácidos grasos finalizando con pH de 10 que logra la extracción del metal ligado orgánicamente.

Tabla 8. Fracciones de Fe presentes en el humiato HA-Fe

	pH	[mg Fe /g Fe total] en α HA-Fe	[mg Fe /g Fe total] en β HA-Fe	Fracción de Fe
<i>MgCl₂</i>	7	234.40 \pm 1.24	123.61 \pm 3.28 x 10 ⁻²	Intercambiable a pH 7
<i>NaOAc</i>	5	71.70 \pm 0.15	61.04 \pm 5.28 x 10 ⁻³	Extraíble a pH 5
<i>Na₄P₂O₇</i>	10	437.17 \pm 0.19	734.46 \pm 1.06 x 10 ⁻²	Enlazado orgánicamente
<i>Residuo</i>	1	256.73 \pm 4.35	80.89 \pm 1.39 x 10 ⁻¹	Pobremente disponible

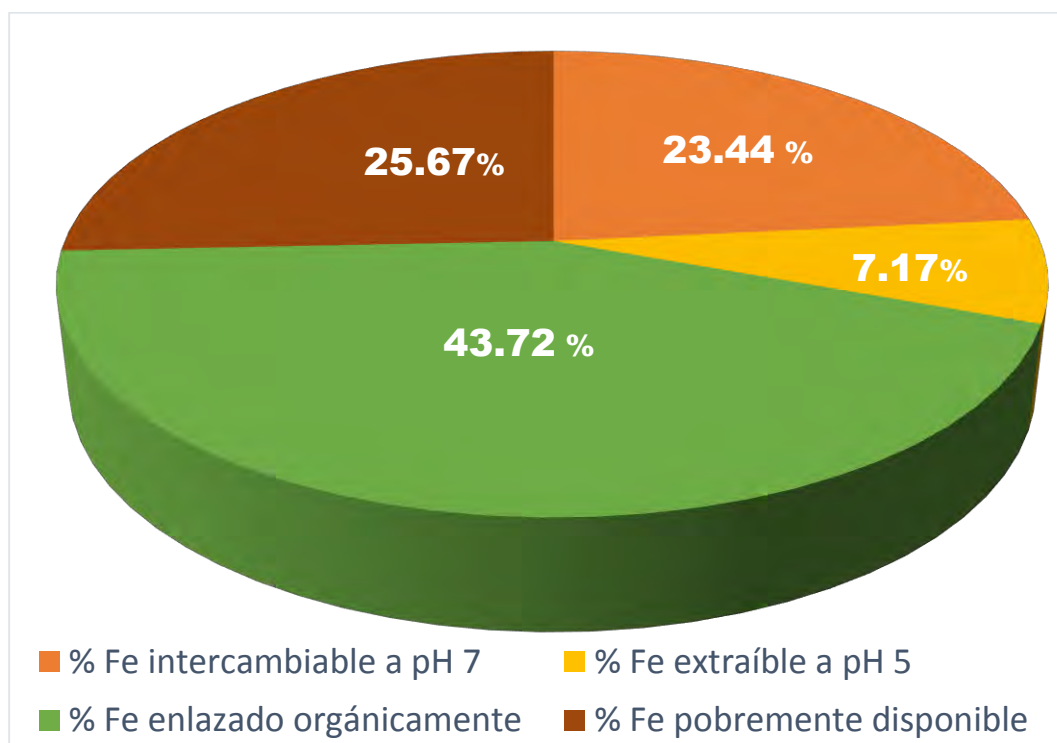


Figura 14. Gráfico de la conformación porcentual de Fe presente en los complejos α HA-Fe

La fracción de Fe intercambiable a pH 7 indica el porcentaje que se pierde del humiato de hierro por intercambio catiónico, en este caso por $[Mg^{2+}]$. Si observamos las Figuras 14 y 15, el porcentaje de Fe que se intercambia es del 23.44 % para α HA y 12.36 % para β HA. Esta variación se atribuye a la manera en la que se encuentra el metal ya sea coordinado o únicamente absorbido con los diferentes grupos funcionales presentes en los HA de los que provienen, estos valores nos hablan de la heterogeneidad que los HA presentan aun cuando provienen de la leonardita de un mismo suelo.

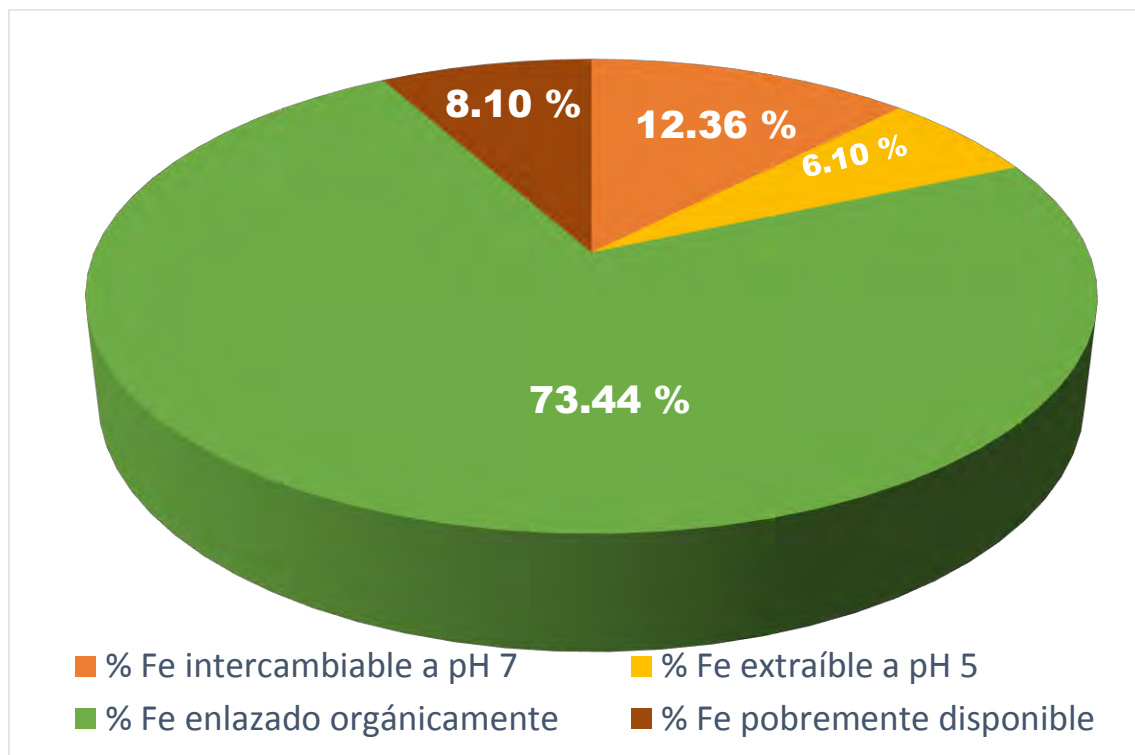


Figura 15. Gráfico de la conformación porcentual de Fe presente en los complejos β HA-Fe

Por otro lado la extracción ácido a pH 5 nos indica el porcentaje de humiato de Fe que se perderá en estas condiciones, que resulta menor al 10% para ambos casos. Ahora bien, la fracción de Fe extraída a un pH básico de 10 nos indica el porcentaje de Fe ligado orgánicamente, enlace más fuerte que los anteriores.

5.1.2 Grupos funcionales en las estructuras HA-M: FTIR

Con el fin de identificar los grupos funcionales presentes en las muestras de leonardita precursoras de los humiados HA-M y aquellos grupos que intervienen en la complejación de los metales divalentes, se realizaron espectros FTIR de los complejos insolubles de Fe y Ca, así como de las muestras de leonardita precursoras.

Por la estructura química sugerida por Schulten (1994) se esperaba tener señales correspondientes a grupos funcionales oxigenados, principalmente ácidos carboxílicos (COOH), fenoles (C₆H₅-OH), alcoholes (OH) y carbonilos (C=O) quinónico, hidroxiquinónicos y de cetonas α - β insaturadas.

En la Figura 16 se muestra los espectros FTIR de la leonardita (HA) con los que se sintetizaron los humiados HA-M, en estos espectros, se registra una banda ancha en 3400 cm⁻¹, más intensa en β HA correspondiente a estiramientos de grupos (-O-H) de diferente naturaleza (carboxílica, fenólica, alcohólica) y estiramientos (-N-H) asociados mediante enlaces de hidrógeno, inter e intramoleculares. La banda registrada en 1700 cm⁻¹ para α HA y 1714 cm⁻¹ para β HA es característica de estiramientos de grupos (-C=O) de diferentes naturaleza (ácidos carboxílicos, aldehídos, etc.). En 1576 cm⁻¹ para α HA y 1600 cm⁻¹ para β HA se registra una banda bien definida correspondiente a estiramientos de grupos funcionales (C=C) de estructuras aromáticas, donde también pueden estar contribuyendo los estiramientos (-C=O) de quinonas y/o cetonas conjugadas. Una banda ancha registrada con centro alrededor de 1384 cm⁻¹ para α HA y 1396 cm⁻¹ para β HA, se atribuye a vibraciones de diferentes grupos contribuyentes, entre ellos, deformaciones (C-H) de anillos aromáticos, estiramientos (-C-O) de fenoles y carboxilos, así como deformaciones (-C-H) de CH₂ y CH₃.

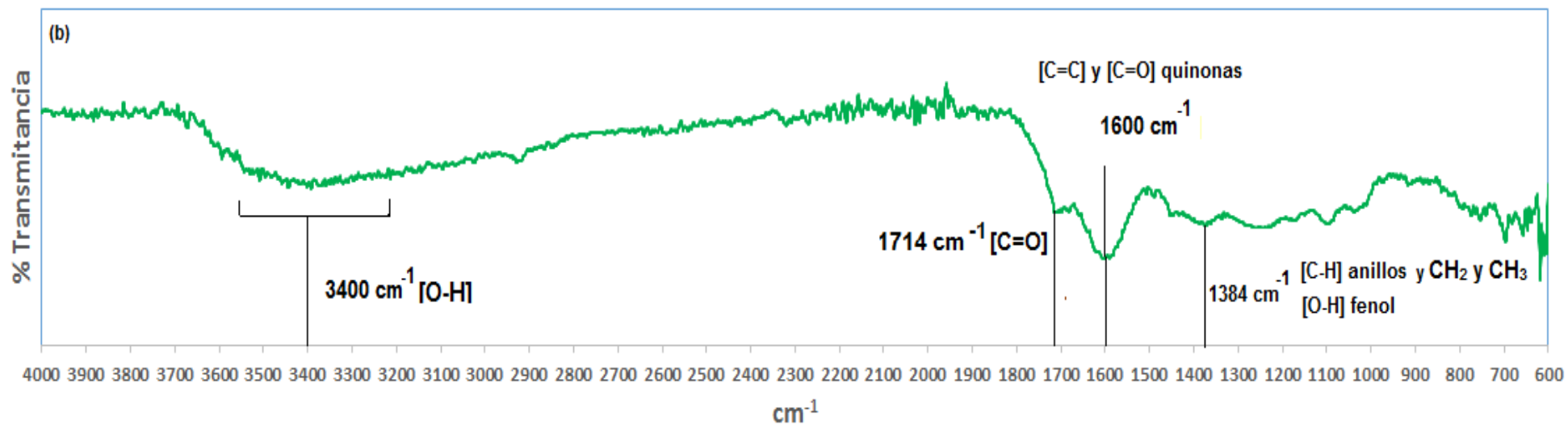
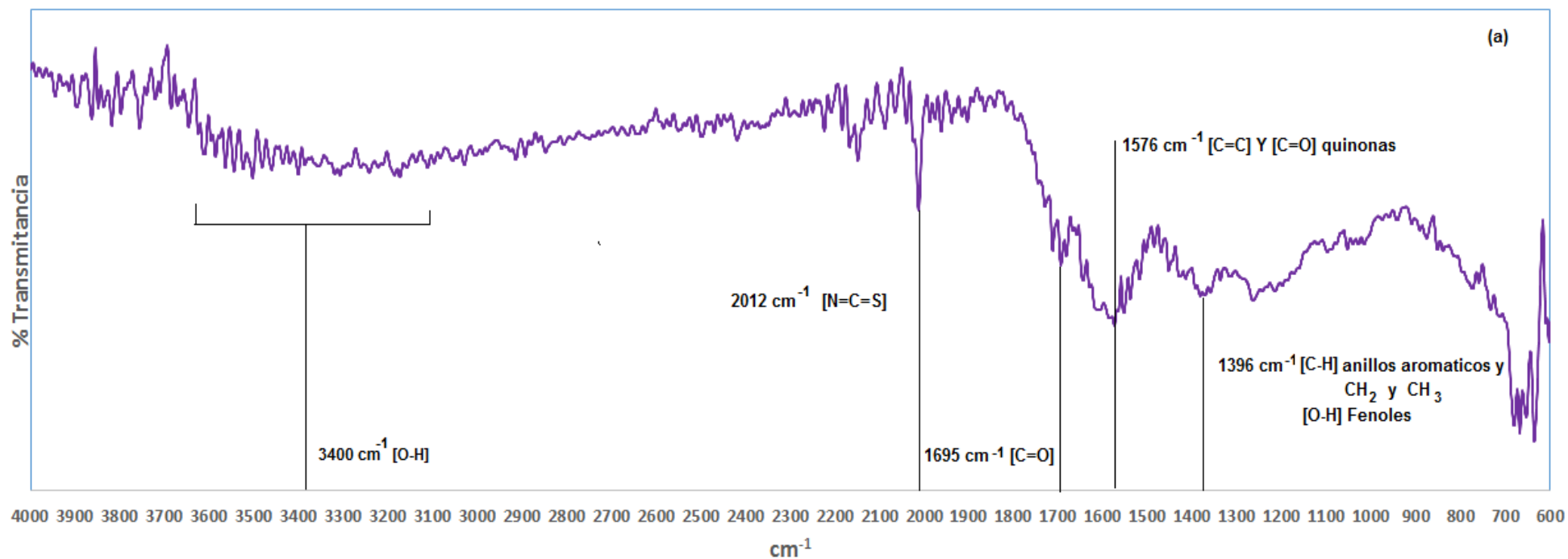


Figura 16. Espectros FTIR de las muestras (a) Leonardita del lote α ; (b) Leonardita del lote β

Los espectros de FTIR de los complejos insoluble HA-M se compararon con los espectros FTIR de la materia prima de la que partieron. Los humiados α y β HA-Ca presenta ligeros movimientos de bandas en comparación a su precursores HA, sin embargo la intensidad de las señales si se ve modificada; Figura 17 y 18.

