



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
IZTAPALAPA

Departamento de Biotecnología.

Capacidad metabólica y enzimática de un lodo granular nitrificante para la eliminación de amonio y *p*-cresol: Estudio cinético.

Para obtener el grado de Especialista en Biotecnología

Presenta:

I.B.I Jacqueline Covarrubias Vallejo

Director de Tesis:

Dr. Ricardo Beristáin Cardoso

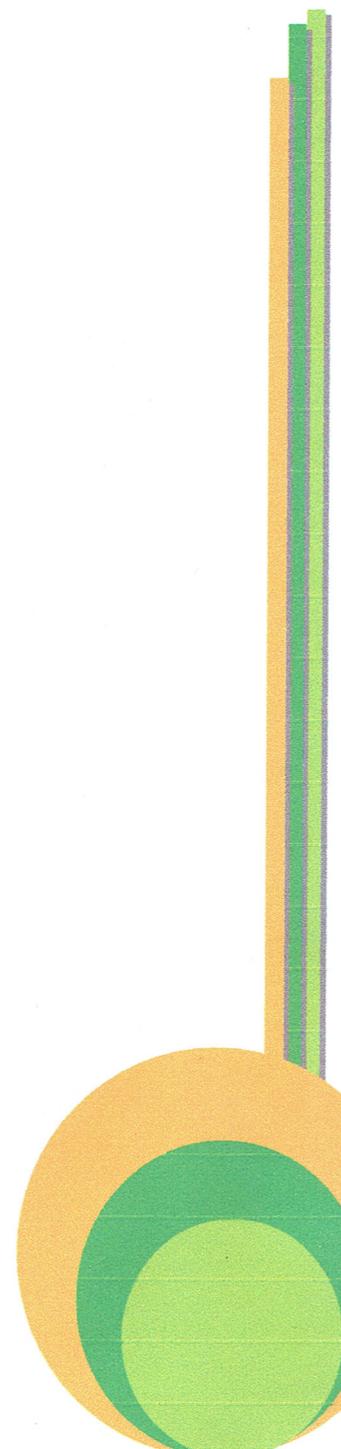
UAM- Iztapalapa.

Asesora:

Dra. Lilia Arely Prado Barragán.

México, D.F.

Enero 2016



| | |
|--|-----------|
| AGRADECIMIENTOS..... | 3 |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 4 |
| 1.1 Tratamiento de las aguas residuales en México | 5 |
| 1.2 Procesos de tratamiento de aguas residuales | 6 |
| 1.3 Principales contaminantes presentes en las aguas residuales..... | 7 |
| 1.4 Biotransformación de los compuestos aromáticos (<i>p</i> -cresol)..... | 8 |
| 1.5 Ciclo del nitrógeno..... | 9 |
| 1.6 Desnitrificación..... | 11 |
| 1.6.1 Principales factores que afectan la desnitrificación..... | 12 |
| 1.7 Nitrificación..... | 12 |
| 1.7.1 Principales factores que afectan la nitrificación..... | 14 |
| 2. ANTECEDENTES..... | 14 |
| 3. JUSTIFICACIÓN..... | 15 |
| 4. OBJETIVO GENERAL..... | 15 |
| 4.1. OBJETIVOS ESPECIFICOS..... | 15 |
| 5. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 15 |
| 5.1 Características del reactor continuo de tanque agitado (RCTA)..... | 15 |
| 5.2 Fuente de inóculo..... | 16 |
| 5.3 Características del medio de cultivo..... | 16 |
| 5.4 Operación del reactor continuo de tanque agitado alimentado de forma secuencial..... | 17 |
| 5.5 Estudios en lote con el lodo granular en cultivos lote..... | 17 |
| 5.6 Estudios en lote con el extracto enzimático libre y en capsulado..... | 18 |
| 5.6.1 Efecto de volumen y tiempo de sonicación en la extracción de la proteína intracelular..... | 18 |
| 5.6.2 Actividad enzimática: Extractos libres..... | 18 |
| 5.6.3 Actividad enzimática: Extracto encapsulado en alginato de sodio..... | 18 |
| 5.7 Métodos analíticos..... | 19 |
| 5.7.1 Determinación de amonio (NH ₄ ⁺)..... | 19 |
| 5.7.2 Sólidos suspendidos volátiles..... | 19 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 5.7.3 | Determinación de los compuestos nitrogenados..... | 19 |
| 5.7.4 | Determinación de <i>p</i> -cresol e intermediarios..... | 20 |
| 5.7.5 | Determinación de proteína microbiana..... | 20 |
| 6 | RESULTADOS..... | 21 |
| 6.1 | Puesta punto las técnicas de medición..... | 21 |
| 6.2 | Comportamiento de los compuestos carbonados y nitrogenados en el reactor de tanque agitado..... | 21 |
| 6.3 | Cultivos lote empleando lodo granular..... | 22 |
| 6.4 | Efecto del volumen y tiempo de sonicación en la extracción de la proteína microbiana Intracelular..... | 23 |
| 6.5 | Cultivos lote empleando los extractos enzimáticos libres..... | 23 |
| 6.6 | Cultivos en lote empleando los extractos enzimáticos encapsulados en alginato de calcio..... | 26 |
| 7 | CONCLUSIONES..... | 29 |
| 8 | ANEXOS..... | 30 |
| 8.1 | Métodos de Análisis..... | 30 |
| 8.1.1 | Cuantificación de amonio..... | 30 |
| 8.1.2 | Cuantificación de los sólidos suspendidos volátiles..... | 31 |
| 8.1.3 | Cuantificación de los compuestos nitrogenados..... | 31 |
| 8.1.4 | Determinación de <i>p</i> -cresol e intermediarios..... | 32 |
| 8.1.5 | Determinación de proteína microbiana..... | 33 |
| 9.0 | Referencias | 35 |

Agradecimientos:

Agradecimientos:

Este proyecto fue financiado por e CONACyT, México, con el convenio (CB-2011-01 164746).

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Fisiología Microbiana W-004 del departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

A mis padres Nora y Mario por su apoyo incondicional en cada una de mis decisiones ya que con su amor me han brindando la fuerza de seguir cada día adelante para lograr nuevas metas en mi vida.

A mis hermanos Diana, Mario y Nancy que sin duda alguna me han acompañado a lo largo de este camino y estoy muy segura que lo seguirán haciendo, gracias por estar conmigo hoy y siempre.

A mis amigas Ailed y Concepción con quienes compartí un techo, puntos de vista diferentes que nos ayudaron a crecer profesionalmente la verdad me divertí mucho con ustedes, los caminos al final fueron diferentes pero la vida sigue, así que les deseo éxito en lo que se propongan.

A mis estimados directores y asesores, que durante este recorrido se convirtieron en mis amigos Ricardo Beristain, Arely Prado, Gehovana González y David Silva gracias por sus críticas y apoyo incondicional en este proyecto.

Gracias a todos mis compañeros de laboratorio W-004 Kary, Diego, Alejandro, Felipe, Emmanuel, Emir, Antonio y Sergio por escucharme y ayudarme en lo que necesité y de igual forma a mis compañeros del W-106 que hicieron mi estancia más amena.

1. Introducción

El agua es una sustancia esencial para los seres vivos, la cual es contaminada constantemente por actividades humanas, creando así un impacto adverso al ecosistema y a la salud pública. Estas descargas de aguas residuales son provenientes de la industria petroquímica, tenería, del papel, entre otros. Este tipo de aguas tiene gran relevancia a nivel mundial, por la presencia de compuestos fenólicos (*p*-cresol, fenol, etc.) y amonio, principalmente. Debido a esto, cobra importancia la necesidad de desarrollar y caracterizar sistemas biológicos que permitan tratar este tipo de efluentes antes de ser descargados a los cuerpos receptores. Los procesos de tratamiento biológico, de las aguas residuales, son recomendados como alternativa o tratamiento complementario a los métodos fisicoquímicos, dado que estos últimos ocasionan contaminación colateral durante su aplicación.

El diseño y operación de los procesos biológicos utilizados para el tratamiento de aguas residuales suelen ser más eficientes al estudiar el aspecto fisiológico de los microorganismos involucrados por lo que se optimizan los procesos ya establecidos o desarrollar nuevos sistemas, para disponer de agua de calidad y en suficiente cantidad, lo que permitirá mejorar el ambiente, la salud y la calidad de vida. En México, debido a los altos costos de para la infraestructura, la falta de mantenimiento y de personal capacitado, sólo el 38 % de las aguas residuales generadas reciben tratamiento, lo cual crea la necesidad de desarrollar tecnologías para su depuración (CONAGUA 2007).

La ley de aguas nacionales y normas oficiales mexicanas trabajan conjuntamente para preservar la calidad de los cuerpos receptores, por lo que la NOM-001-ECOL-1996 establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales y bienes nacionales. La norma oficial mexicana NOM-CCA-031-ECOL/1993 establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales provenientes de la industria, actividades agroindustriales, y el tratamiento de aguas residuales a los sistemas de drenaje y alcantarillado urbano y municipal.

1.1 Tratamiento de las aguas residuales en México.

Al desarrollo de la civilización lo ha acompañado el aumento de la densidad demográfica y la expansión industrial, teniendo como consecuencia el descuido del tratamiento de aguas residuales que genera la población. Anualmente, México recibe alrededor de 1489×10^9 de metros cúbicos de agua en forma de precipitación, 73.2% se evapotranspira y regresa a la atmósfera, 22.1% escurre por los ríos y arroyos, y el 4.7% se infiltra al subsuelo y recarga acuíferos. En 2007, el país tenía una disponibilidad natural media de 458 mil millones de metros cúbicos de agua dulce renovable, también denominada disponibilidad natural media (CONAGUA 2010).

El tratamiento y reúso de las descargas residuales se clasifica en municipales e industriales. Las primeras son manejadas por sistemas de alcantarillado y urbano, mientras que las segundas son descargadas directamente a los cuerpos receptores de propiedad nacional, como es el caso de la industria autoabastecida. Por lo que el buen uso del agua es responsabilidad de todos los ciudadanos y no sólo de las autoridades, por ello es importante fortalecer y difundir la cultura del agua en todos los niveles de la vida y actividades públicas y privadas (INEGI, 2009).

El panorama actual en México registra que desde el 2010, se detectaron dos mil 354 sitios de descarga de aguas residuales por lo que el 54% de las descargas de aguas residuales sin tratamiento se van a ríos y arroyos. Donde los estados como Jalisco, Michoacán, México, Veracruz y Chiapas registran más de 100 puntos de descarga de aguas residuales sin tratamiento en ríos y arroyos, concentrando el 49% del total nacional. México cuenta con 2 mil 457 municipios y de estos solo 1457 sitios reciben algún tratamiento en sus aguas residuales.

De acuerdo a la norma mexicana (NOM 002) las aguas residuales pueden clasificarse en:

- Aguas residuales domésticas: provienen viviendas así como de servicios generados principalmente por el metabolismo humano y las actividades domésticas.
- Aguas residuales industriales: provienen de efluentes de actividades industriales y comerciales; las cuales no son ni domésticas ni de escurrimientos pluviales.
- Aguas residuales agropecuarias: provienen de efluentes de actividad humana orientada al cultivo del campo y la crianza de animales.

Por lo que se estima que en México se reutiliza 4 722 millones de metros cúbicos de aguas residuales ($150 \text{ m}^3/\text{s}$) en 2007. La agricultura ocupa el primer lugar en el reúso de aguas municipales; la industria el segundo sitio y las hidroeléctricas en tercer lugar. En el reúso de agua de origen industrial destacan las aguas residuales de los ingenios azucareros en el cultivo de la caña, principalmente en el estado de Veracruz (INEGI, 2009).

1.2 Procesos de tratamiento de aguas residuales

Para el tratamiento de las aguas residuales existen diversos procesos y operaciones unitarias; los cuales se clasifican en procesos físicos, químicos y biológicos, que con una adecuada selección y combinación de estos pueden cambiar la forma del contaminante a una más fácil de eliminar del agua, con el objetivo de minimizar el daño, que ocasionan los efluentes provenientes de la industria, doméstica y agropecuaria etc. que son descargados a cuerpos receptores, sin ser previamente tratados por alguno de estos procesos. Los procesos fisicoquímicos se reportan más costosos que los procesos biológicos, además de que los procesos fisicoquímicos solo trasladan el contaminante de un lugar a otro. La recuperación de aguas residuales industriales representa un mayor reto para la capacidad metabólica de los microorganismos, dada a su composición química compleja, haciendo que los procesos biológicos suelen ser lentos, ineficaces y que los productos finales sean indeseables. La eliminación biológica del nitrógeno por los procesos acoplados de nitrificación y desnitrificación puede constituir una alternativa de tratamiento efectiva, sustentable y económicamente factible para la depuración de aguas residuales. Los resultados podrían permitir el acoplamiento de ambos procesos para tratar las aguas residuales de composición química compleja.

Otra de las alternativas tecnológicas es el encapsulamiento de enzimas para el tratamiento de aguas residuales; algunas ventajas que tiene el proceso de encapsulación en la actividad enzimática son el aumento de la estabilidad de la enzima y la posible reutilización del derivado por lo que disminuye costos (Miguel Arroyo, 1998). Además el encapsulamiento de enzimas permite la posibilidad de diseñar un reactor enzimático de fácil manejo y control. Los diferentes tipos de reactores enzimáticos aparecen en la Figura 1. Estos reactores con enzimas inmovilizadas permiten el empleo de cargas elevadas de enzima, la cual mantendrá su actividad durante más tiempo. Estos sistemas pueden incluir el reciclado, lo que permite la obtención de productos con mayor pureza.

Los principales inconvenientes del proceso de inmovilización son:

La alteración de la conformación de la enzima respecto de su estado nativo, la gran heterogeneidad del sistema enzima-soporte donde pueden existir distintas fracciones de proteínas inmovilizadas con un diferente número de uniones al soporte, siempre suele haber una pérdida de actividad de la enzima durante la inmovilización, el biocatalizador es más caro que la enzima nativa.

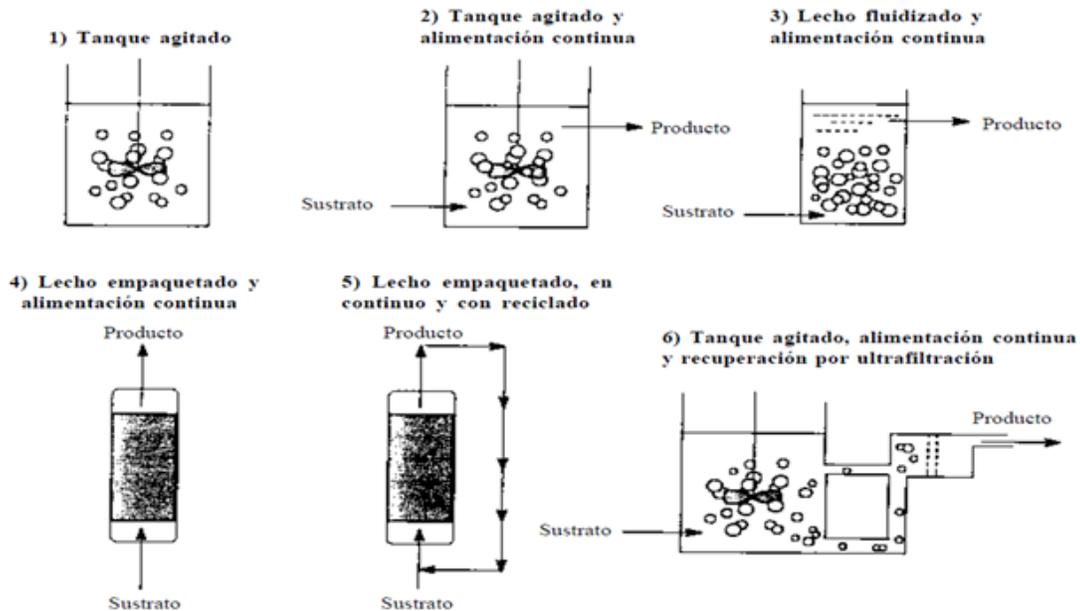


Figura 1. Reactores enzimáticos que emplean enzimas inmovilizadas.

1.3 Principales contaminantes presentes en las aguas residuales.

Las aguas amargas son aguas residuales que se producen en algunos procesos de la refinación del petróleo. El agua amarga es agua de proceso que contiene ácido sulfhídrico, amoníaco, fenoles, hidrocarburos durante la destilación, en la regeneración de catalizador o al absorber el vapor ácido sulfhídrico durante el hidrotratamiento y e hidroacabado. También se genera por la adición de agua a procesos para absorber ácido sulfúrico y amoníaco). Contienen altas concentraciones de sulfuro, nitrógeno y compuestos fenólicos. El fenol parece ser reconocido como tóxico o letal en peces a concentraciones de 5 a 25 mg/L. (Razo-Flores et al., 2003). Por lo que una alternativa para el tratamiento de este tipo de efluente por los ciclos biológicos del nitrógeno y del azufre.

Para el caso del amonio presente en el medio ambiente procede de procesos metabólicos, agropecuarios e industriales. Las concentraciones naturales en aguas subterráneas y superficiales suelen ser menores que 0.2 mg/L, pero las aguas subterráneas anaerobias pueden contener hasta 3 mg/L y la ganadería intensiva pueden generar concentraciones mucho mayores en aguas superficiales. La presencia de

amoniaco en el agua de consumo no tiene repercusiones inmediatas sobre la salud, de modo que no se propone un valor de referencia basado en efectos sobre la salud. Por lo que el amoniaco puede reducir la eficiencia de la desinfección, ocasionar la formación de nitrito en sistemas de distribución, y producir problemas organolépticos.

Tabla 1. Límites máximos para la presencia de sustancias nocivas en el agua de consumo humano de la Organización Mundial de la Salud (OMS).

| Sustancia | Concentración máxima (mg/L) |
|-------------------------|-----------------------------|
| Sales totales | 2000 |
| Cloruros | 600 |
| Sulfatos | 300 |
| Nitratos | 45 |
| Nitritos | 0.0 |
| Amoniaco | 0.5 |
| Materia orgánica | 3 |
| Calcio | 80 |
| Magnesio | 50 |
| Arsénico | 0.05 |
| Cadmio | 0.01 |
| Cianuro | 0.05 |
| Plomo | 0.1 |
| Mercurio | 0.001 |

1.4 Biotransformación de los compuestos aromáticos (p-cresol).

La recuperación de aguas residuales industriales representa un mayor reto para la capacidad metabólica de los microorganismos por lo que una alternativa para la degradación de estos compuestos presentes en aguas residuales se lleva a cabo por el metabolismo aerobio o anaerobio. Muchos compuestos aromáticos son utilizados de forma aeróbica como donadores de electrones. Por ejemplo los microorganismos del género *Pseudomonas*; donde el catabolismo oxidativo sólo continúa después de que las moléculas aromáticas complejas se han convertido a formas más simples. Este catabolismo se lleva a cabo por tres vías (Figura 2): protocatecate, catecol y ácido gentísico, los cuales pueden ser oxidados después a compuestos que entran en el ciclo del ácido cítrico: succinato, acetyl-CoA y piruvato. Los pasos en el catabolismo de los hidrocarburos aromáticos suelen requerir oxigenasas. (Madigan y col. 2003).

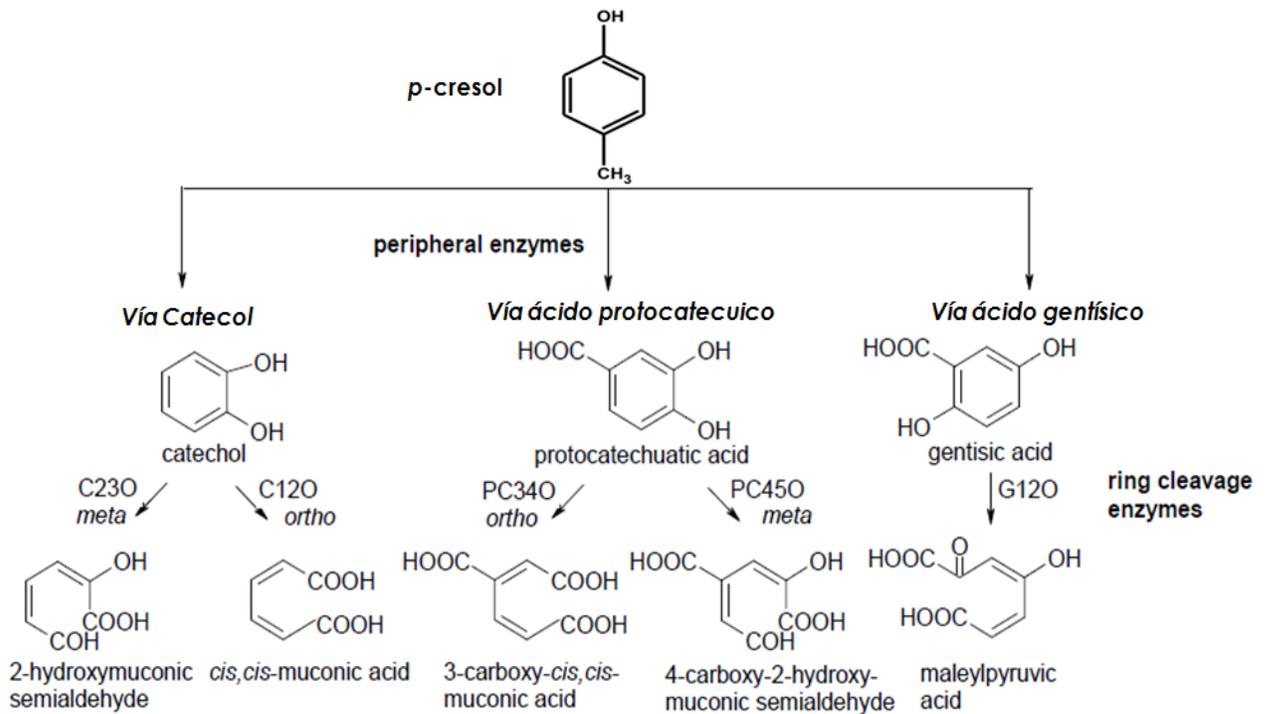


Figura 2. Oxidación de *p*-cresol: vía aerobia (Harwood y parales, 1996)

Estos compuestos fenólicos son producidos industrialmente y tiene múltiples usos, como la fabricación de explosivos, pinturas, medicamentos, textiles, antibacterianos, entre otros.

1.5 Ciclo del nitrógeno

El nitrógeno es un compuesto químicamente complejo debido a sus muchos estados de oxidación que puede asumir y al hecho de que ese cambio en el estado de oxidación puede ser llevado a cabo por organismos vivos. Este cambio de estado de oxidación producido por las bacterias, puede ser positivo o negativo, dependiendo de las condiciones aeróbicas o anaeróbicas prevalecientes (Sanwyer y McCarty, 1978).

En la Tabla 2 se muestran los estados de oxidación de las diversas especies en las que se puede encontrar el nitrógeno en la naturaleza.

Tabla 2. Estados de oxidación de compuestos nitrogenado (Madigan y col., 2003).

| Compuesto | Estados de oxidación |
|--|----------------------|
| Nitrógeno orgánico (R-NH₂) | -3 |
| Amoníaco (NH₃) | -3 |
| Gas Nitrógeno (N₂) | 0 |
| Óxido nitroso (N₂O) | + 1 (media por N) |
| Óxido de nitrógeno (NO) | +2 |
| Nitrito (NO₂⁻) | +3 |
| Dióxido de nitrógeno (NO₂) | +4 |
| Nitrato (NO₃⁻) | +5 |

En la naturaleza, la mayor parte del nitrógeno disponible se encuentra en forma orgánica, como amoníaco (NH₃), nitratos (NO₃⁻), o dinitrógeno (N₂). A pesar de que este último es el componente más abundante de la atmósfera (79%). Son muy pocos los organismos capaces de usarlo como fuente de nitrógeno. El ciclo biogeoquímico del nitrógeno depende en gran medida de la actividad de los microorganismos. Muchos hábitats dependen de las plantas para el suministro de carbono orgánico que pueda ser utilizado como fuente de energía, pero todos los hábitats dependen de la fijación bacteriana del nitrógeno atmosférico o de la intervención humana, a través de la distribución de abonos nitrogenados. Las plantas no podrían continuar su metabolismo fotosintético si no dispusieran de formas fijadoras de nitrógeno que les proporcionan los microorganismos. El ciclo del nitrógeno permite las diferentes transformaciones de circulación del nitrógeno atmosférico a través de los ambientes terrestres y acuáticos e incluye procesos de la fijación de N₂, la nitrificación, la desnitrificación, la asimilación y amonificación (Figura 3). Este movimiento de nitrógeno a través de la biosfera determina en gran medida la productividad ecológica de los ambientes terrestres (Castillo, 2005).