Piccolo, A. & Stevenson, F.J. (1982) ⁽⁴⁷⁾ publicaron un artículo con espectros infrarrojos de humiados de diferentes metales divalentes con diferentes concentraciones de metal, y observaron que al tener una mayor concentración del metal se intensifican las bandas, aun cuando el análisis infrarrojo no es un análisis cuantitativo. El incremento en la intensidad corresponde a una mayor concentración del metal Ca en la estructura de los humiados.

Para el caso específico de α HA-Ca (Figura 17) la banda que aparece en 2012 que identifica al grupo funcional isotiocianato no se ve alterada, lo que sugiere que no tiene interacción este grupo con el metal. Por otro lado, las señales que se intensifican en 2945 cm^{-1} y 2750 cm^{-1} corresponden a alteraciones en los estiramientos ($-\text{C}-\text{H}$) antisimétricos y simétricos, respectivamente, de CH_2 de las cadenas alifáticas y la aparición de las bandas entre 1000 cm^{-1} y 800 cm^{-1} identifican a carbonatos, que deben su formación a el cambio en el pH durante la etapa de síntesis, aunque posteriormente se ajustó a pH 7, se quedaron carbonatos de calcio en la estructura, cosa que no ocurrió en la formación de β HA-Ca donde se controló desde un inicio el pH.

Ahora bien, analizando el espectro α HA-Fe con respecto al espectro de la α HA se observa un incremento en la intensidad de la banda alrededor de 3400 cm^{-1} (Figura 19) que se debe a la hidratación del humiato de hierro (HA-Fe), lo cual indica que en su esfera de coordinación contiene moléculas de agua.

Las bandas en 1714 y 1595 cm^{-1} del espectro de α HA disminuyen en intensidad en el espectro del complejo α HA-Fe, lo cual sugiere que muchos grupo COOH son convertidos a la forma COO^- , óptimo para enlazar metales divalentes.

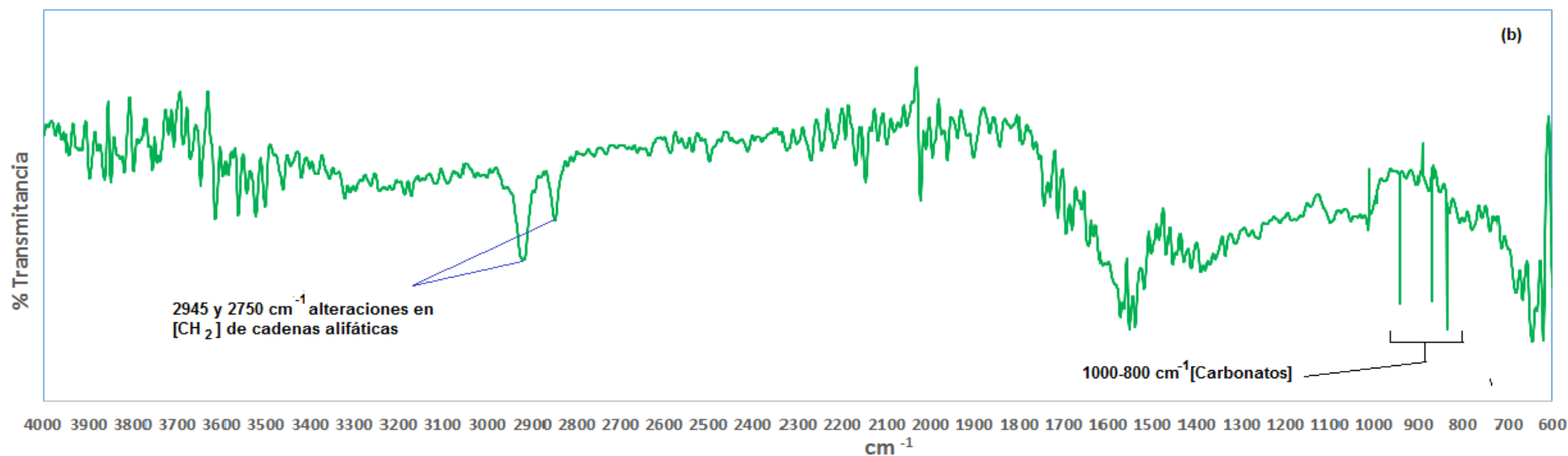
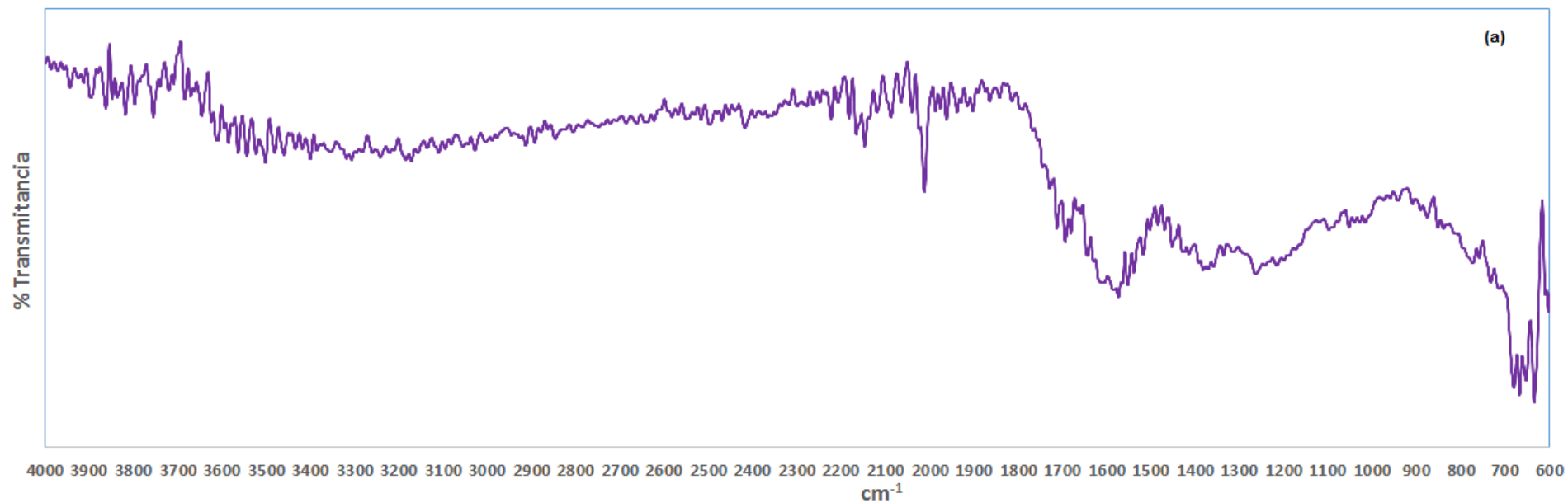


Figura 17. Espectros FTIR de las muestras (a) Leonardita del lote α ; (b) Humiato α HA-Ca

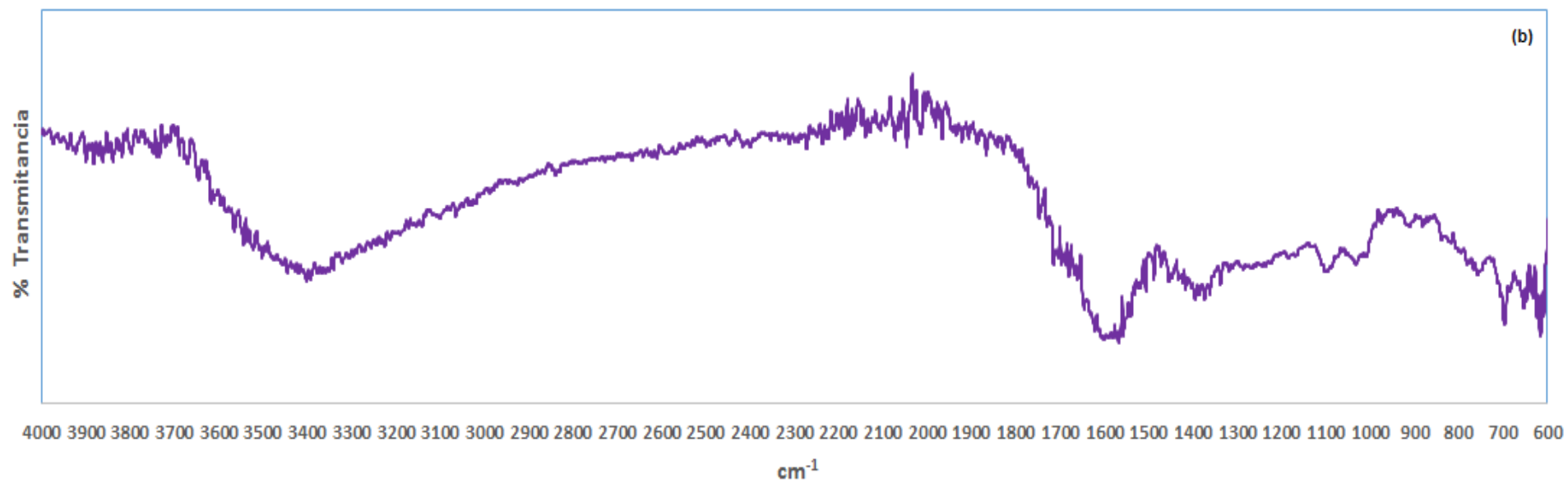
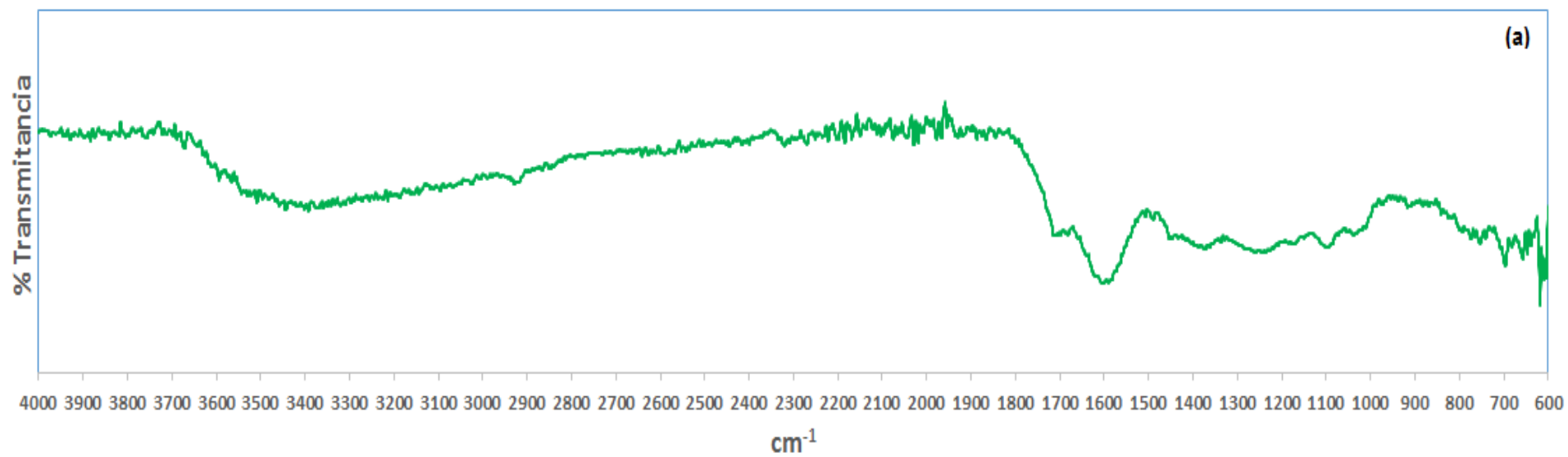


Figura 18. Espectros FTIR de las muestras (a) Leonardita del lote β; (b) Humiato β HA-Ca