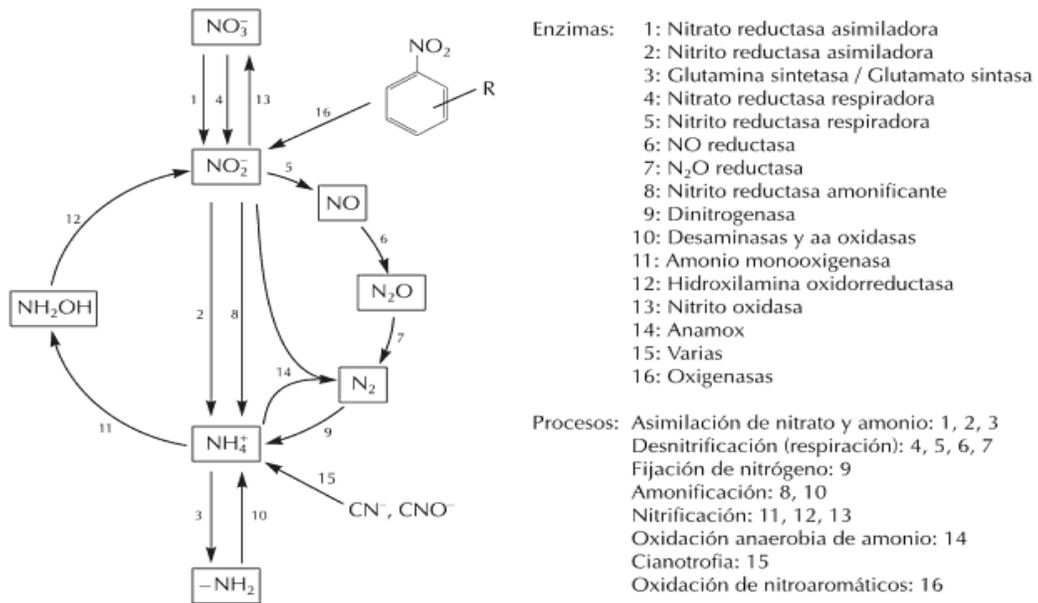
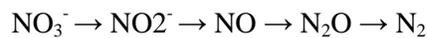


Figura 3. Ciclo del nitrógeno.

1.6 Desnitrificación

La desnitrificación es un proceso respiratorio anóxico, donde el nitrato es el aceptor final de electrones. El proceso de reducción de nitrato hasta nitrógeno molecular ocurre en etapas seriales, catalizadas por sistemas enzimáticos diferentes, apareciendo como productos intermedios: nitrito, óxido nítrico y óxido nitroso (Ross, 1982).



Los microorganismos que llevan a cabo un metabolismo asimilador de compuestos como NO_3^- son los organismos: arqueas, hongos, algas y plantas superiores, mientras que sólo las procariotas realizan el metabolismo desasimilativo. Sin embargo, el proceso de desnitrificación beneficia el tratamiento de aguas residuales porque convierte el NO_3^- en N_2 , por lo que significativamente disminuye la cantidad de nitrógeno que puede estimular el crecimiento de algas.

1.6.1 Principales factores que afectan la desnitrificación

Uno de los factores que afectan el proceso de desnitrificación es la temperatura ya que los microorganismos desnitrificantes presentan actividad entre 5 y 75 °C. Se ha visto que no existe un cambio significativo en la actividad desnitrificante entre 20 y 30°C con consorcios provenientes de plantas de tratamiento de aguas residuales (Henze, 1991). Otro factor es el pH, se ha reportado que el pH óptimo para la desnitrificación se encuentra entre 7 y 8 (Delwiche y col., 1976). A valores de pH por debajo de 6, se inhibe la enzima óxido nitroso reductasa y se acumula óxido nitroso (Cuervo-López y col., 1999). El oxígeno es otro factor que afecta este proceso, ya que la presencia de oxígeno favorece la competencia por electrones, ya que el oxígeno es un aceptor de electrones termodinámicamente más favorable que el nitrato (Ahn, 2006). Por otro lado, se ha reportado que la fuente donadora de electrones representa el paso limitante en la desnitrificación ya que para compuestos poco asimilables como los hidrocarburos y en particular compuestos aromáticos, las velocidades de consumo son el cuello de botella.

1.7 Nitrificación

Es un proceso respiratorio aerobio y litoautotrófico, donde se lleva a cabo la oxidación del amonio a nitrato vía nitrito por dos etapas (Prosser, 1989). En la primera etapa están presentes las bacterias amonio oxidantes, algunas de ellas son *Nitrosococcus*, *Nitrospira* y el género más estudiado *Nitrosomonas*. Las cuales llevan a cabo la oxidación de amonio a nitrito por la enzima amonio monooxigenasa (AMO). Como se observa en la reacción (1).



La (AMO) es una proteína transmembranal y ésta cataliza la incorporación de un solo átomo de O₂ en compuestos orgánicos como un grupo hidroxilo (OH⁻), mientras que el átomo restante de O₂ se reduce a H₂O.

La oxidación de NH₂OH a NO₂⁻ (reacción 2) es catalizada a nivel de periplasma por la enzima hidroxilamina oxidoreductasa (HAO).



Los electrones tienen un papel importante en el acoplamiento de las reacciones que se llevan a cabo en la oxidación de NH_3 a NO_2^- , ya que se requiere de dos electrones para reducir un átomo de O_2 a H_2O (Figura 4). Estos electrones se generan durante la oxidación de la NH_2OH y son suministrados a la AMO a partir de la HAO por medio del citocromo *c* y de la ubiquinona (Madigan y col., 2003).

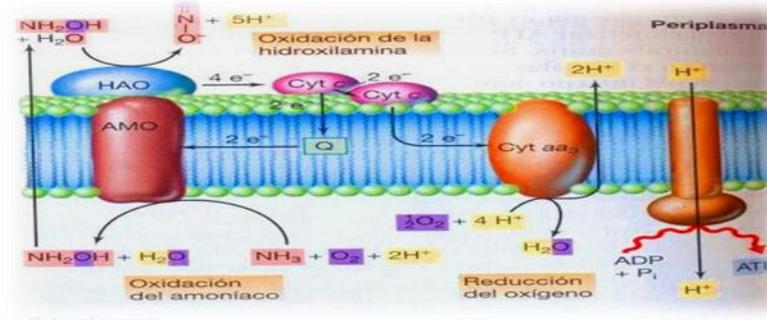
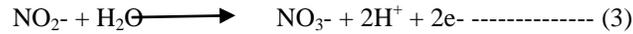


Figura 4. Flujo de electrones en las bacterias oxidantes de amoníaco (Madigan y col., 2009).

La segunda etapa consiste en la oxidación de NO_2^- a NO_3^- por la acción catalítica de la enzima nitrito oxidoreductasa (NOR), la cual se encuentra en la membrana (Figura 5). En la cadena de transporte de electrones de los oxidantes de nitritos están presentes citocromos del tipo *a* y *c*, una quinona y una deshidrogenasa dependiente del NADH. La reacción es la siguiente:



Por lo tanto, la reacción global del proceso nitrificante es la siguiente:

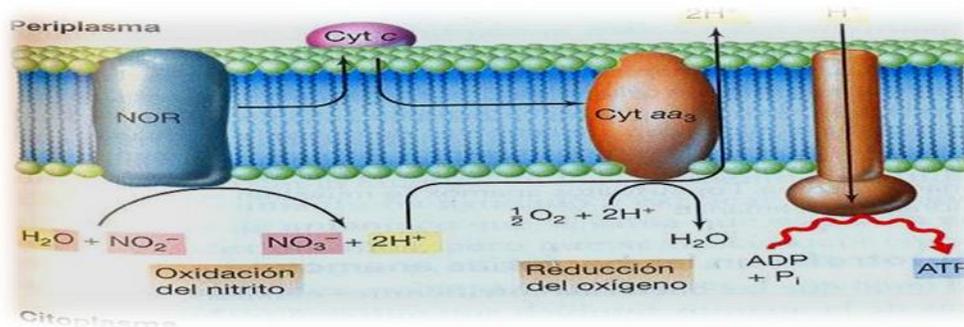


Figura 5. Oxidación de nitrito a nitrato por las bacterias nitrificantes (Madigan y col., 2009).

1.7.1 Principales Factores que afectan la nitrificación

La nitrificación también se ve limitada por la temperatura. Por debajo de los 5 °C y por encima de 40°C la actividad nitrificante disminuye.. Las bacterias nitrito oxidantes presentan mayor actividad cuando sus condiciones de temperatura son mesófilas (20 a 45°C) y a pH neutro (Proser y col., 1989). El intervalo de temperatura en el que presentan mayor crecimiento es de 25 a 30°C, a pH entre 7.5 y 8.0, con una concentración de sustrato de 36 a 900 mg NH₄⁺/L (Bock y col., 1991).

2. Antecedentes

La nitrificación se ve afectada negativamente por cambios en el valor del pH, concentración de biomasa inicial, tipo de sustrato (NH₃ o NH₄⁺), concentración de oxígeno disuelto, la presencia de materia orgánica o sulfuro, entre otros (Anthonisen y col., 1976; Hanaki y col., 1990; Beristain-Cardoso y col., 2009). En trabajos recientes, se ha mostrado que los lodos nitrificantes fisiológicamente estables pueden llevar a cabo la nitrificación en presencia de sulfuro y/o compuestos fenólicos (tolueno, *m*-xileno, fenol, *p*-cresol, *p*-hidroxibenzaldehído y 2-clorofenol), además de presentar la capacidad metabólica de oxidar la materia orgánica hasta CO₂ (Zepeda y col., 2006; Texier y Gómez 2007; Silva y col., 2009; Beristain-Cardoso y col. 2010; Silva y col., 2011). Cabe resaltar, que uno de los inconvenientes de los proceso aerobios, es la producción excesiva de lodos, principalmente cuando los reactores son alimentados con altas cargas orgánicas. La generación de lodos, es un problema ambiental, por lo que tienen que ser tratados antes de ser descargados, lo que implica el aumento de los costos de operación en una planta de tratamiento. El uso de enzimas inmovilizadas o encapsuladas podría ser una alternativa tecnológica para mitigar la producción de lodos.

La biotransformación de sustancias tóxicas vía enzimática tiene varias ventajas: alta especificidad para los sustratos, el uso en una amplia gama de condiciones ambientales, simplicidad y facilidad de control de los procesos (Gianfreda y Rao, 2004). Por ejemplo, Alemzadeha y col. (2009) observaron la eliminación eficiente de fenol utilizando una peroxidasa encapsulada en alginato de calcio, no obstante, los autores no identificaron los productos finales. Por otro lado, Lloret y col. (2011) observaron la eliminación de estrógenos utilizando a la enzima lacasa encapsulada en una matriz de gel basada en metiltrimetoxisilano y tetrametoxisilano. Sumino y col. (1991) llevaron a cabo la inmovilización de las bacterias nitrificantes en pellets porosos de gel uretano, observando una reducción en la concentración de N-NH₄⁺ del efluente alrededor del 90% y la vida de las pellets fue de al menos 120 días. Ju y col. (1997) evaluaron la eliminación de amoníaco utilizando enzimas inmovilizadas de la bacteria *N. europea*, la cual fue permeada previamente con una solución de acetona.

Cabe mencionar que en literatura la información es escasa respecto a la aplicación de enzimas para el tratamiento de aguas residuales de composición química compleja, las cuales contienen compuestos carbonados y nitrogenados. En el presente trabajo, el estudio de extractos enzimáticos encapsulados provenientes de un lodo granular aerobio para la oxidación de amonio y *p*-cresol podría ser una alternativa tecnológicamente factible, ya que el sistema de tratamiento podría ser más eficiente, y sobre todo se controlaría la producción de lodos, inconveniente principal de los procesos biológicos aerobios.

3. Justificación

La búsqueda de un sistema biológico que permita la eliminación de varios contaminantes a la vez, con subproductos que tengan un impacto mínimo al ecosistema, resulta relevante en el campo del tratamiento de aguas residuales. La nitrificación es un proceso que ha permitido la eliminación simultánea de más de un contaminantes a la vez (compuestos fenólicos y amonio). En el presente trabajo, se evaluará la capacidad enzimática de un extracto celular encapsulado en alginato de calcio para la eliminación de amonio y *p*-cresol, la cual podría ser una alternativa tecnológicamente factible.