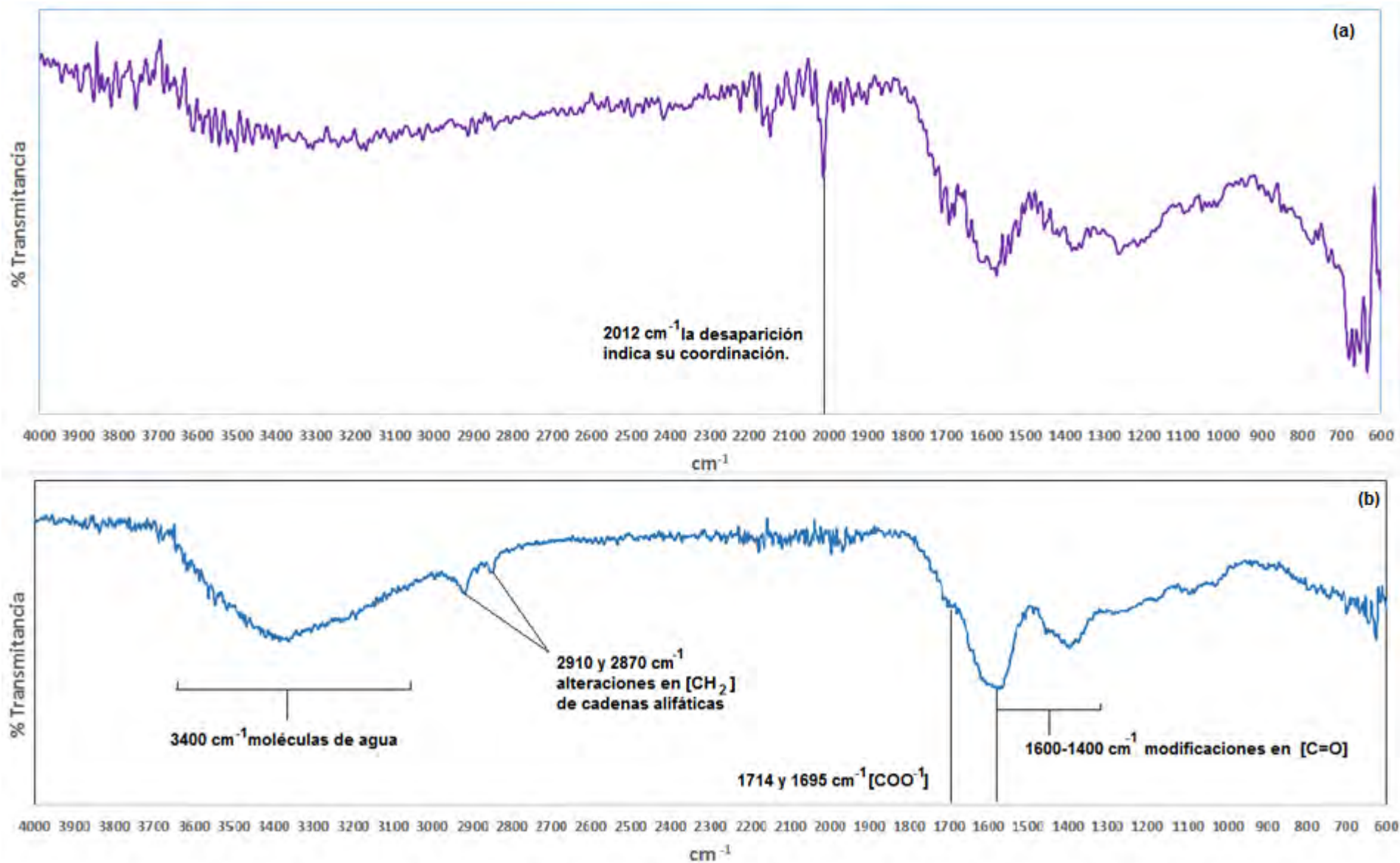


Figura 19. Espectros FTIR de las muestras (a) Leonardita del lote α ; (b) Humiato α HA-Fe

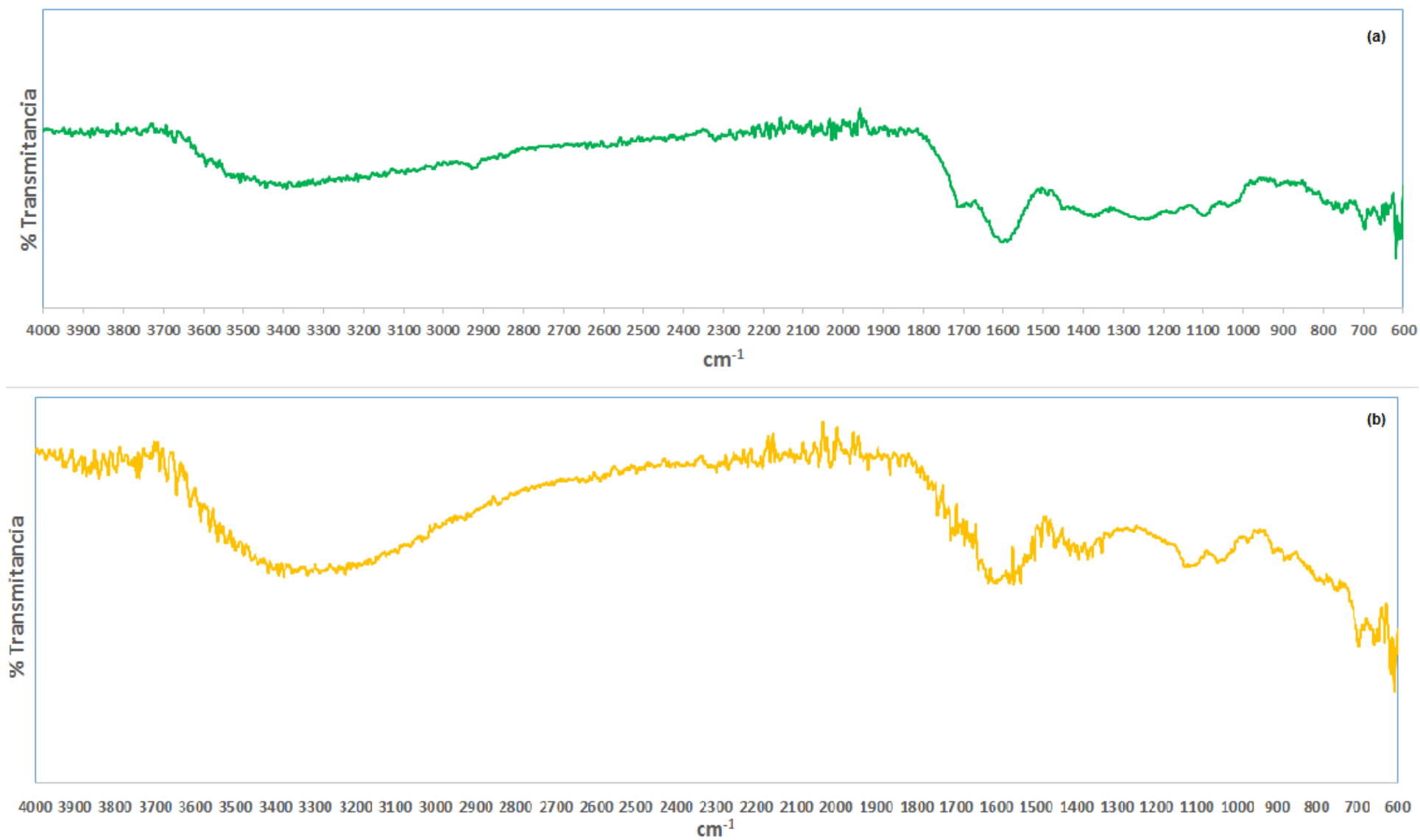


Figura 20. Espectros FTIR de las muestras (a) Leonardita del lote β; (b) Humiato β HA-Fe

En el intervalo 1600-1400 cm⁻¹ se aprecia una alteración en las bandas, así como en la banda a 1148 cm⁻¹, lo que indica que los grupos C=O se afectaron por la complejación del metal. Estas diferencias no se observan con claridad en el espectro FTIR de β HA-Fe con respecto a β HA ya que el porcentaje de Fe inicial en β HA era mayor lo que indica una mayor cantidad de humiato de Fe inicial (Figura 20).

5.2 Actividad catalítica redox de los humiatos HA-M.

Una vez que se caracterizaron los humiatos sintetizados se realizaron las primeras pruebas, para determinar la actividad catalítica redox, que fueron; la capacidad de transferir electrones, a través de la CAE y la actividad redox de los humiatos en análisis electroquímicos.

5.2.1 CAE de los humiatos.

En el caso específico de la CAE se determinó biológica y químicamente para tener un panorama mejor de la capacidad de transferir electrones. Los resultados se presentan en las tablas 9 y 10.

Tabla 9. CAE de leonardita del lote α (α HA) y complejos

	Reducción (meq e ⁻ g ⁻¹)	
	Biológica	Química
α HA	0.093 ± 1.72 x 10 ⁻²	0.079 ± 2.83 x 10 ⁻²
α HA-Ca	0.278 ± 1.65 x 10 ⁻²	0.232 ± 2.64 x 10 ⁻²
α HA-Fe	0.508 ± 1.34 x 10 ⁻²	0.472 ± 2.35 x 10 ⁻²

Tabla 10. CAE de la leonardita del lote β (β HA) y complejos

	Reducción (meq e ⁻ g ⁻¹)	
	Biológica	Química
β HA	$0.131 \pm 3.51 \times 10^{-2}$	$0.140 \pm 3.14 \times 10^{-2}$
β HA-Ca	$0.448 \pm 1.39 \times 10^{-1}$	$0.472 \pm 7.19 \times 10^{-2}$
β HA-Fe	$0.545 \pm 2.40 \times 10^{-2}$	$0.556 \pm 4.34 \times 10^{-2}$

Los variaciones en valores de los HA α y β se explican por la cantidad presente de grupos quinonas en sus estructuras. El estudio pionero en el rol de las SH como MR ⁽⁶²⁾ definió a las quinonas como el principal grupo funcional aceptor de electrones en el humus, pues estimulaba la transferencia de electrones durante las reacciones redox evaluadas. ⁽¹⁷⁾

Diversas líneas de investigación posteriormente soportaron esta hipótesis de que las quinonas son el principal grupo funcional que transfiere electrones en las SH, entonces la cantidad de grupos quinonas estaría relacionado con la CAE es decir los meq e⁻ transferidos desde 1g de la muestra, con ello podemos afirmar que β HA contiene una mayor proporción de estos grupos en su estructura.

Un número mayor de grupos funcionales se reduce durante un proceso de reducción química a diferencia de una reducción biológica, lo que se traduciría en una transferencia de electrones menor en la reducción biológica. Sin embargo, en la tabla 9, la transferencia de electrones es mayor en la reducción biológica, debido a la poca cantidad de hidrógeno presente en la reacción, lo que impidió completar la reducción química, dando una transferencia de electrones menor que la reducción biológica. Lo que no ocurrió en el lote de las muestras de leonardita del lote β .

Si comparamos la CAE entre los humiados se observa una mayor transferencia electrones en el humiado HA-Fe. Que podría explicarse a partir del ambiente fisicoquímico que envuelve las interacciones inter e intramoleculares de los humiados con el sistema en cuestión. Por ejemplo, el estudio del Dr. Zhang y colaboradores (2014) determinó que el suelo era un factor esencial para que se

llevara el proceso de dechloración del contaminante pentaclorofenol, pues en presencia de HA solubles o AQDS este reducción no se llevaba a cabo.

Con base en ello se debe investigar más acerca de cómo se encuentra el metal en el humiato, lo que podría darnos una idea más clara del porqué el Fe ayuda en la transferencia de electrones.

5.2.2 Análisis de Voltamperometría cíclica.

Para completar la caracterización de la actividad redox de los humiados, se realizaron análisis electroquímicos, voltamperometría cíclica (VC), con el fin de identificar un potencial redox de él o los centros activos redox que existieran en los humiados. Primero se usó la técnica de suspensión, debido a que el medio mineral fue el electrolito utilizado se corrió una VC, donde no se observó respuesta voltamperométrica alguna. Figura 21a. Posteriormente se realizó una VC de la leonardita precursora de los humiados en dirección catódica, Figura 21b, donde observamos una respuesta de reducción de un centro activo en un potencial alrededor de 0.9 V (vs. Ag/AgCl/KCl(sat.)).

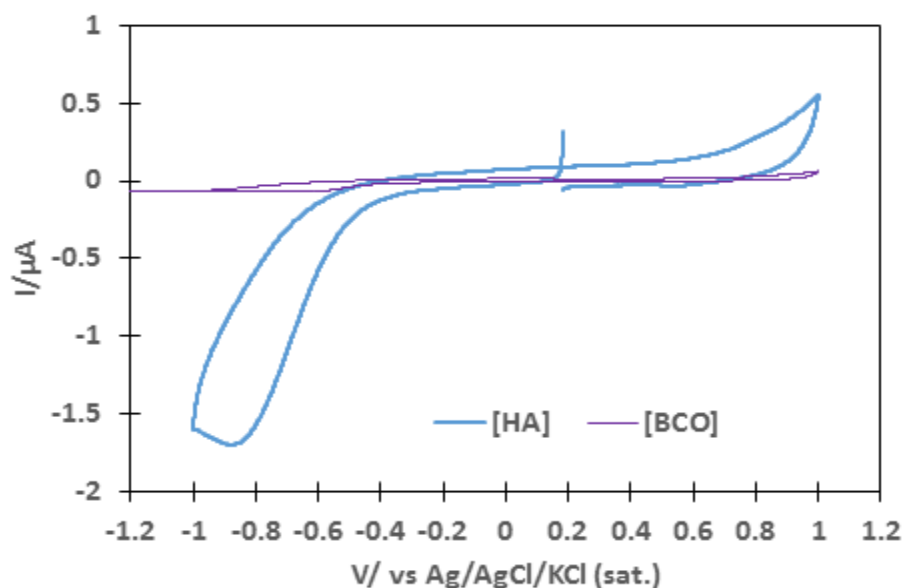


Figura 21. a. Voltamperograma del medio mineral [BCO]; b. Voltamperograma de la muestra de Leonardita [HA]

Si se impone un pulso de potencial a -0.302 V (vs. $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}(\text{sat.})$) durante 2.5 h , la respuesta voltamperométrica en la reducción se movió a valores más positivos en comparación a lo observando sin el pulso de potencial. Figura 21. Lo que indica que en este potencial a un tiempo más prolongado logra reducir grupos o centros activos que más difíciles de reducir.

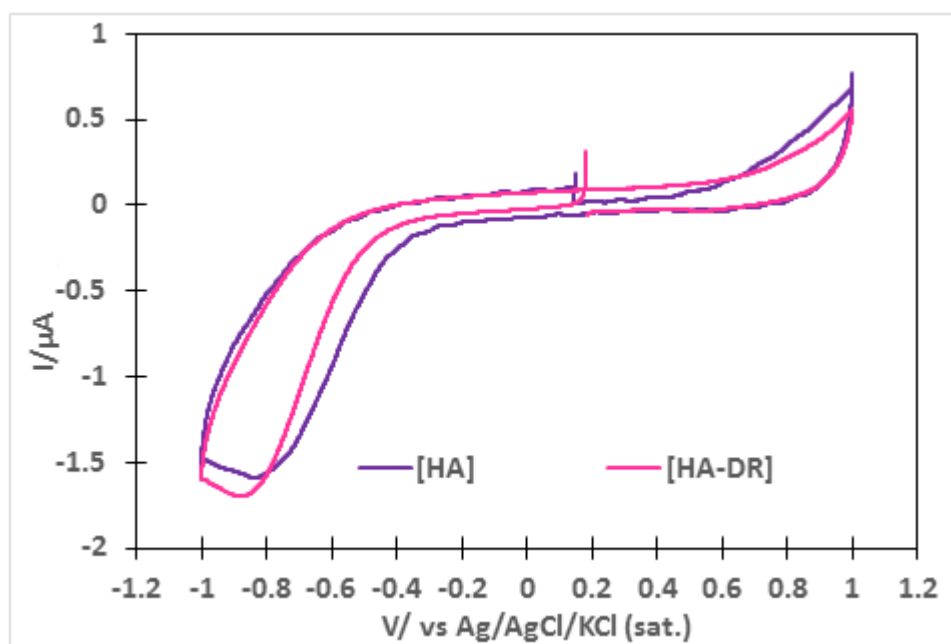


Figura 22. Voltamperogramas de la muestra de Leonardita antes del pulso de potencial [HA] y después [HA-DR] ambos dirección catódica

Una vez que se comprobó una actividad redox en la Leonardita precursora, se realizaron voltamperogramas de los humiados sintetizados en dirección anódica. En la Figura 23a se muestra el voltamperograma de HA-Ca antes del pulso de potencial, donde no es posible apreciar ningún tipo de actividad redox. Sin embargo, después de la reducción de -0.302 V (vs. $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}(\text{sat.})$), se observa claramente un pico en potenciales de reducción en -0.596 V , respuesta electroquímica con valor más positivo y una intensidad ligeramente mayor a la observado en la muestra de Leonardita tratada en las mismas condiciones.

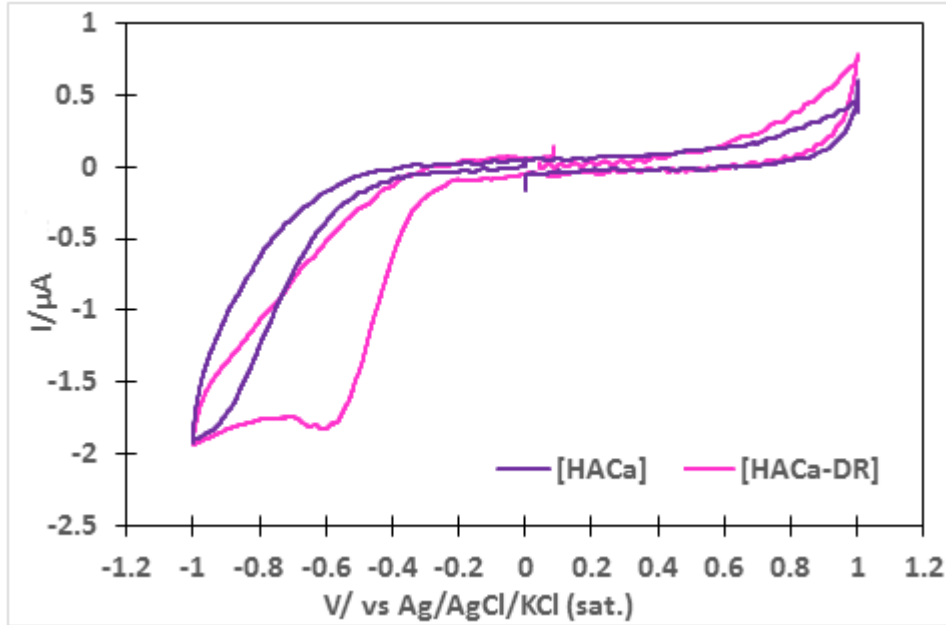


Figura 23. a. Voltamperograma del humiato de calcio [HACa] antes del pulso de potencial de -0.302 V (vs. Ag/AgCl/KCl(sat.)); b. Voltamperograma del humiato de calcio [HACa-DR] después del pulso de potencial.

El hecho de que el potencial de la respuesta de reducción sea más positivo, indica una mayor facilidad de reducción del centro activo redox del humiato de calcio, que el de los ácidos húmicos de la leonardita, debido a la interacción que puede tener el metal en la estructura del humiato.

Con los voltamperogramas del humiato de hierro en solución muestran el comportamiento de este complejo en solución. El Voltamperograma antes del pulso de potencial muestra actividad redox en el recorrido catódico con un potencial de -0.897 V, Figura 24a. Sin embargo después de aplicar un pulso de potencial de -0.302 V (vs. Ag/AgCl/KCl(sat.)), aparece una nueva señal en la zona catódica y un pico agudo en la zona anódica que corresponde a un proceso de oxidación, a un potencial De 0.188V, Figura 24b, la señal de -0.897 V se desplaza a -735 mV y la nueva señal aparece en -0.577 V, lo que indicaría la existencia de dos centros activos redox que no se observan en HA-Ca ni en los HA.

La presencia de las dos señales en la zona catódica se explica si parte del $\text{Fe}^{(2+)}$ que se encuentra interaccionando en el humiato de hierro, HA-Fe, se libera del

humato quedando en la solución, que al aplicar el potencial de -0.302 V (vs. Ag/AgCl/KCl(sat.)) se reduce hasta $\text{Fe}_{(s)}$, depositándose en el electrodo. En ese caso una de las señales correspondería a este proceso y la otra al proceso redox de los grupos funcionales del ligante HA que acompleja al metal. El $\text{Fe}_{(s)}$ depositado posteriormente se oxida dando la señal en el potencial 0.188 V (vs. Ag/AgCl/KCl(sat.)) que al convertir al potencial EHS es de 0.480 V , cercano al reportado en la literatura⁽⁴⁾ que es de 0.440 V para el sistema $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}_{(s)}$.

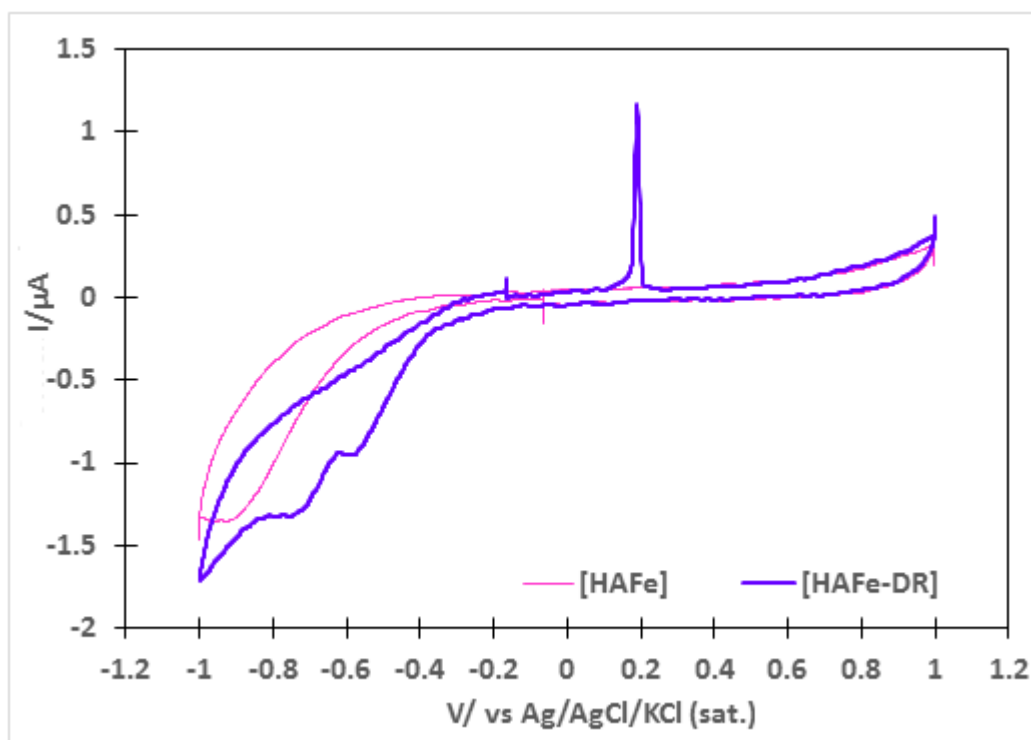


Figura 24. a. Voltamperograma del humiato de calcio [HAFe] antes del pulso de potencial de -0.302 V (vs. Ag/AgCl/KCl(sat.)); b. Voltamperograma del humiato de hierro [HAFe-DR] después del pulso de potencial

Es importante mencionar, que debido a naturaleza física del complejo, se tenía una suspensión y no una solución, lo que ocasionaba problemas en los fenómenos de difusión de la especie, por esta razón se decidió intentar con una segunda técnica electroquímica específica para cuando se tienen compuestos insolubles.

Tal como se menciona en la metodología por goteo se coloca la muestra HA-M en el electrodo de trabajo. Se obtuvieron voltamperogramas de los humiats HA-M provenientes de la leonardita después de aplicar un pulso de potencial de -0.302 V (vs. $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}(\text{sat.})$) por 20 min.

Al igual que en la primer técnica el blanco fue el electrolito que para la deposición por goteo fue un buffer de fosfatos. La Figura 25 muestra la VC antes de la aplicación del pulso de potencial de HA-Ca y del blanco, donde nuevamente no es posible apreciar ningún tipo de actividad redox; sin embargo, después de la reducción imponiendo un potencial de -0.302 V (vs. $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}(\text{sat.})$), Figura 26, se aprecia un ligero incremento en la corriente indicando mayor capacidad para acumular carga alrededor de 0.547 V que corresponde a una reacción de oxidación, y alrededor de -0.599 mV que podemos atribuir al proceso de reducción del complejo.

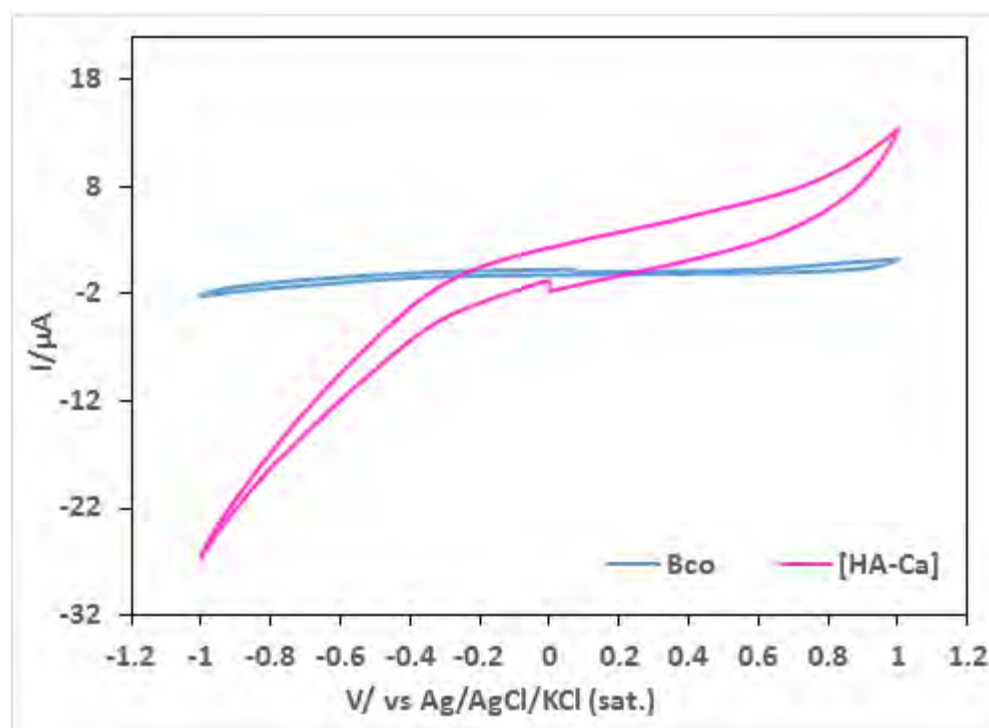


Figura 25. Voltamperograma del humiato de calcio [HA-Ca] y del buffer de fosfatos [Bco]

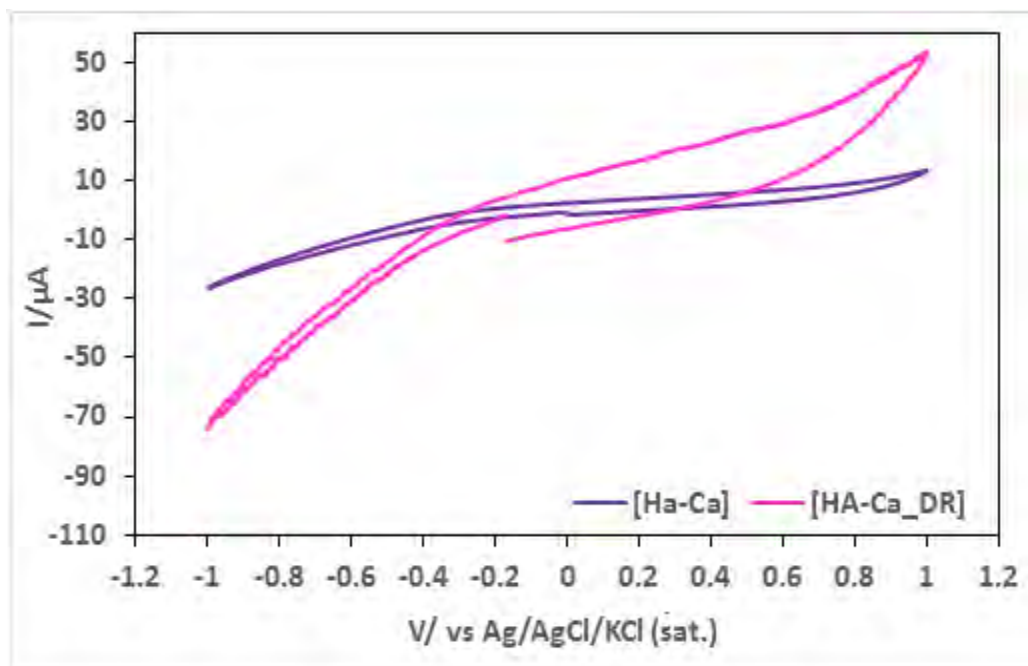


Figura 26. Voltamperogramas del humiato de calcio antes [Ha-Ca] y después [HA-Ca_DR] del pulso de potencial de -0.302 V (vs. Ag/AgCl/KCl(sat.)).