4. Objetivo general

Evaluar la capacidad metabólica y enzimática de un lodo granular proveniente de un reactor continuo de tanque agitado, para la oxidación de amonio y *p*-cresol.

4.1 Objetivos específicos

- Estabilizar un reactor continuo de tanque agitado.
- Evaluar la actividad biológica para oxidar amonio y *p*-cresol, en cultivos lote.
- Encapsular en alginato de sodio el extracto enzimático extraído del lodo granular metabólicamente estable.
- Evaluar la capacidad enzimática del extracto encapsulado para la oxidación de amonio y *p*-cresol, en cultivos lote.

5. Materiales y Métodos

5.1 Características del reactor continuo de tanque agitado (RCTA)

Se utilizó un reactor Bioflo 2000 fermentor (marca new Brunswick scientific Co.), con un volumen nominal de 12 L y un volumen operacional de 6 L, con conexión de bombas peristálticas acopladas para el control del flujo del influente y efluente. Se controlaron los siguientes parámetros con

dispositivos externos: Temperatura de 25 °C; agitación de 200 rpm; pH de 7, y una concentración de oxígeno disuelto entre 4 ± 0.5 mg/L. Para la recirculación continua de la biomasa nitrificante se acopló un sedimentador con capacidad de 1.0 L.

5.2 Fuente de inóculo

Para inocular el reactor continuo de tanque agitado, se utilizó un consorcio nitrificante procedente del laboratorio de fisiología microbiana W004 de la UAM-Iztapalapa. Antes de su inoculación, el lodo se lavó dos veces con una solución isotónica (0.9%) de cloruro de sodio para eliminar residuos. El RCTA se inoculó con una concentración de 4.9 g de sólidos suspendidos volátiles (SSV)/L.

5.3 Características del medio de cultivo

En la Tabla 3 se muestra la composición del medio mineral que se utilizó para alimentar el RCTA, donde se adicionó también 1 ml/L del concentrado de elementos traza (Tabla 4). Para el proceso nitrificante, el amonio se utilizó como fuente de energía y de nitrógeno, mientras que la fuente de carbono para la ruta anabólica se utilizó al dióxido de carbono en forma de bicarbonato de sodio, y como fuente de carbono y de energía para los microorganismos heterótrofos el C-*p*-cresol.

| Medio mineral | Concentración (g/L) |
|--------------------------------------|---------------------|
| <i>C- p-cresol</i> | 0.4 |
| NH ₄ Cl | 0.1 |
| K ₂ HPO ₄ | 3.0 |
| kH ₂ PO ₄ | 4.5 |
| CaCl ₂ *2H ₂ O | 0.1 |
| NaCl | 0.1 |
| NaHCO ₃ | 3.5 |
| Elementostraza | 1 ml |

Tabla 3. Composición química del medio mineral.

| Elementos traza | Concentración (g/L) |
|--|---------------------|
| EDTA | 5 |
| CuSO ₄ * 5H ₂ O | 1.57 |
| CaCl ₂ *2H ₂ O | 5.54 |
| MnC ₁₂ | 5 |
| (NH ₄) ₆ MoO ₂₄ *4H ₂ O | 1.1 |
| FeCl ₃ | 5 |
| CoCl ₂ *6H ₂ O | 1.6 |
| MgCl ₂ *5H ₂ O | 5 |

Tabla 4. Composición química de los elementos traza (pH=7).

5.4 Operación del reactor continuo de tanque agitado alimentado de forma secuencial.

El RCTA se alimentó con amonio a una velocidad de carga de 200 mg/L d y un TRH de 2.5 días, hasta alcanzar el régimen estacionario nitrificante, es decir, cuando la velocidad de producción de nitrato mantenga un coeficiente de variación menor al 10%, y se cumpla el criterio de 5 TRH como mínimo. En el estado estacionario, el proceso respiratorio se evaluó a través de las siguientes variables de respuesta:

Eficiencia de consumo de sustrato:

$$E \% = \left(\frac{\text{mg de sustrato consumido}}{\text{mg de sustrato alimentado}} \right) * 100$$

Rendimiento de producto:

$$Y_{\text{producto}} = \left(\frac{\text{mg de producto formado}}{\text{mg de sustrato consumido}} \right) * 100$$

Velocidad específica:

$$q = \left(\frac{\text{mg sustrato o producto}}{\text{gSSV} \times \text{h}} \right) * 100$$

La eficiencia de consumo del sustrato se define como $E\% = ((S_{\text{inicial}} - S_{\text{final}}) / S_{\text{inicial}}) * 100$. Mientras que el rendimiento de producción se define como $Y = (\text{mg N, o C formado} / \text{mg N, o C consumido})$. El rendimiento puede proporcionar información relacionada con las vías metabólicas.

5.5 Estudios con el lodo granular en cultivos lote

Se realizó en matraces Erlenmeyer de 200 ml de volumen de operación, donde se evaluó la oxidación de amonio y *p*-cresol. La concentración inicial de biomasa fue 500 mg N-proteína/L, 100 mg/L N-NH₄⁺ y 100 mg/L C-*p*-cresol. El medio de cultivo, así como las condiciones ambientales fueron las mismas que se utilizaron en el RCTA. La aireación fue continua, manteniendo una concentración de oxígeno disuelto entre 4±0.5 mg de O₂/L. Los ensayos se hicieron por duplicado, y el proceso respiratorio se evaluó a través de la eficiencia de consumo (E%), rendimientos de producto (Y), y las velocidades específicas tanto de consumo (qs) como de producción (qp).

5.6 Estudios con el extracto enzimático libre y encapsulado en cultivos lote

5.6.1 Efecto de volumen y tiempo de sonicación en la extracción de la proteína intracelular.

Se tomaron 210 ml de lodo nitrificante del RCTA, y se le realizaron 3 lavados con medio mineral (Tabla 2). Posteriormente se realizó la ruptura de las células utilizando un equipo de sonicación (Sonicor Instrument Corporation-Copiage, N.Y.model number SC-100, Volts 110/120V, cycles 50/60 Hz, AMPS) a volúmenes de 50 y 20 ml, con tiempos de sonicación de 1 min, 30 y 13 s, respectivamente. Posteriormente la muestra fue centrifugada a 4500 rpm por un tiempo de 6 min (Centrifuga: Sol- bat). Se tomó un 1 ml del sobrenadante para cuantificar la proteína presente por el método de Lowry.

5.6.2 Actividad enzimática: Extractos libres

Se utilizaron matraces erlenmeyer de 250 ml, los cuales fueron inoculados con 50 ml del sobrenadante (extracto enzimático libre) obtenidos a diferentes tiempos de sonicación: 1min, 13 s y 30 s., y posteriormente se aforaron hasta 200ml con medio mineral. La concentración inicial fue de 50 mg C-*p*-cresol/L y 50 mg N-amonio/L. El estudio en lote se evaluó por un periodo de 8hrs, y bajo éstas condiciones la concentración de oxígeno disuelto se mantuvo entre 4-5 O₂/L, una temperatura de 30 °C, y un pH de 6.8.

5.6.3 Actividad enzimática: Extracto encapsulado en alginato de sodio

Se tomaron 200 ml de lodo nitrificante del RCTA y se le realizaron 3 lavados con medio mineral. A un volumen de 50 ml de muestra se le realizó la ruptura celular por un periodo de 1 minuto. Posteriormente el extracto enzimático se encapsuló en alginato de sodio. La encapsulación se llevó a cabo de acuerdo a la siguiente metodología propuesta por Nam Sun Wang y col (2010).

El alginato de sodio se disolvió en agua a una temperatura de 60°C, grado reactivo. Para la disolución del alginato de sodio en el agua se utilizó una espátula para la homogenización de la mezcla. El proceso de disolución es lento, por lo que tomó un tiempo aproximadamente de 3 horas para preparar una solución (6% w/v) de gel de alginato. El gel se colocó en un baño de hielo, para su uso posterior. El extracto celular (sobrenadante) se mezcló con el alginato de calcio y se colocó en una probeta de 50 ml y se dejó caer gota a gota a una altura de 10 cm a una solución de 200 ml de NaCl a 0.1M, para obtener capsulas esféricas. Posteriormente se tomó un volumen de 50 ml de esferas, con un peso aproximado de 33.15 g; estas se drenaron previamente para eliminar el exceso de agua. Se tomaron 50 ml de las esferas de alginato de sodio y se inocularon en matraces Erlenmeyer de 250 ml. La

concentración inicial de los sustratos fueron de 50 mg C-*p*-cresol y 50 N-NH₄⁺. El tiempo de reacción fue de 8hrs, y bajo estas condiciones la concentración de oxígeno disuelto fue de 4-5 O₂/L, una temperatura de 30°C, y un pH de 6.8.

5.7 Métodos analíticos

Los compuestos determinados para evaluar el proceso respiratorio nitrificante fueron: amonio, nitrito, nitrato, *p*-cresol, *p*-hidroxibenzaldehído, *p*-hidroxibenzilalcohol, *p*-hidroxibenzoato y Benzaldehído.

Los principios de los métodos analíticos, así como los gráficos que muestran la reproducibilidad de cada una de las técnicas utilizadas se encuentran en la sección de Anexos.

5.7.1 Determinación de amonio (NH₄⁺)

Para la cuantificación de amonio se utilizó un electrodo selectivo del ion amoniaco a través del potencial mV (phoenix Electrode Co.), las muestras se mantuvieron bajo agitación y a 25°C. El electrodo se coloca con una inclinación de 45° para evitar la formación de burbujas que puede inferir en la lectura. El método es sensible en una escala de 0.03 a 1400 mg de N-NH₃/L.

5.7.2 Sólidos suspendidos volátiles

Se llevó a peso constante el crisol. Se transfirió al desecador durante 30 minutos y se pesó. Posteriormente se tomaron 20 ml de muestra perfectamente homogénea y se calentó a baja temperatura hasta evaporar el líquido evitando quemar la muestra; nuevamente se metió a la estufa durante 1 hora a 100°C y se pasó al desecador durante 30 minutos. Se pesó el crisol para obtener los sólidos suspendidos totales. Finalmente se metió el crisol a la mufla a 550°C durante 1 hora, posteriormente se trasladó a la estufa a 100°C por 1 hora, luego se pasó al desecador durante 30 min y se pesó obteniendo los sólidos fijos.

Los sólidos suspendidos volátiles (SSV) se determinan con la siguiente fórmula:

$$gSSV/L = \frac{g \text{ sólidos Totales} - g \text{ Sólidos Fijos}}{\text{Volumen (L)}}$$

5.7.3 Determinación de los compuestos nitrogenados.

La determinación de NO₃⁻ y NO₂⁻ se realizó por electroforesis capilar (CIA 4000, Millipore). Se empleó una columna de sílice fundida, de 60cm de largo y 75 µm de diámetro interno, con una corriente de 18 mV y un suministro de energía con un voltaje de 20KV. El modo de la inyección fue

hidrostática a 10 cm de altura por 30 seg. La absorbancia se midió en la región UV con lámpara de mercurio para 254 nm.

5.7.4 Determinación de *p*-cresol e intermediarios

Se utilizó un cromatógrafo de líquidos de alta resolución HPLC (Perkin Elmer serie 200), utilizando una columna (C-18) (Varian Crompack) y un detector visible. La longitud de onda fue de 254nm la cual es específica para la separación de compuestos fenólicos. Se utilizó una fase móvil de acetonitrilo agua (60:40, v:v) a un flujo de 1.5ml/min. La fase móvil fue filtrada (0.45 μ m) y desgasificada. La longitud de onda fue de 254nm. Todas las diluciones se realizaron con agua desionizada y filtradas por una membrana de 0.45 μ m de tamaño de poro.

5.7.5 Determinación de proteína microbiana

Se utilizó el método Lowry (Lowry y col., 1951). Es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de la proteína. Se midió la absorbancia con un espectrofotómetro (Shimadzu TM), a una longitud de onda de 750 nm. Se realizó una curva estándar de albúmina, cada vez que se midió la proteína de las muestras.