Para el caso del humiato de hierro HA-Fe, Figura 28, se puede observar que después de la aplicación del pulso de potencial de -0.302 V (vs. Ag/AgCl/KCl(sat.)), igual que el impuesto al humiato de calcio HA-Ca, es posible apreciar una señal en la zona anódica correspondiente a reacción de oxidación alrededor de 0.416 V y en la zona catódica se observa mayor capacidad por acumulación de carga alrededor -0.723 V. Este incremento en la capacitancia se puede atribuir a un proceso de reducción del humiato de Fe.

En general, la información que se obtuvo con el análisis electroquímico es la existencia de actividad redox en ambos humiats HA-M aun cuando es difícil determinar un potencial redox para cada humiato, por no encontrarse bien definidas las señales correspondientes a la oxidación y reducción de los humiats.

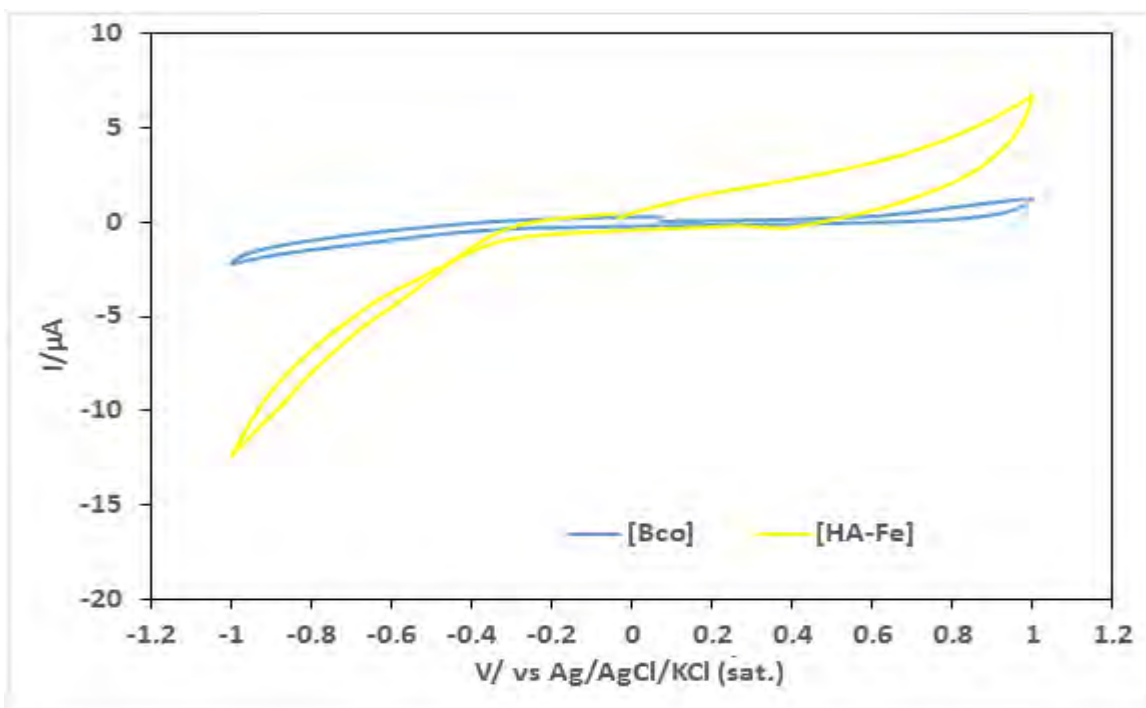


Figura 27. Voltamperogramas del humiato de hierro [HA-Fe] y del buffer de fosfatos [Bco]

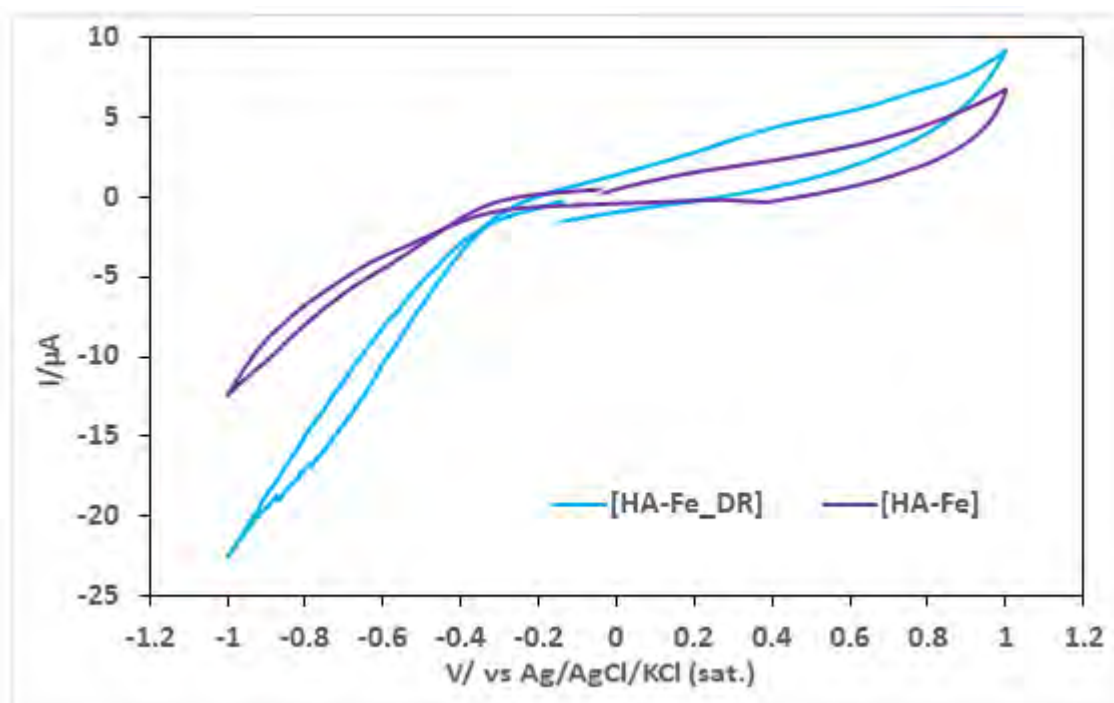


Figura 28. Voltamperograma del humiato de hierro antes [HA-Fe] y después [HA-Fe_DR] de del pulso de potencial de -0.302 V (vs. Ag/AgCl/KCl(sat.)).

5.3 Biotransformación anaerobia de iopromida empleando los complejos insolubles HA-M como MR.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la CAE, el humiato Ha-Fe resultó un mejor MR insoluble. Para corroborar esta premisa se realizaron dos pruebas de biotransformación de un contaminante recalcitrante (iopromida) que, debido a sus características en la estructura química, se esperaba una deshalogenación reductiva en presencia del MR.

Se partió de cuatro sistemas para las pruebas de biotransformación en lote, un sistema estéril, un sistema únicamente con lodo anaerobio y dos más que contenían como MR, la muestra de leonardita del lote α [HA] y el humiato α HA-Fe, todos los sistemas se incubaron por 32 días a 28°C, la disminución de la concentración de iopromida se presenta en la Figura 29.

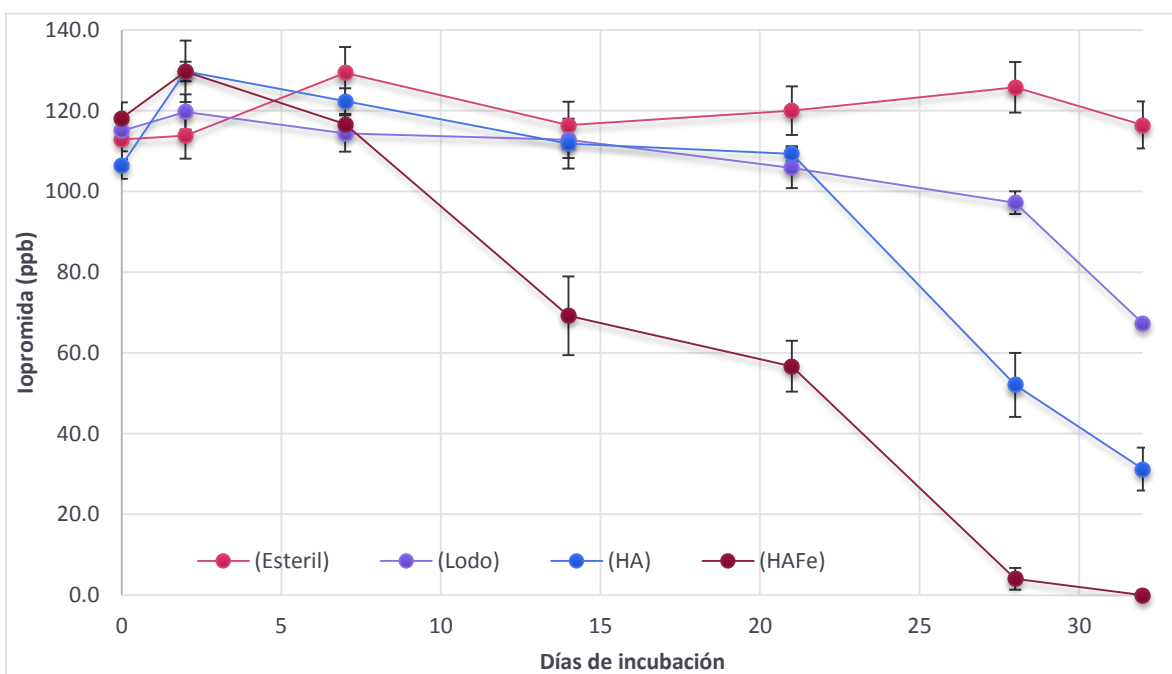


Figura 29. Disminución de la concentración de iopromida en las pruebas en lote después de 32 días de incubación (Estéril) Control estéril; (Lodo) Control con lodo anaerobio activo; (HA) Sistema con α HA como MR; (HAFé) Sistema con α HA-Fe

Después de seguir la biotransformación de la iopromida, se observa una transformación completa en el sistema donde el MR es el humiato α HA-Fe a diferencia de los sistemas de α HA y del lodo que presentan una transformación parcial. Con el sistema estéril se observó una adsorción del complejo mínima, lo que indica que el humiato se biotransforma y no se adsorbe. En la Tabla 11 se muestran, las velocidades y porcentajes de reducción de la iopromida después de 32 días de incubación.

Tabla 11. Velocidad y porcentaje de reducción en la biotransformación en lote de la iopromida

	Velocidad promedio [ppb d⁻¹]	% Reducción de iopromida
Lodo	-1.22 \pm 0.79	43.76
α HA	-2.54 \pm 0.75	75.94
α HA-Fe	-4.20 \pm 0.86	100

La biotransformación de la iopromida en condiciones anaerobias en sistemas en lote aumentó por la presencia de un MR de un 43.76% a 75.94% en el caso de los HA y 100% para el α HA-Fe. Tanto en el sistema de lodos como el del MR de α HA la conversión se aprecia de manera más clara a partir del día 21, mientras que en el sistema de α HA-Fe inicia en el día 7, lo cual indica una mayor velocidad de reducción para el caso de humiato de hierro que numéricamente se aprecia en la columna dos de la Tabla 11.

Para los experimentos en continuo, primeramente se operaron los reactores para activar la biomasa en ausencia del contaminante modelo iopromida (24 días) lográndose un porcentaje de remoción de DQO mayor al 90%; sin embargo, después de la adición del contaminante la remoción disminuyó por debajo de este valor hasta un 80%, que posiblemente se dio por el periodo de adaptación de los microorganismos al contaminante, pues al transcurrir los primeros días de

exposición a la iopromida, la eficiencia nuevamente se estabilizó por encima del 90%, manteniéndose esta remoción hasta el final de su operación.

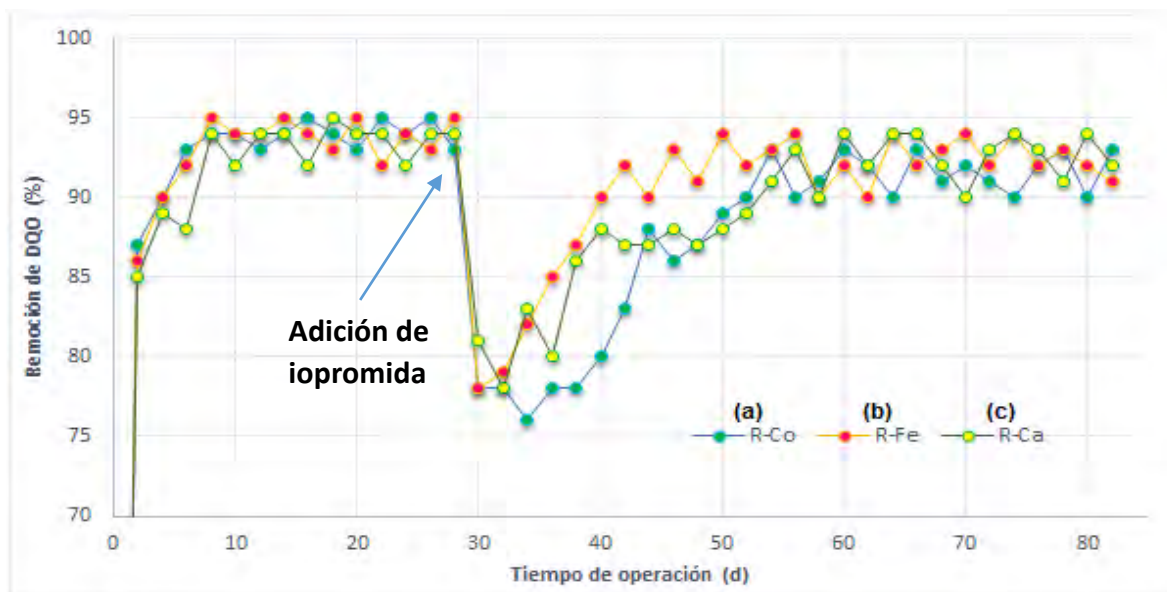


Figura 30. Porcentaje de Remoción de DQO durante la operación de los reactores antes y durante la biotransformación de iopromida en continuo (a) R-Co Bio-reactor control sin MR; (b) R-Fe Bio-reactor con HA-Fe como MR; (c) R-Ca Bio-reactor con HA-Ca como MR.