6. Resultados

6.1 Puesta punto de las técnicas de medición

En primera instancia se pusieron a punto las técnicas analíticas para la medición de los compuestos carbonados y nitrogenados. Se realizaron repeticiones de curvas patrón de cada técnica analítica, con la finalidad de garantizar la reproducibilidad del método y la confiabilidad de los valores experimentales (ver Anexos). Se obtuvieron coeficientes de variación (CV) menores o alrededor del 10%; lo cual fue un indicativo de que las técnicas fueron reproducibles y que las cuantificaciones de los reactivos de interés fueron confiables.

6.2 Comportamiento de los compuestos carbonados y nitrogenados en el reactor de tanque agitado

El reactor continuo de tanque agitado (RCTA) se operó por un periodo mayor de 77 días, a una velocidad de carga de 200 mg N-NH₄⁺/L d (Figura 6). El régimen estacionario se alcanzó para el día 30, con una eficiencia de consumo de *p*-cresol de 99.96 ± 0.1% y una eficiencia de consumo de N-NH₄⁺ de 99.06 ± 3.32%. El rendimiento nitrificante fue de 1.3 ± 0.17, el cual nos indicó que el consorcio nitrificante fue metabólicamente estable, y que el metabolismo microbiano fue netamente catabólico.

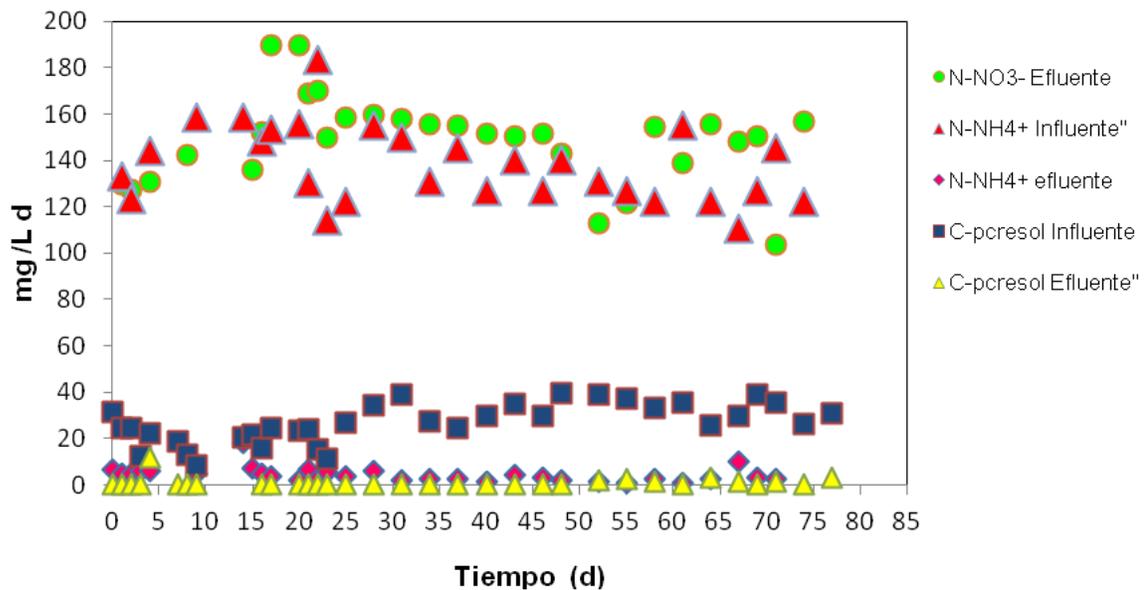


Figura 6. Perfil de los compuestos nitrogenados y carbonados en el reactor RCTA

6.3 Cultivos lote empleando lodo granular

En la Figura 7 se muestra el comportamiento de consumo de amonio, así como la producción de nitrato en un periodo de 8 horas. Finalizado el proceso, se obtuvo una eficiencia de consumo de N-NH_4^+ de $99.9 \pm 0.13\%$, con un rendimiento en la producción de nitrato de 1.05 ± 0.13 ($\text{mg N-NO}_3^- / \text{mg N-NH}_4^+$ consumido). El lodo nitrificante obtenido del reactor continuo de tanque agitado mostró la capacidad metabólica de llevar a cabo un proceso desasimilativo nitrificante en un periodo de 8 horas. De acuerdo al modelo de Gompertz, se obtuvo una velocidad específica de consumo de amonio de $5.42 \text{ mg N/g SSV h}$. Respecto al perfil de los compuestos carbonados, el *p*-cresol se consumió totalmente en un periodo de 5 horas, observándose intermediarios como el *p*-hidroxibenzilalcohol y el *p*-hidroxibenzaldehído, pero en concentraciones muy bajas. La eficiencia de consumo del *p*-cresol fue de $92.49 \pm 10.6\%$, y fue consumido a una velocidad específica de $20.85 \text{ mg C/g SSV h}$. Comparando las velocidades específicas de consumo del amonio y *p*-cresol, el lodo nitrificante tiene la capacidad metabólica de oxidar el *p*-cresol 4 veces más rápido con respecto al amonio.

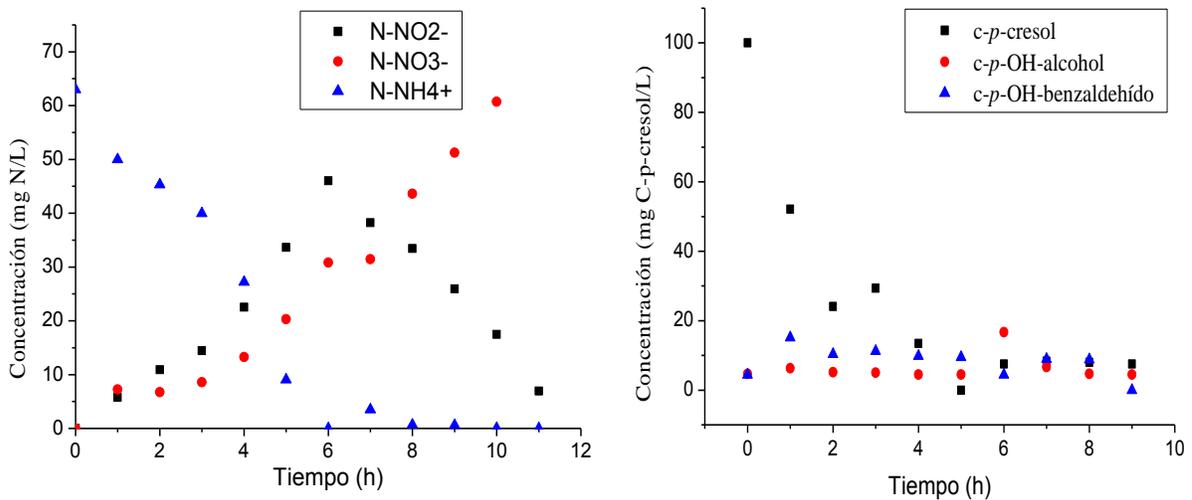


Figura 7. Perfil de los compuestos nitrogenados y carbonados en cultivos lote

6.4 Efecto del volumen y tiempo de sonicación en la extracción de la proteína microbiana intracelular

En la Tabla 5 se muestra la liberación de proteína en función del volumen de muestra (20 y 50 ml) y del tiempo de sonicación (13 seg, 30 seg, y 1 min). Se utilizó la prueba estadística de Turkey ($\alpha = 0.05$) para analizar los diferentes tratamientos. El estudio estadístico indicó una diferencia significativa entre los dos volúmenes de muestra sonicados, mostrando que hubo una mayor liberación de proteína microbiana a un volumen de 50 ml. Por lo tanto para evaluar la capacidad enzimática de los extractos enzimáticos libres y encapsulados se utilizó el tratamiento con un volumen de 50 ml, a los tres tiempos de sonicación.

Tabla 5. Efecto del volumen y tiempo de sonicación en la extracción de la proteína microbiana intracelular

| Volumen de muestra (ml) | Tiempo de sonicación (segundos) | Proteína (mg/L) |
|-------------------------|---------------------------------|-----------------|
| 50 | 60 | 177.5 ± 12.62 |
| | 30 | 284 ± 33.43 |
| | 13 | 100 ± 50.14 |
| 20 | 60 | 137.8 ± 38.26 |
| | 30 | 179 ± 54.61 |
| | 13 | 105 ± 14.85 |

6.5 Cultivos lote empleando los extractos enzimáticos libres

En la Tabla 5 se muestra el *p*-cresol y los intermediarios carbonados identificados por HPLC durante un tiempo de reacción de 8 horas. En los tratamientos con tiempos de sonicación de 13 y 30 segundos, sólo se detectó *p*-cresol. En el tratamiento con un tiempo de sonicación de 60 segundos (1 min), se observaron dos intermediarios: *p*-OH-benzilalcohol y un carbono orgánico desconocido (Figura 9-C). Por otro lado, el extracto enzimático libre no presentó actividad nitrificante, ya que no se detectaron intermediarios como el NO_2^- o NO_3^- . Posiblemente, a estos tiempos de sonicación se presentó una posible desnaturalización de las enzimas nitrificantes.

Tabla 6. Actividad enzimática del extracto libre durante un tiempo de reacción de 8 horas

| Tiempo de sonicación (segundos) | <i>p</i> -OH-benzoato (tr 1.3 min) | <i>p</i> -OH-benzilalcohol (tr 1.97 min) | <i>p</i> -OH-benzaldehído (tr 2.24 min) | <i>p</i> -cresol (tr 2.8 min) | Benzaldehído (tr 1.97min) |
|---------------------------------|------------------------------------|--|---|-------------------------------|---------------------------|
| 13 | ----- | ----- | ----- | Detectado | ----- |
| 30 | ----- | ----- | ----- | Detectado | ----- |
| 60 | ----- | Detectado | ----- | Detectado | ----- |

El *p*-cresol se oxidó totalmente en un periodo de 9 horas (Figura 8). El extracto enzimático oxidó el compuesto fenólico a una velocidad específica de 722 mg C/ g proteína h. Respecto al lodo granular (células completas), este lo oxidó a una velocidad de consumo específica de 23.9 mg C/ g proteína h. El extracto enzimático oxidó 30 veces más rápido el compuesto fenólico. Esto podría explicarse a que en el extracto enzimático ya no hay una barrera celular, y el contacto enzima-sustrato fue más rápido.

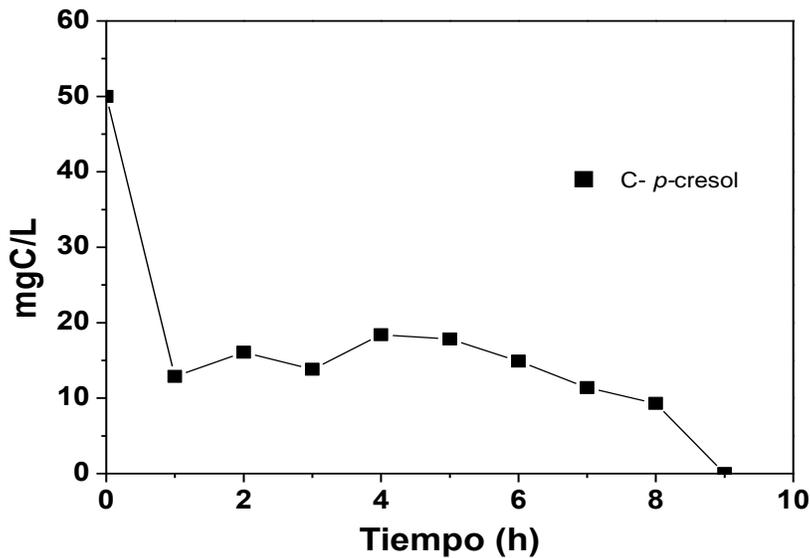


Figura 8. Perfil de la oxidación del *p*-cresol empleando los extractos enzimáticos libres

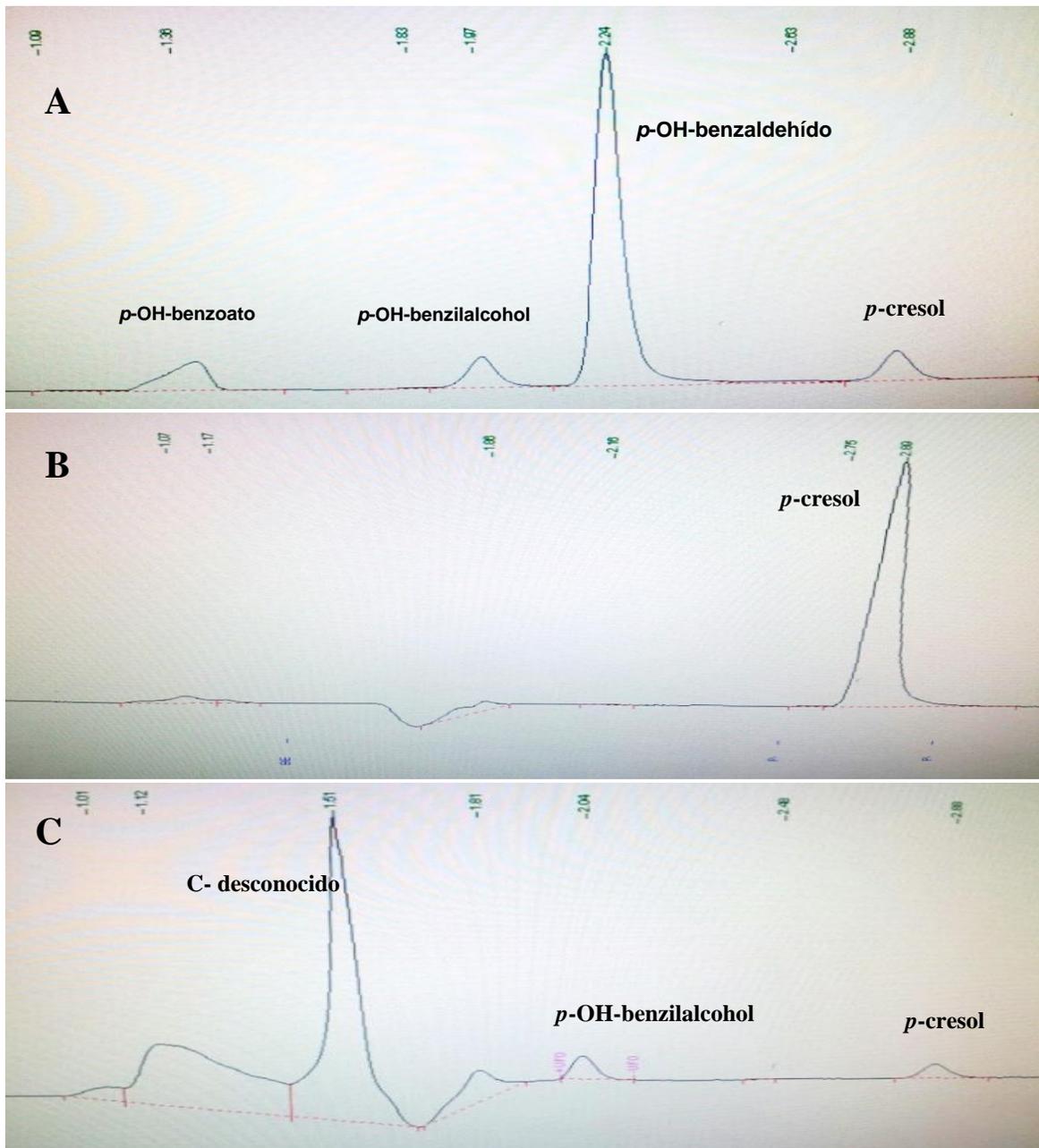


Figura 9. Cromatograma del *p*-cresol y sus intermediarios al tiempo de sonicación de 60 segundos. **A:** Curva estándar, **B:** 2 horas de reacción, **C:** 4 horas de reacción.

6.6 Cultivos en lote empleando los extractos enzimáticos encapsulados en alginato de calcio

En el estudio control con *p*-cresol y alginato de calcio (sin oxígeno) se observó que el compuesto se adsorbía y desorbía del soporte, por lo que no se logró obtener un perfil cinético. Bajo este contexto, el estudio fue solamente “cualitativo” y no cuantitativo.

Por ejemplo, en el estudio con los extractos enzimáticos libres sólo se detectaron intermediarios en el tratamiento a un tiempo de sonicación de 60 segundos. A partir de este resultado, sólo se evaluó la actividad enzimática de los extractos encapsulados a dicho tiempo de sonicación. En la Tabla 7 y Figura 10 se muestran el sustrato fenólico y los intermediarios carbonados identificados por HPLC durante un tiempo de reacción de 8 hrs. En este estudio se identificaron tres intermediarios más; *p*-OH-benzoato, *p*-OH-benzaldehído y benzaldehído. Estos intermediarios no se identificaron en el estudio con los extractos enzimáticos libres. Los intermediarios identificados sugirieron la presencia de enzimas hidrolasas y monooxigenasas.

Tabla 7. Actividad enzimática del extracto enzimático encapsulado en alginato de calcio

| Tiempo de sonicación (segundos) | <i>p</i> -OH-benzoato (tr 1.3 min) | <i>p</i> -OH-benzilalcohol (tr 1.97min) | <i>p</i> -OH-benzaldehído (tr 2.24min) | <i>p</i> -cresol (tr 2.8min) | Benzaldehído (tr 1.97min) |
|---------------------------------|------------------------------------|---|--|------------------------------|---------------------------|
| 60 | Detectado | Detectado | Detectado | Detectado | Detectado |

Respecto a la actividad nitrificante, sólo se detectó nitrito por electroforesis capilar (Figura 11). Este intermediario nitrogenado indicó que hubo dos enzimas activas de la nitrificación; la AMO y la hidroxilamina oxido-reductasa. Los resultados experimentales mostraron que la encapsulación de los extractos enzimáticos en alginato de calcio proporcionó una mayor estabilidad a las enzimas. Esta estabilidad de las enzimas se debe a que al estar encapsuladas las enzimas no sufren ninguna alteración en su estructura química, manteniendo así su capacidad enzimática, tal como lo mencionó Arroyo (1998). Cabe mencionar que este es el primer trabajo que muestra la biotransformación de un compuesto fenólico y el amonio utilizando el extracto enzimático de un lodo nitrificante encapsulado en una matriz de alginato de calcio.

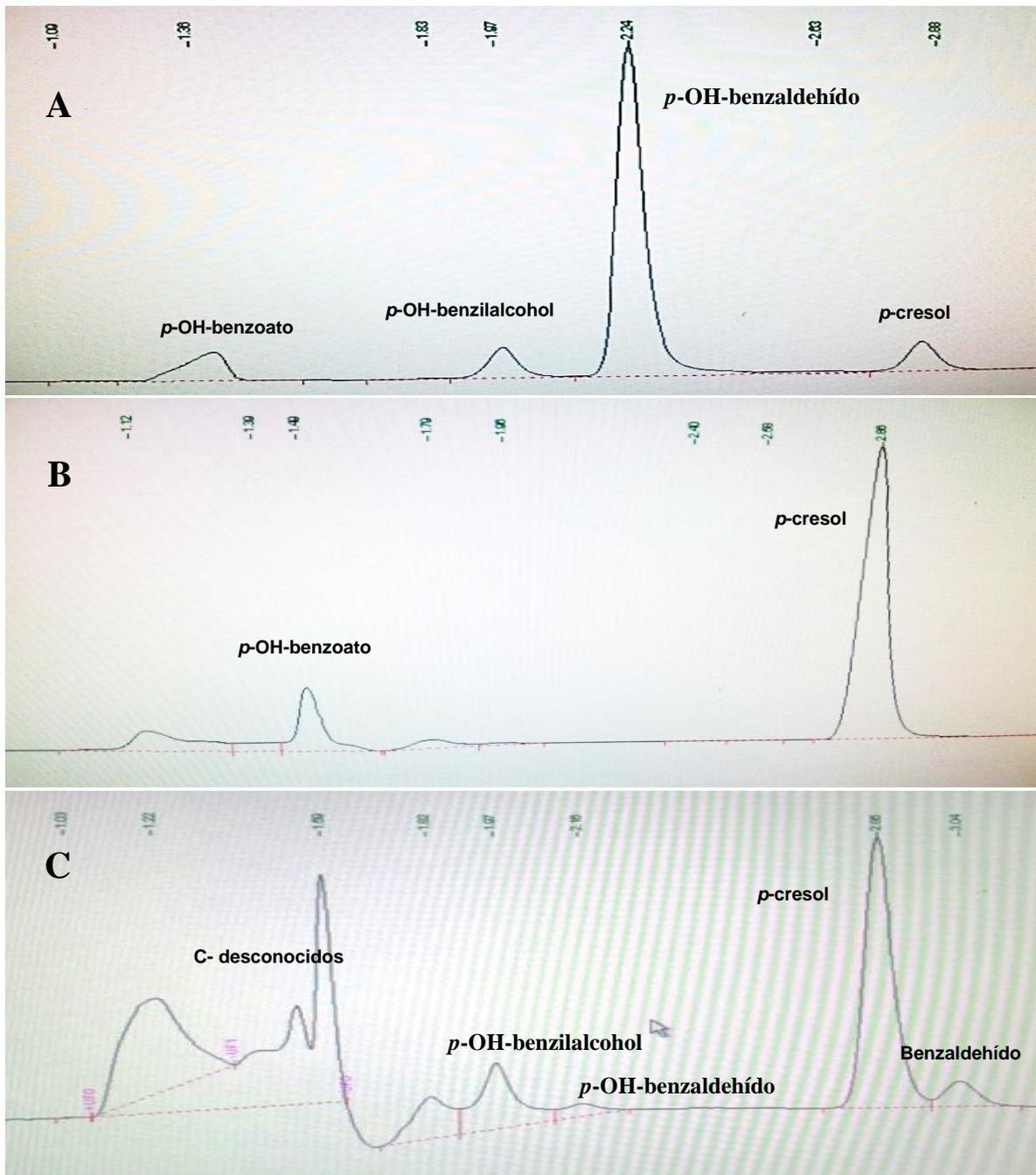


Figura 10. Cromatograma de los extractos enzimáticos encapsulados en alginato de calcio, donde se identificó el *p*-cresol y algunos de sus intermediarios A: Curva estándar, B: 2 horas de reacción, C: 4 horas de reacción.

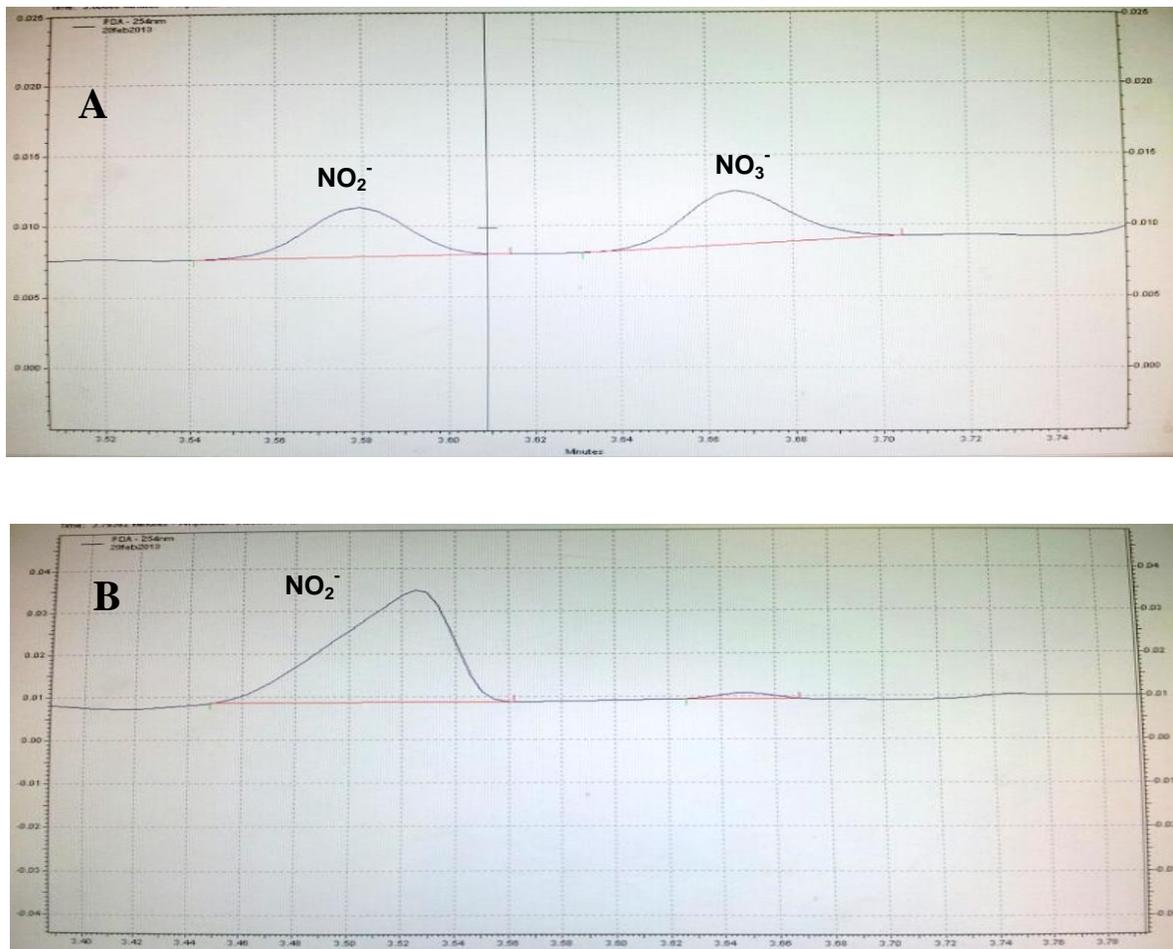


Figura 11. Cromatograma de los extractos enzimáticos encapsulados en alginato de calcio, donde se identificó el nitrito y el nitrato producto de la nitrificación. **A:** Curva estándar, **B:** 4 horas de reacción