Con el fin de determinar la pérdida de los humiados HA-M, se midió la concentración del metal proveniente del humiato a través de un análisis de ICP-AES, en el efluente. La diferencia en la concentración de los metales de Ca y Fe medidos en los efluentes de los bio-reactores R-Ca y R-Fe, respectivamente, respecto al influente (concentración de los metales en la entrada) nos proporcionaba la concentración del metal desprendido de los humiados. Cada semana durante el tiempo de operación se midió este parámetro. En la Tabla 12 se muestra los resultados, donde por diferencia de la concentración del metal en el influente (In) y el efluente (Ef) resulta la concentración del metal que proviene de los complejos insolubles HA-M.

En general, es posible apreciar una pérdida de los humiados por el aumento en la concentración del metal en el efluente, que al pasar de los días de operación de los bio-reactores disminuye.

Tabla 12. Concentración de metales Ca y Fe en los efluentes de R-Ca y R-Fe, respectivamente

Días	[Fe] ppm (In)	[Fe] ppm (Ef)	[Fe] ppm de HA-Fe	[Ca] ppm (In)	[Ca] ppm (Ef)	[Ca] ppm de HA-Ca
14	0.15	9.80	9.65	52.08	52.99	0.91
21	0.13	5.26	5.13	69.16	69.88	0.72

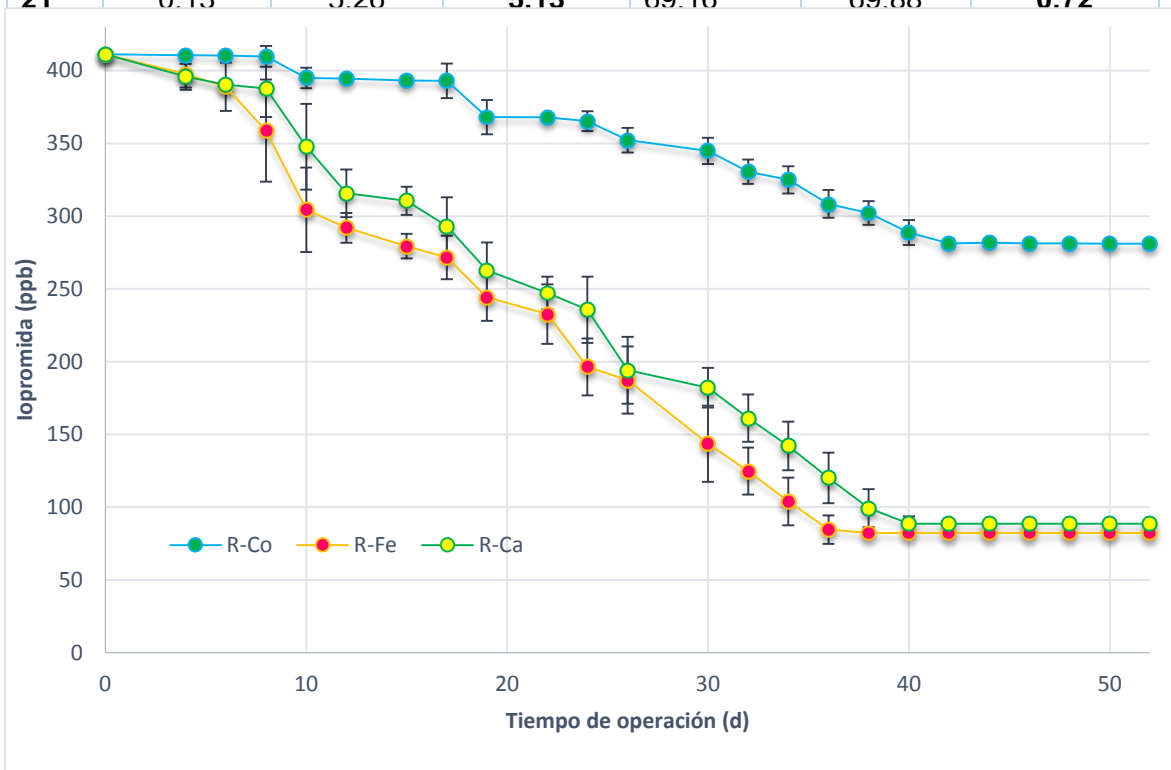


Figura 31. Disminución de la concentración de iopromida en bio-reactores UASB que operaron en continuo por 52 días. **R-Co:** Bio-reactor control sin MR; **R-Fe:** Bio-reactor con HA-Fe como MR; **R-Ca:** Bio-reactor con HA-Ca como MR.

La biotransformación de la iopromida se siguió mediante HPLC; después de 40 días de operación, el porcentaje de remoción de la iopromida se estabiliza para los tres reactores, es decir ya no se observa una mayor transformación del contaminante. La Tabla 13 muestra las velocidades promedio obtenidas con los datos colectados hasta llegar al estado estacionario, en la disminución de la concentración de la iopromida el estado estacionario y su porcentaje de reducción.

Tabla 13. Velocidad reducción y porcentaje de reducción en la biotransformación de iopromida en bio-reactores en continuo.

	Velocidad promedio [ppb d⁻¹]	% Reducción de iopromida
R-Co	-3.14 ± 0.97	31.66
R-Ca	-7.15 ± 0.53	79.92
R-Fe	-7.28± 0.61	80.01

Al igual a lo que se observó en la experimentación en lote, el tener en los bio-reactores un MR incrementa la biotransformación de la iopromida así como la velocidad de esta reducción, pasando de un porcentaje de reducción de 30% a un 80% utilizando un MR, mientras la velocidad aumenta más del doble; además, en la gráfica se aprecia que el inicio de la biotransformación se da a partir del sexto día utilizando un MR, mientras que sin el transportador de electrones se observa después de los 10 días de operación. Ahora bien, al comparar los MR HA-Fe y HA-Ca ambos lograr la biotransformación de la iopromida en un 80%, sin embargo la velocidad es ligeramente mayor en el caso del HA-Fe, lo cual se esperaba de acuerdo a los resultados obtenidos en la CAE. Ahora bien, es de relevancia mencionar que no fue posible obtener a tiempo los resultados de HPLC acoplado a masa para verificar los productos derivados de la biotransformación de la iopromida, sin embargo estos resultados serán contemplados posteriormente.

El diagrama de la Figura 32 muestra las posibles reacciones redox involucradas en la biotransformación de la iopromida empleando humiatsos como MR en un reactor UASB.

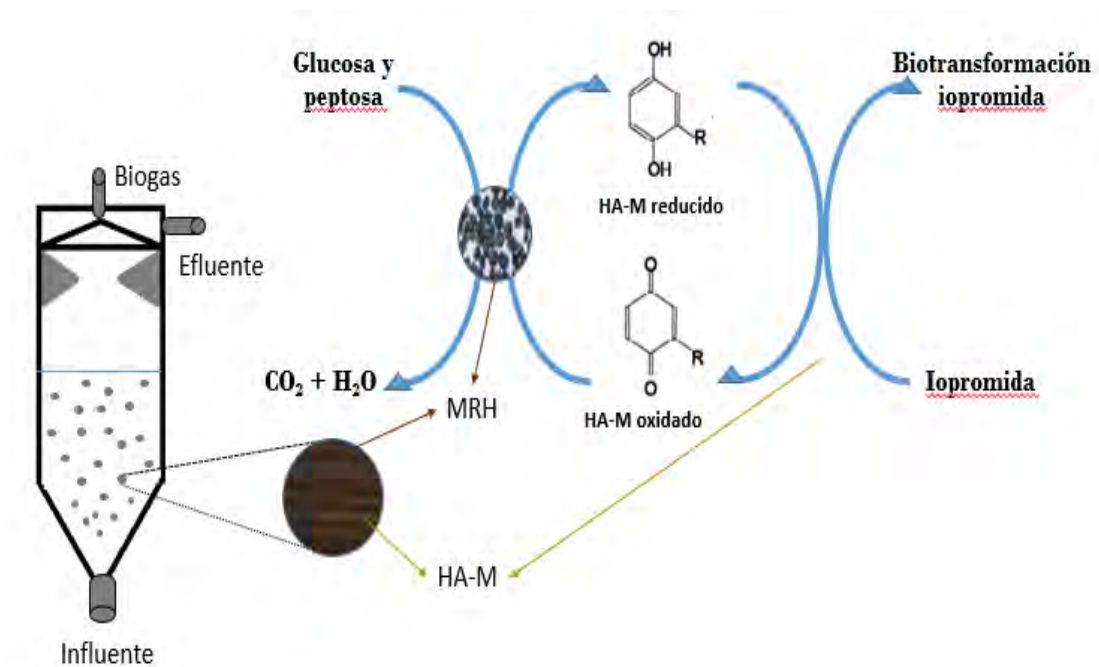


Figura 32. Reacciones redox involucradas en la biotransformación de la iopromida empleando humiatos como MR en un reactor UASB.

Se realizó un análisis morfológico con microscopía electrónica de barrido (SEM) y análisis químico por espectroscopía de dispersión de energía (EDS) de los lecho de lodos en los bio-reactores R-Fe y R-Ca, con el fin de identificar la morfología de los microorganismos presentes en el lodo así como estructuras cristalinas formadas.

La primera micrografía de la Figura 33 muestra la morfología amorfa y heterogénea de los gránulos que constituyen el lecho de lodos del bio-reactor R-Ca, en la segunda imagen (b) se muestra un gránulo aumentado 250 veces, donde es posible observar puntos más claros que representan elementos más pesados que el carbono, estos puntos luminosos se observan en la mayoría de los gránulos colectados, en las imágenes (c) y (d) con un aumento mayor se aprecia la morfología de las bacterias que se encuentran embebidas en los gránulos, la morfología predominante es forma de bastones pequeños (bacilos) y algunos pocas esferas (cocos).

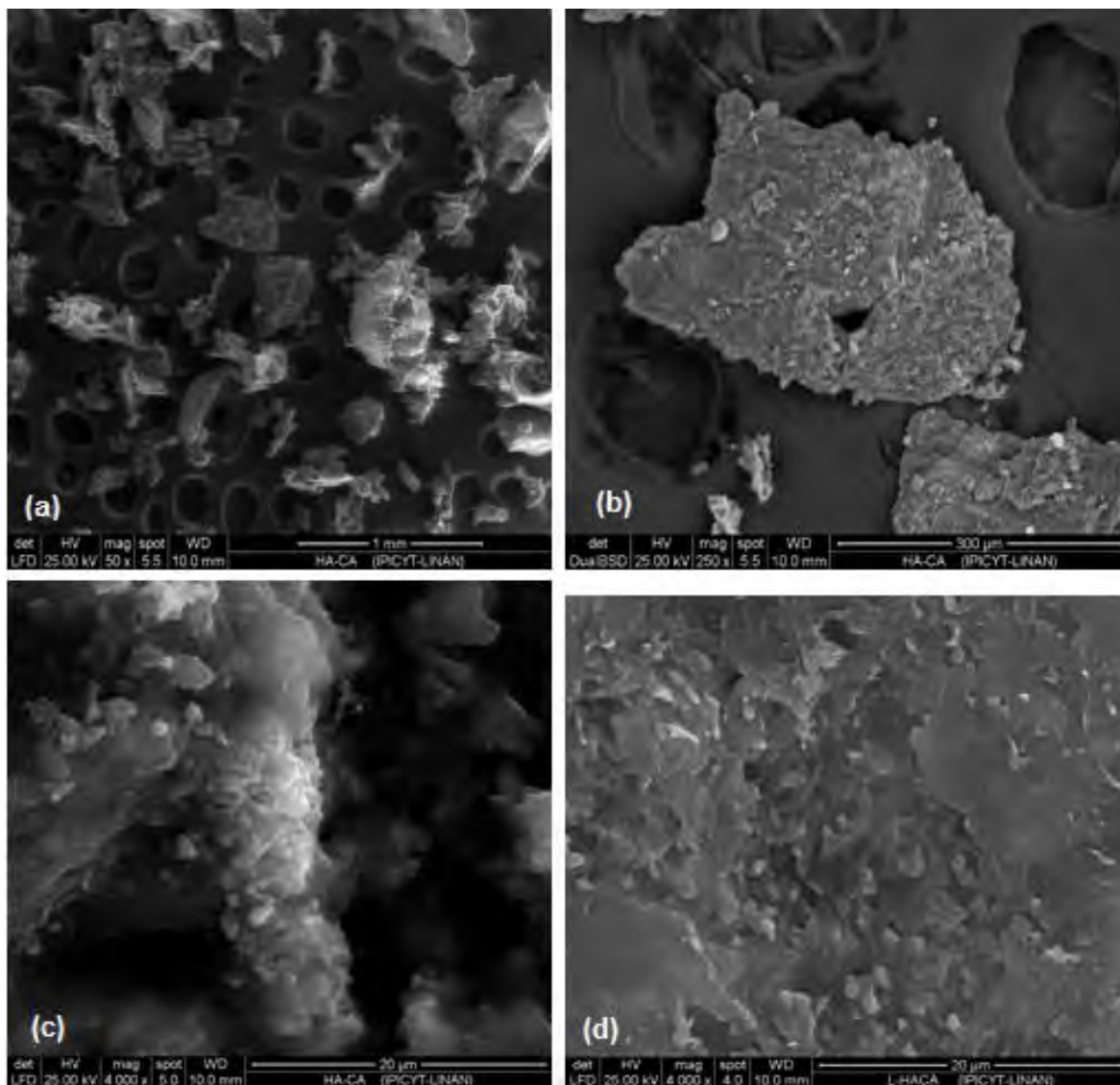


Figura 33. Micrografías de SEM de muestras del lecho de lodos del bio-reactor R-Ca con el MR HA-Ca. (a) Gránulos formados en el lecho de lodos, 50 aumentos; (b) Acercamiento de un gránulo de la micrografía (a), 250 aumentos; (c) y (d) Superficie de dos gránulos diferentes, 4000 aumentos.