El catabolismo del *p*-cresol se lleva a cabo por tres rutas bioquímicas: vía protocatecuato, catecol o ácido gentísico, los cuales pueden ser oxidados después a compuestos que entran en el ciclo del ácido cítrico: succinato, acetil- COA y piruvato, siendo el producto final CO₂ (Harwood y parales, 1996). Estas rutas bioquímicas dependen de la capacidad metabólica de cada microorganismo involucrado en el proceso biológico. Por ejemplo, en el presente trabajo, y con los intermediarios carbonados identificados tanto en los extractos libres como en los extractos encapsulados; la posible ruta inicial de la oxidación del *p*-cresol por el lodo nitrificante podría ser la siguiente; la vía ácido protocatecuico. Cabe mencionar que este es el primer trabajo donde se identifica al benzaldehído como intermediario carbonado durante la oxidación de un compuesto fenólico bajo condiciones nitrificantes.

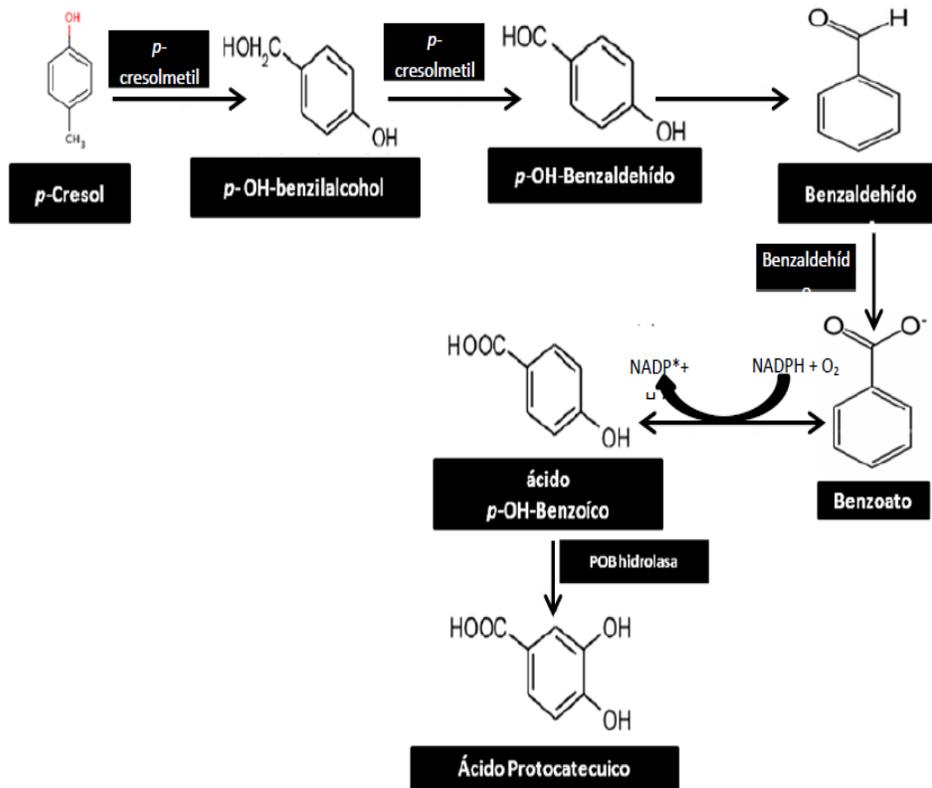


Figura 12. Ruta inicial propuesta en el presente trabajo.

7. Conclusiones

Se operó y se estabilizó un lodo nitrificante en un reactor continuo de tanque agitado, alcanzando eficiencias de consumo para el amonio y *p*-cresol cercanas al 100% en el régimen estacionario. En cultivos en lote, el lodo nitrificante mostró la capacidad de oxidar 4 veces más rápido el *p*-cresol con respecto a amonio. Por otro lado, el extracto enzimático libre oxidó 30 veces más rápido el *p*-cresol con respecto a las células intactas. Los extractos enzimáticos encapsulados mostraron mayor capacidad enzimática para la eliminación de *p*-cresol y amonio, con respecto a los extractos libres. Los intermediarios identificados fueron: *p*-OH-benzoato, *p*-OH-benzaldehído, Benzaldehído, *p*-OH-benzilalcohol y nitrito. Este es el primer estudio en el que se encapsula en alginato de calcio un extracto enzimático proveniente de un lodo nitrificante, y sobre todo con la capacidad de biotransformar el *p*-cresol y amonio. Esta información podría ser útil en el tratamiento de aguas residuales contaminadas con compuestos fenólicos y amonio.

8. ANEXOS

8.1 Métodos de Análisis

A continuación se muestran los métodos analíticos utilizados en el trabajo de especialidad, donde se realizaron al menos tres curvas de calibración para cada técnica analítica, obteniendo coeficientes de variación menores al 10%, lo que indicó reproducibilidad; mientras que los R^2 con valores alrededor del 0.99 indicaron una respuesta lineal de todos los métodos.

8.1.1 Cuantificación de amonio

Este método consiste en la medición del gas amoniaco que pasa a través de una membrana selectiva, cuya lectura es dada en milivolts. Se tomó una muestra de 50 ml a la cual se le adicionó 0.5 ml de NaOH 10N para alcalinizar y desprotonar el ion amonio formando amoniaco, se mantuvo bajo agitación a temperatura ambiente durante 3min; posteriormente se tomó la lectura del potencial (mV), y finalmente se elaboró la curva estándar para la determinación de amonio con cuatro concentraciones conocidas: 100, 200, 300 y 400 ppm, a partir de la cual se determinó la concentración de amonio en las muestras. Este método se realizó por duplicado, para comprobar la linealidad del método, se construyeron las siguientes curvas de calibración.

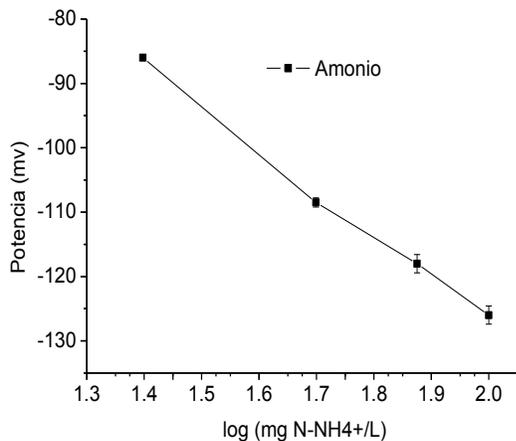


Figura 12. Curva de calibración para la cuantificación de amonio

Tabla 8. Coeficiente de variación y correlación (R^2) de las curvas de calibración de amonio.

| Parámetro | N-NH ₄ ⁺ |
|----------------------|--------------------------------|
| Promedio | 66.09 ± 1.53 |
| c.v (%) | 2.10 |
| R² | 0.9955 |

8.1.2 Cuantificación de los sólidos suspendidos volátiles

Los sólidos suspendidos volátiles (SSV) se determinaron por gravimetría, de acuerdo al método recomendado por Standard Methods (APHA, 1985).

Sólidos totales. Corresponden a la cantidad de materia que permanece como residuo después de una evaporación, entre 103-105°C. Los sólidos totales pueden calcularse de la siguiente manera:

$$\text{Sólidos totales} = \text{sólidos fijos} + \text{sólidos volátiles}$$

Sólidos volátiles y fijos. Los sólidos volátiles son aquellos que se pierden por calcinación a 550°C, mientras que el residuo que después de la calcinación se define como sólidos fijos. Donde la mayor parte de los sólidos volátiles corresponden al material orgánico y los sólidos fijos corresponde al material inorgánico.

8.1.3 Cuantificación de los compuestos nitrogenados

La determinación de NO_3^- y NO_2^- se realizó por electroforesis capilar (CIA 4000, Millipore). Se empleó una columna de sílice fundida, de 60cm de largo y 75 μm de diámetro interno, con una corriente de 18 mV y un suministro de energía con un voltaje de 20KV. El modo de la inyección fue hidrostática a 10 cm de altura por 30 seg. La absorbancia se midió en la región UV con lámpara de mercurio para 254 nm. Este método se basa en la migración electroforética e iones al aplicar un voltaje a través de una columna capilar, causando una migración diferencial de los componentes de la muestra hacia el electrodo respectivo. Finalmente se elaboró la curva estándar para la determinación de NO_3^- y NO_2^- con cuatro concentraciones conocidas: 25, 50, 75 y 100 ppm, a partir de la cual se determinó la concentración de ambos compuestos en las muestras. Este método se realizó por duplicado, para comprobar la linealidad del método, se construyeron las siguientes curvas de calibración.

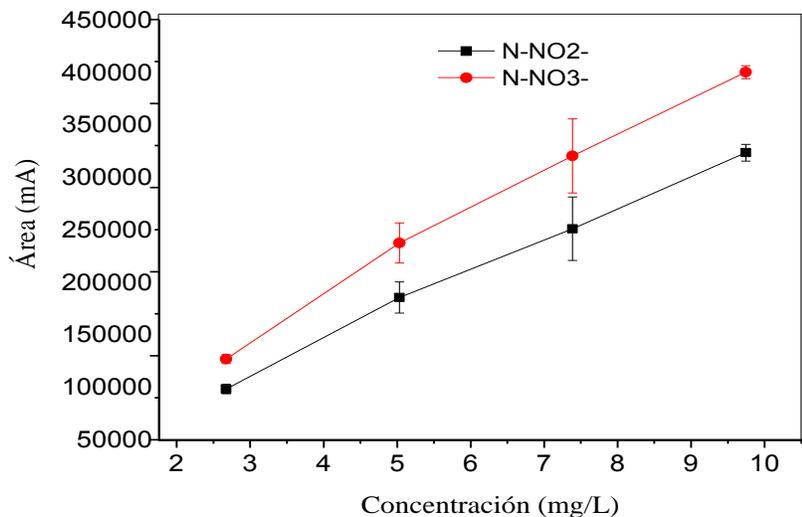


Figura 13. Curva de calibración compuestos nitrogenados.

8.1.4 Determinación de p-cresol e intermediarios

Se utilizó un cromatógrafo de líquidos de alta resolución HPLC (Perkin Elmer serie 200), utilizando una columna (C-18) específica para la separación de compuestos fenólicos. Se utilizó una fase móvil de acetonitrilo agua (60:40, v:v) a un flujo de 1.5ml/min. La fase móvil fue filtrada (0.45 μ m) y desgasificada. La longitud de onda fue de 254nm. Todas las diluciones se realizaron con agua desionizada y filtradas por una membrana de 0.45 μ m de tamaño de poro. Se construyó una curva estándar para la determinación de *p*-cresol, *p*-hidroxibenzaldehído, *p*-hidroxibenzilalcohol y *p*-hidroxibenzoato con cuatro concentraciones conocidas: 25, 50, 75 y 100 ppm, a partir de la cual se determinó la concentración de los compuestos carbonados en las muestras.