De acuerdo a los análisis químicos EDS que se realizaron de manera puntual en diversos gránulos como el mostrado en la Figura 34, en general mostraban alto porcentaje en peso de los metales de calcio y fósforo.

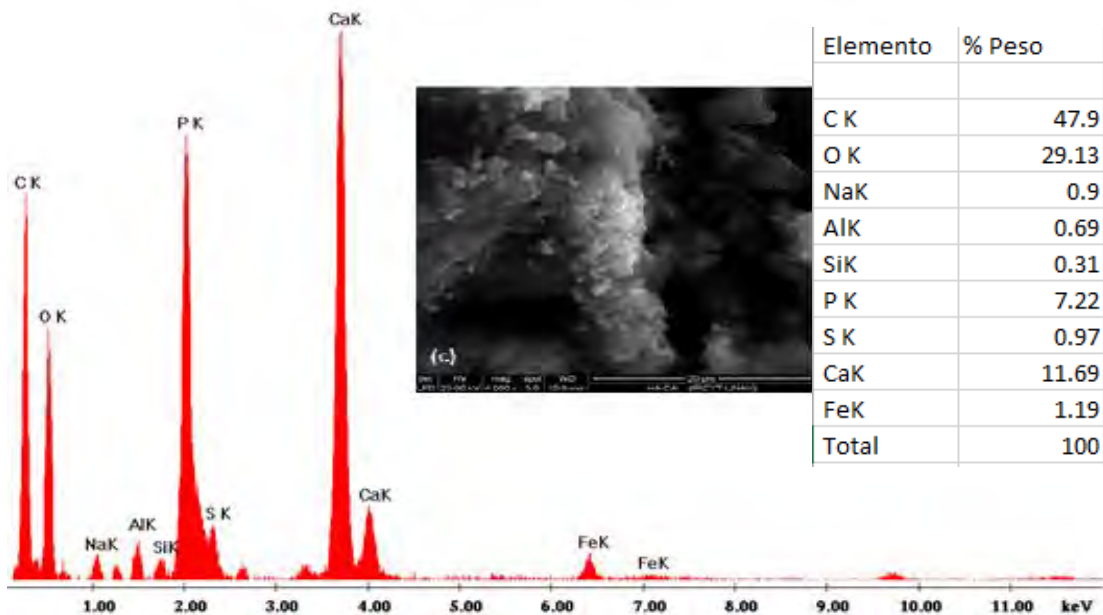


Figura 34. Análisis químico EDS de la zona mostrada en la micrografía SEM de la superficie de un gránulo con 4000 aumentos, imagen (c) de la Figura 33.

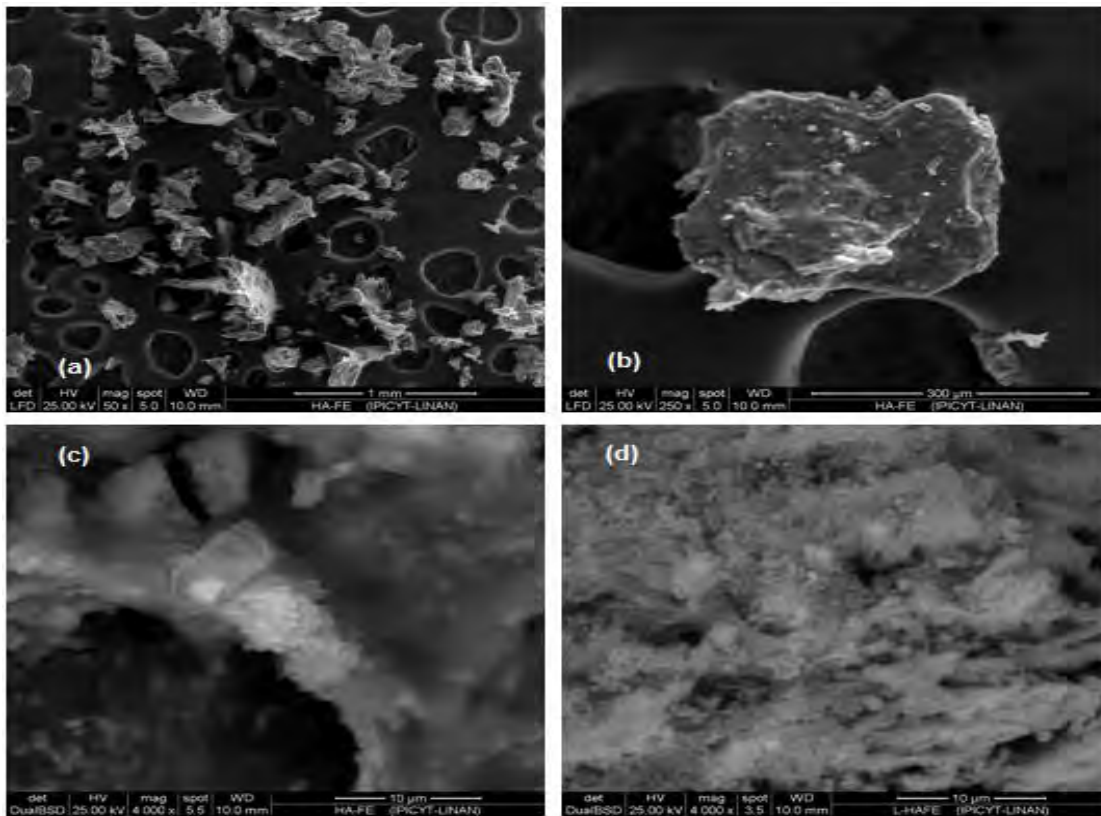


Figura 35. Micrografías de SEM de muestras del lecho de lodos del bio-reactor R-Fe con el MR HA-Fe. (a) Gránulos formados en el lecho de lodos, 50 aumentos; (b) Acercamiento de un gránulo de la micrografía (a), 250 aumentos; (c) y (d) Superficie de dos gránulos diferentes, 4000 aumentos.

Al igual que en las micrografías de los lodos del bio-reactor R-Ca, en la primera y segunda imagen de la Figura 35 correspondiente al bioreactor R-Fe se observa la morfología de los gránulos amorfa y heterogénea así como los puntos brillantes que se relacionan con elementos más pesados que el carbono, en las imágenes (c) y (d) con un aumento de 4000 se aprecia la morfología de las bacterias donde nuevamente se ve un predominio de bacilos.

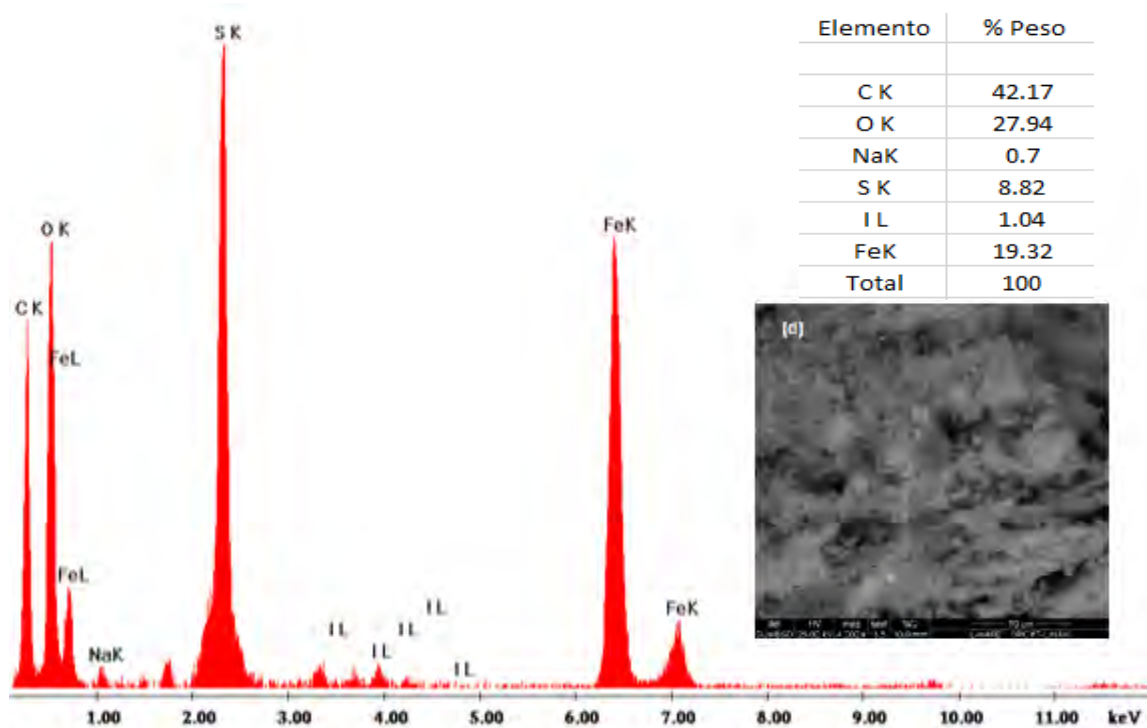


Figura 36. Análisis químico EDS de la zona mostrada en la micrografía SEM de la superficie de un gránulo con 4000 aumentos, imagen (d) de la Figura 35.

Se realizaron diversos análisis químicos EDS en los gránulos, lo que indicó una proporción mayor de los elementos Calcio (cristales de Ca con S), Azufre (cristales de S) y hierro, en algunos casos como el de la micrografía (d) de la Figura 35 se encontró yodo proveniente del contaminante iopromida.

6. CONCLUSIONES

Una de las limitantes para utilizar sustancias húmicas como mediadores redox a una escala real, en sistemas de tratamiento de agua con contaminantes recalcitrantes es su alta solubilidad. Aun cuando existe toda una línea de investigación sobre la inmovilización de sustancias húmicas en diversas matrices para resolver este problema, en este trabajo se logra por primera vez, co-inmovilizar SH y MRH sin la necesidad de un soporte, sólo con el proceso de granulación; desarrollando un nuevo concepto para la co-inmovilización de SH y MRH sin la necesidad de una matriz física.

Se logró la biotransformación de un medio de contraste iodado, iopromida, tanto en lote como en continuo. En el caso de la biotransformación en lote se logró una reducción del 100% después de 32 días de incubación, utilizando como MR el HA-Fe, que duplicaba la velocidad del MR HA-Ca, con un periodo de adaptación bacteriano corto alrededor de siete días.

En el caso de los bio-reactores en continuo, el uso de MR incrementó el porcentaje de reducción del contaminante, iopromida, así como la velocidad de transformación en más del doble a lo que se obtiene utilizando el lodo solo. A diferencia de la experimentación en lote el comportamiento de los humiados HA-M es similar entre ellos, aunque el HA-Fe presenta una mayor velocidad de transformación de iopromida que el humioto HA-Ca, después de 38 días operación se llega a la máxima biotransformación para ambos que es de 80%.

La principal ventajas que presenta esta técnica en comparación a otras técnicas de inmovilización, es la inexistencia de un soporte fijo. Al ser un compuesto sólido insoluble que existe de manera natural en la humina, se mantiene por periodos muy largos de tiempo, a diferencia de las SH solubles inmovilizadas en matrices sólidas, que con el tiempo, tienen pérdidas del MR inmovilizados, disminuyendo significativamente la cantidad de MR disponible, para la biotransformación anaerobia de los contaminantes recalcitrantes.

Aun cuando falta mucho por desarrollar en esta línea de trabajo, como lo es la interacción de los metales en los ácidos húmicos de los complejos insolubles (humatos de metales divalentes) HA-M, las cantidades estequiometrias a usar del mediador redox en los bioreactores, la interacción del mediador redox insoluble con el lodo en la formación de gránulo por mencionar algunas, el usar sustancias húmicas insolubles “los humatos” co-inmovilizadas con MRH es una propuesta clave para el desarrollo de mediadores redox con las características óptimas para emplearse a escala real, evitando la pérdida continua por lavados en el reactor.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Alphenaar, P. A. (1994) Anaerobic granular sludge: characterization and factors affecting its functioning., Landbouwniversiteit te Wageningen.
2. Alvarez L.H., Cervantes F.J., Gortares P., (2013) Avances en la Aplicación de Mediadores Redox Durante la (Bio) Transformación de Contaminantes Recalcitrantes. *BioTecnología*, 17, 3. 43
3. Alvarez LH, Jimenez L, Hernandez-Montoya V & Cervantes FJ (2012) Enhanced dechlorination of carbon tetrachloride by immobilized fulvic acids on alumina particles. *Water Air and Soil Poll.*, 223: 1911-1920.
4. Atkins, P. W., & De Paula, J. (1991). *Fisicoquímica* (pp. 458-460). USA: Addison-Wesley Iberoamericana.
5. Benedetti, M. F.; Milne, C. J.; Kinniburgh, D. G.; van Riemsdijk, W. H.; Koopal, L. K. (1995) *Environ. Sci. Technol*, 29, 446-457.
6. Buffle, J. (1998) *Complexation Reactions in Aquatic Systems*, Ellis Horwood, Chichester
7. Buseti, F., Linge, K. L., Blythe, J. W., & Heitz, A. (2008). Rapid analysis of iodinated X-ray contrast media in secondary and tertiary treated wastewater by direct injection liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1213(2), 200-208.
8. Carballa, M., Omil, F., Lema, J. M., Llombart, M., García-Jares, C., Rodríguez, I., & Ternes, T. (2004). Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. *Water research*, 38(12), 2918-2926.
9. Cervantes FJ, González-Estrella J, Márquez A, Alvarez LH & Arriaga S. (2011) Immobilized humic substances on an anion exchange resin and their role on the redox biotransformation of contaminants. *Bioresour. Technol.*, 102: 2097-2100