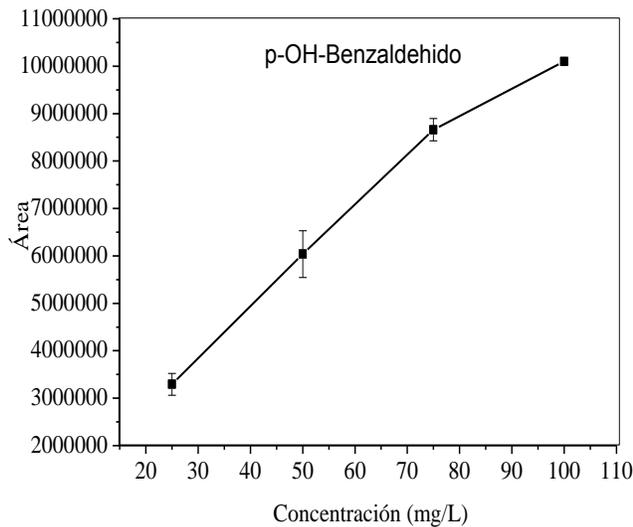


Figura 14. Curva de calibración para la cuantificación de *p*-OH-benzaldehído.

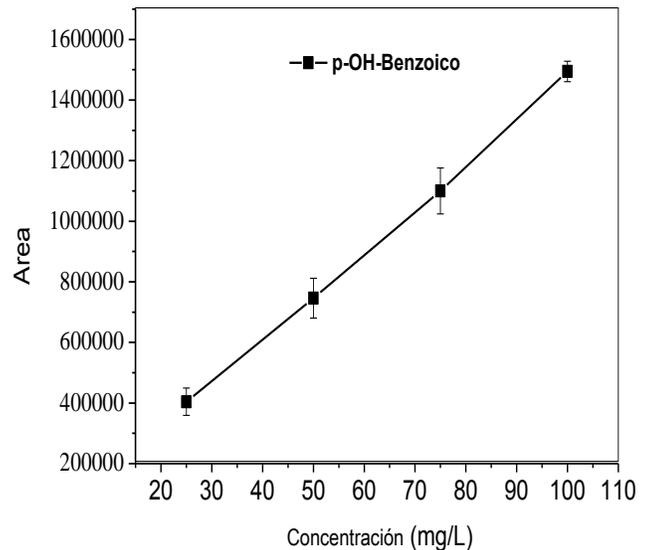


Figura 15. Curva de calibración para la cuantificación de *p*-OH-benzoico.

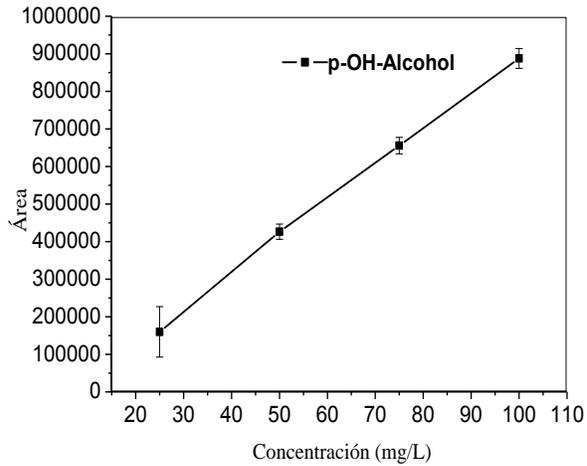


Figura 16. Curva de calibración para la cuantificación de *p*-OH-Alcohol.

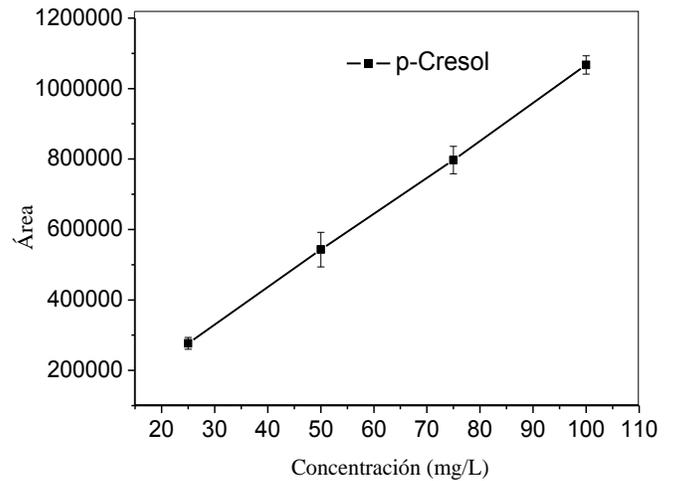


Figura 17. Curva de calibración para la cuantificación de *p*-Cresol.

Tabla 10. Coeficiente de variación y correlación (R^2) de las curvas de calibración de los compuestos fenólicos.

| Parámetro | <i>p</i> -OH-benzoico | <i>p</i> -OH-Benzilalcohol | <i>p</i> -OH-Benzaldehído | <i>p</i> -Cresol |
|-----------|-----------------------|----------------------------|---------------------------|------------------|
| Promedio | 14500.33 | 9650.366 | 92175 | 10506.333 |
| d.s. | ±197.43 | ±796.91 | ±4441.83 | ±201.85 |
| c.v (%) | 1.36 | 8.25 | 4.81 | 1.921 |
| R^2 | 0.9974 | 0.9939 | 0.9788 | 0.9962 |

8.1.5 Determinación de proteína microbiana

Se utilizó el método colorimétrico de Lowry (Lowry y col., 1951). Se midió la absorbancia con un espectrofotómetro (Shimadzu TM), a una longitud de onda de 750 nm. Se realizó una curva estándar de albúmina, cada vez que se midió la proteína de las muestras.

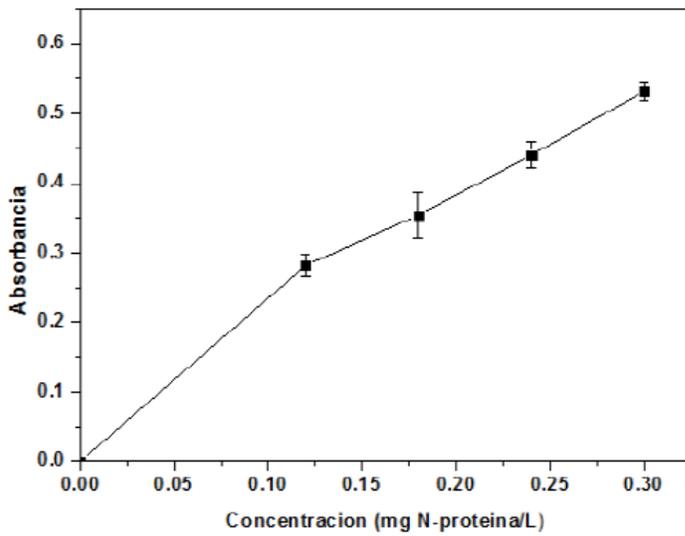


Figura 18. Curva de calibración para la cuantificación de nitrógeno.

Tabla 11. Coeficiente de variación y correlación (R^2) de las curvas de calibración de nitrógeno.

| Parámetro | Proteína microbiana |
|-------------------------|---------------------|
| promedio | 2.28±0.7672 |
| C.V (%) | 12.62 |
| R^2 | 0.9758 |

9. Referencias

1. Alemzadeh, I., Nejati, s. (2009). Removal of phenols witc Encapsulated Horseradish Peroxidase in calcium Alginate. *Iran. J. Chem. Chem. Eng.* 28, 43-49.
2. Anh Y.-H. (2006). Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: A review. *Process Biochemistry.* 41, 1709-1721.
3. Anthonisen, A.C., Loehr, R.C., Prakasom, T.B.S., Srinath E.G. (1976). Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *Journal of Water Pollution Control Federation.* 48, 835-851.
4. Arroyo, M (1998). Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars. Pharmaceutica*, 39: 23-39.
5. Bock, E., Koops, H.P., Harms, H., Anhlers, B. (1991). The biochemistry of nitrifying microorganism. Variations in Autotrophic Life. Editorial Academic press. Londres. 171-200.
6. Castillo, R., Roldán, R., Blasco, P., Huertas, R., Caballero, D., Moreno, V., Martínez, L. (2005). *Biotecnología Ambiental*, Editorial Tébar, S.L., Madrid. pp 155-162.
7. Cuervo- López, F.M., Martinez, F., Gutierrez-Rojas, M. Noyola R.A., Gómez, J. (1999). Effect of nitrogen loading rate and carbón source on denitrification anda sludge settelability in UASB reactors. *Water Science and Tecnology.* 40, 123-130.
8. Delwiche, C.C., Brayn, B.A. (1976). Denitrification. *Annual Review or Microbiology.* 30, 241-262.
9. Estadísticas del agua en México. (2007). Comisión Nacional del Agua. <http://www.oem.com.mx/esto/notas/n636960.htm>
10. Estadísticas del agua en México. (2005). Comisión Nacional del Agua. pp 20-21
11. Estadísticas del agua en México. (2010). Comisión Nacional del Agua. pp 21-22
12. Grianfreda, L., Rao, M.A., 2004. Potential of extracelular enzymes in remediation: a review. *Enzyme. Microb. Technol.* 35, 339-354.
13. Harwood CS, Parales RE (1996) The β -keto adipate pathway and the biology of selfidentity. *Annu Rev Microbiol* 50: 553 590.

14. Henze, M., Gujer, W. (1991). Activated sludge modeling and simulation. *Water Science and Technology*. 23, 1011-1023.
15. INEGI. Estadística básica sobre medio ambiente. Boletín de prensa núm. 121/13, 9 de abril de 2013 aguascalientes, AGS. Página 1/3
<http://blogdelagua.com/blog/inicio/en-mexico-mas-de-la-mitad-de-las-aguas-residuales-son-vertidas-a-cauces-sin-tratamiento/>
16. INEGI 2009 “Estadística a propósito del día mundial del agua”. México D.F., 22 DE MARZO 2009.pp 2-4
17. Lowry O.H., Rosen Brough N.J., Farr A.L. y Randall R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
18. Lloret L, Eibes G, Feijoo G, Moreira MT, Iema JM, Hollmann F. (2011). Immobilization of laccase by encapsulation in a sol-gel matrix and its characterization and use for the removal of estrogens. *Biotechnology Progress*. 27, 1570-15.
19. Madigan. M., Martinko, J., Parker, J. (2003) *Biología de los microorganismos*. 10a edición. Editorial. Peason Prentice Hall. Madrid. 589-591.
20. Madigan. M., Martinko, J., Parker, J. (2009) *Biología de los microorganismos*. 12^a Edición . Editorial. Peason Prentice Hall. Madrid. 666-667.
21. Nam Sun Wang (2010). Experiment No. 7B, Enzyme immobilization protocol entrapment alginate gel Department of chemical & Biomolecular Engineering, University of Maryland College Park, MD 20742-2111 ENCH485.
<http://www.eng.umd.edu/~nsw/ench485/lab7b.htm>[13/01/2010]
22. NORMA Oficial Mexicana NOM-002-ECOL-1996, Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a los sistemas de alcantarillado urbano o municipal.
23. NOM-CCA-031-ECOL/1993 establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales provenientes de la industria, actividades agroindustriales, y el tratamiento de aguas residuales a los sistemas de drenaje y alcantarillado urbano y municipal.
24. Prosser, J.I. (1989). Autotrophic nitrification in bacteria. *Advance in Microbiology Physiology*. 30, 125-181.

25. Razo-Flores, E., M. Iniestra- González, J. A. field, P. Olgúin-Lora y L. Puig-Grajales (2003), “Biodegradation of mixtures of phenolic compounds in an upward-flow anaerobic sludge blanket reactor”. *Journal of Environmental Engineering*, November, pp. 999-1006.
26. Ross, A.V., Delwiche, C. (1982). Natural ¹⁵N Abundance of resumed N₂-fixing and Non-N₂-fixing plants from selected ecosystems. *Oecologia*. 54, 317-325
27. Sawyer C.N., McCarty, P.L. (1978). Chemistry For Environmental Engineering. 3tn. Edition. Mc Graw – Hill Book Company.534p.
28. Ju Yeong Song and Soo Bae Chung. (1997). Enzyme Immobilized Reactor Design for Ammonia Removal from Waste Water. *Biotechnol. Bioprocess Eng*, Vol 2, No.2.
29. Zepeda, A., Texier A-C., Gómez, J. (2006). Kinetic and metabolic study or benzene, toluene and m-xylene in nitrifying batch cultures. *Water research*. 40, 1643-1649.