10. Cervantes FJ, Vu-Thi-Thu L, Lettinga G, Field JA.(2004) Quinone-respiration improves dechlorination of carbon tetrachloride by anaerobic sludge. *Appl Microbiol Biotechnol*;64:702–11.
11. Clara, M., Strenn, B., Gans, O., Martinez, E., Kreuzinger, N., & Kroiss, H. (2005). Removal of selected pharmaceuticals, fragrances and endocrine disrupting compounds in a membrane bioreactor and conventional wastewater treatment plants. *Water research*, 39(19), 4797-4807.
12. Curtis GP,(1994) Reinhard M. Reductive dehalogenation of hexachloroethane, carbón tetrachloride, and bromoform by anthraquinone disulfonate and humic acid. *Environ Sci Technol*;28:2393–401
13. Dolfing, J., Tiedje, J. M. (1986) Hydrogen cycling in a three-tiered food web growing on the methanogenic conversion of 3-chlorobenzoate. *FEM Microbiol. Ecol.*, 38: 293-298
14. Doll, T. E., & Frimmel, F. H. (2004). Kinetic study of photocatalytic degradation of carbamazepine, clofibric acid, iomeprol and iopromide assisted by different TiO_2 materials—determination of intermediates and reaction pathways. *Water research*, 38(4), 955-964.
15. Dunnivant FM, Schwarzenbach RP, Macalady DL. Reduction of substituted nitrobenzenes in aqueous solutions containing natural organic matter. *Environ Sci Technol* 1992;26:2133–41
16. Fetzner, S and Lingens, F. Bacterial dehalogenases: Biochemistry, genetics, and biotechnological applications. *Microbiological Reviews*. Dec. 1994, 641-685b
17. Field JA, Cervantes FJ, van der Zee FP & Lettinga G (2000) Role of quinones in the biodegradation of priority pollutants: a review. *Wat. Sci. Technol.* 42: 215-222
18. Field JA, Cervantes FJ. (2005) 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, vol. 52 Dordrecht, The Netherlands: Springer; p. 343–52.
19. Haiß, A., & Kümmerer, K. (2006). Biodegradability of the X-ray contrast compound diatrizoic acid, identification of aerobic degradation products and effects against sewage sludge micro-organisms. *Chemosphere*, 62(2), 294-302
 20. Halling-Sørensen, B., Nors Nielsen, S., Lanzky, P. F., Ingerslev, F., Holten Lützhøft, H. C., & Jørgensen, S. E. (1998). Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment-A review. *Chemosphere*, 36(2), 357-393.
 21. Hernández V, Alvarez LH, Montes-Moran MA & Cervantes FJ (2012) Reduction of quinone and non-quinone redox functional groups in different humic acid samples by *Geobacter sulfurreducens*. *Geoderma* 183-184: 25-31.
 22. Hirsch, R., Ternes, T. A., Lindart, A., Haberer, K., & Wilken, R. D. (2000). A sensitive method for the determination of iodine containing diagnostic agents in aqueous matrices using LC-electrospray-tandem-MS detection. *Fresenius' journal of analytical chemistry*, 366(8), 835-841.
 23. Horowitz, A., Shelton, D. R., Cornell, C. P., Tiedje, J. M. (1982) Anaerobic degradation of aromatic compounds in sediments and digest sludge. *Dev. Ind. Microbiol*, 23: 435-444
 24. Hulshoff Pol LW. The phenomenon of granulation of anaerobic sludge. (1989) Ph.D. Thesis Agricultural University Wageningen, The Netherlands. In Alphenaar, P. A. Anaerobic granular sludge: characterization and factors affecting its functioning. 1994, Landbouwniversiteit te Wageningen
 25. Hulshoff Pol, L. W., de Castro Lopes, S. I., Lettinga, G., & Lens, P. N. L. (2004) Anaerobic sludge granulation. *Water Res.* 38(6), 1376-1389.
 26. Jones, M. N.; Bryan, N. D. *Adv.* (1998) *Colloid Interface Sci.* 78, 1-48.

27. Joss, A., Zabczynski, S., Göbel, A., Hoffmann, B., Löffler, D., Mc Ardell, C. S., & Siegrist, H. (2006). Biological degradation of pharmaceuticals in municipal wastewater treatment: proposing a classification scheme. *Water Research*, 40(8), 1686-1696.
28. Kalsch, W. (1999). Biodegradation of the iodinated X-ray contrast media diatrizoate and iopromide. *Science of the total environment*, 225(1), 143-153.
29. Kappler A, Haderlein SB. (2003) Natural organic matter as reductant for chlorinated aliphatic pollutants. *Environ Sci Technol* 37:2714–9.
30. Kim, S. D., Cho, J., Kim, I. S., Vanderford, B. J., & Snyder, S. A. (2007). Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters. *Water research*, 41(5), 1013-1021.
31. Kleerebezem, R. y Macarie, H. (2003). "Treating industrial wastewater: anaerobic digestion comes of age". *Chemical Eng.* 4, 56-64.
32. Kuhn, E. P. and Suflita, J. M. (1989) Sequential reductive dehalogenation of chloroanilines by microorganisms from a methanogenic aquifer. *Environ. Sci. Technol.* 23: 848-852
33. Lapworth, D. J., Baran, N., Stuart, M. E., & Ward, R. S. (2012). Emerging organic contaminants in groundwater: a review of sources, fate and occurrence. *Environ Pollut*, 163, 287-303.
34. Lecouturier, D., Rochex, A., & Lebeault, J. M. (2003). Enrichment and properties of an anaerobic mixed culture that reductively deiodinates 5-amino-2, 4, 6-triiodoisophthalic acid, an X-ray contrast agent precursor. *Applied microbiology and biotechnology*, 62(5-6), 550-556.
35. Löffler, D., Römbke, J., Meller, M., & Ternes, T. A. (2005). Environmental fate of pharmaceuticals in water/sediment systems. *Environmental Science & Technology*, 39(14), 5209-5218.

36. Lovley DR, Woodward JC, Chapelle FH (1996) Rapid anaerobic benzene oxidation with a variety of chelated Fe(III) forms. *Appl Environ Microbiol*, 62(1):288–291
37. Madsen, T. and Aamand, J.(1992) Anaerobic transformation and toxicity of trichlorophenols in a stable enrichment culture. *Appl. Environ. Microbiol.* , 58: 557-561
38. Martinez, C. M., Alvarez, L. H., Celis, L. B., & Cervantes, F. J.(2013) Humus-reducing microorganisms and their valuable contribution in environmental processes. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(24), 10293-10308
39. McMurry, J. (2001), *Química Orgánica*, 5ª. Edición, México, Ed. International Thomson Editores, S.A. de C.V.
40. Muetzel, W., & Speck, U. (1983). Pharmacochemical profile of iopromide. *American Journal of Neuroradiology*, 4(3), 350-352.
41. Mulder A. (1984) The effects of high sulfate concentrations on the methane formation of waste water. In: Houwink EH & van der Meer RR (eds.) *Innovations in biotechnology*. Elsevier Science Publishers. B.V. Amsterdam, ppl33-143.
42. Muller, F., and Caillard, L. (1986) Chlorophenols. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 5th ed., Vol. A7. W.Gerhartz et al. (Ed.). VCH Publishers, New York, N.Y.
43. Oleksy-Frenzel J, Wischnack S, Jekel M. (1995) Determination of organic group parameters AOCl, AOB_r and AOI in municipal waste water. *Vom Wasser* 85:59–67.
44. Peijnenburg WJGM, 't Hart MJ, Den Hollander HA, Van de Meent D, Verboom HH, et al. (1992) QSARs for predicting reductive transformation rate constants of halogenated aromatic hydrocarbons in anoxic sediment systems. *Environ Toxicol Chem*;11:301–14

45. Pérez, S., Eichhorn, P., Celiz, M. D., & Aga, D. S. (2006). Structural characterization of metabolites of the X-ray contrast agent iopromide in activated sludge using ion trap mass spectrometry. *Analytical chemistry*, 78(6), 1866-1874.
46. Piccolo, A. The supramolecular structure of humic substances.(2001) *Soil Sci*, 166, 810-832
47. Piccolo, A., & Stevenson, F. J. (1982). Infrared spectra of Cu²⁺ Pb²⁺ and Ca²⁺ complexes of soil humic substances. *Geoderma*, 27(3), 195-208.
48. Putschew, A., Schittko, S., & Jekel, M. (2001). Quantification of triiodinated benzene derivatives and X-ray contrast media in water samples by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 930(1), 127-134
49. Ratasuk N & Nanny MA (2007) Characterization and quantification of reversible redox sites in humic substances. *Environ. Sci. Technol.* 41: 7844–7850
50. Roden, E. E.; Kappler, A.; Bauer, I.; Jiang, J.; Paul, A.; Stoesser, R.; Konishi, H.; Xu, H. F. (2010) Extracellular electron transfer through microbial reduction of solid-phase humic substances. *Nat. Geosci*, 3 (6), 417–421.
51. Sacher, F., Lange, F. T., Brauch, H. J., & Blankenhorn, I. (2001). Pharmaceuticals in groundwaters: analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg, Germany. *Journal of Chromatography A*, 938(1), 199-210.
52. Sacher, F., Lange, F. T., Brauch, H. J., & Blankenhorn, I. (2001). Pharmaceuticals in groundwaters: analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg, Germany. *Journal of Chromatography A*, 938(1), 199-210.
53. Schulten H-R. (1994). A chemical structure for humic acid. Pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry and pyrolysis-soft ionization mass spectrometry evidence. In: Senesi N, Miano TM, editors. *Humic substances in*

- the global environment and implications on human health. Amsterdam: Elsevier. 1994 p. 43–56. In Filip, Z. K., Bielek, P., & Demnerova, K. Prerequisites and susceptibility of humic acids to microbial utilization and transformation—a review. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 2011, 57(5), 445-454.
54. Schulten H-R. (1999). Analytical pyrolysis and computational chemistry of aquatic humic substances and dissolved organic matter. *J Analyt Appl Pyrolysis*. 49:385–415.
55. Seitz, W., Jiang, J. Q., Weber, W. H., Lloyd, B. J., Maier, M., & Maier, D. (2006). Removal of iodinated X-ray contrast media during drinking water treatment. *Environmental Chemistry*, 3(1), 35-39
56. Seitz, W., Weber, W. H., Jiang, J. Q., Lloyd, B. J., Maier, M., Maier, D., & Schulz, W. (2006). Monitoring of iodinated X-ray contrast media in surface water. *Chemosphere*, 64(8), 1318-1324.
57. Steger-Hartmann, T., Länge, R., & Schweinfurth, H. (1999). Environmental risk assessment for the widely used iodinated X-ray contrast agent iopromide (Ultravist). *ECotox Environ Safe*, 42(3), 274-281
58. Stevenson FJ. Geochemistry of soil humic substances. In: Aiken GR, McKnight DM, Wershaw RL, editors. *Humic substances in soil, sediment, and water*. New York: Wiley. p. 13–52. *Environ Sci Technol*. 1985, 39:9009–9015. In Filip, Z. K., Bielek, P., & Demnerova, K. Prerequisites and susceptibility of humic acids to microbial utilization and transformation—a review. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 2011, 57(5), 445-454
59. Suflita, J. M., Horowitz, A., Shelton, D. R., Tiedje, J. M., (1982) Dehalogenation: a novel pathway for the anaerobic biodegradation of haloaromatic compounds. *Science*, 218: 1115-1117
60. Sutton R, Sposito G. (2005) Molecular structure in soil humic substances: the new view. *Environ Sci Technology* 23:9009–9015.

61. Ternes, T. A., & Hirsch, R. (2000). Occurrence and behavior of X-ray contrast media in sewage facilities and the aquatic environment. *Environmental science & technology*, 34(13), 2741-2748.
62. Tratnyek PG, Macalady DL (1989) Abiotic reduction of nitro aromatic pesticides in anaerobic laboratory systems. *J Agr Food Chem* 37(1): 248–254 in Martinez, C. M., Alvarez, L. H., Celis, L. B., & Cervantes, F. J. (2013). Humus-reducing microorganisms and their valuable contribution in environmental processes. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(24), 10293-10308.
63. Trenholm, R. A., Vanderford, B. J., Holady, J. C., Rexing, D. J., & Snyder, S. A. (2006). Broad range analysis of endocrine disruptors and pharmaceuticals using gas chromatography and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Chemosphere*, 65(11), 1990-1998.
64. Van der Hoek JP. Granulation of denitrifying sludge. (1988) In: Lettinga G, Zehnder AJB, Grotenhuis JTC, Hulshoff Pol LW (eds), *Granular anaerobic sludge: Microbiology and technology*. Pudoc, Wageningen, The Netherlands, pp203-210
65. Van der Zee, F. P., & Cervantes, F. J. (2009) Impact and application of electron shuttles on the redox (bio) transformation of contaminants: a review. *Biotechnology advances*, 27(3), 256-277.
66. Van Haandel, A.; Kato, M. T.; Cavalcanti, P. F. F.; Florencio, L. (2006) Anaerobic reactor design concepts for the treatment of domestic wastewater. *Rev. Environ. Sci. Bio/Technol.* 5, 21–38
67. Young, L.Y. (1984) Anaerobic degradation of aromatic compounds. In *Microbial Degradation of Organic Compounds*, ed. D.T. Gibson. New York. Dekker: 487-523
68. Zhang, C., Zhang, D., Li, Z., Akatsuka, T., Yang, S., Suzuki, D., & Katayama, A. (2014), Insoluble Fe-HA complex as a solid-phase electron mediator for microbial reductive dechlorination. *Environ. Sci. Technol.* 2014, 48 (11), pp 6318–6325.

69. Zhang, D., Zhang, C., Xiao, Z., Suzuki, D., & Katayama, A. (2014). Humic as an electron donor for enhancement of multiple microbial reduction reactions with different redox potentials in a consortium. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. *119*(2), 188-194