

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

ELIMINACIÓN SIMULTÁNEA DE 2- CLOROFENOL (2-CF) Y
ALTAS CONCENTRACIONES DE AMONIO EN UN REACTOR DE
LOTE SECUENCIADO (SBR).

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
ESPECIALISTA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:
I.B.I. AARÓN VILLASECA HERNÁNDEZ

DIRECTORA DEL TRABAJO:
Dra. FLOR DE MARÍA CUERVO LÓPEZ

MÉXICO, CDMX.

JULIO 2017

Esta tesis se llevó a cabo en el Laboratorio de Fisiología Microbiana W-004 del Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa y fue financiada con el apoyo otorgado por la DCBS de la UAM-I.

MIEMBROS DEL JURADO

DIRECTORA DE TESIS

Dra. FLOR DE MARÍA CUERVO LÓPEZ



REVISOR EXTERNO

Dr. JESÚS EMMANUEL PÉREZ ALFARO



AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento especial a mis padres que cada día que llegaba a casa, me preguntaban cómo me había ido, preocupándose de las cosas más mínimas por mi carrera para poder culminar con éxito.

A mis hermanos, que de una u otra manera siempre han estado en cada punto de vida apoyándome.

Finalmente a la Dra. Flor de María Cuervo López que ha creído en mí como un profesional, otorgándome siempre su entera confianza para la realización de esta tesis, por la dedicación, consejos y el tiempo invertido en mi formación. Gracias.

Dedicatorias

A mi Alma mater:

Universidad Autónoma Metropolitana (UAM)

INDICE	Pág.
Resumen	1
1. Introducción.....	2
1.1 Métodos de eliminación de clorofenoles	3
1.2 Procesos biológicos	4
1.3 Nitrificación	5
1.4 Factores que afectan a la nitrificación	6
1.4.1. Efecto de la temperatura	6
1.4.2. Efecto del pH	6
1.4.3. Efecto de la concentración del Oxígeno disuelto.....	6
1.4.4. Efecto de la materia orgánica.....	7
1.4.5 Relación carbono/ nitrógeno (C/N)	7
1.4.6 Reactor de lote secuenciado (SBR).....	8
2. Antecedentes.....	9
2.1 Degradación de 2-clorofenol bajo condiciones nitrificantes	9
2.2 Eliminación de compuestos carbonados y nitrogenados en reactores SBR.....	10
3. Justificación	10
4. Hipótesis	11
5. Objetivo	11
5.1. Objetivo general	11
5.2. Objetivo particular.....	11
6. Metodología	12
6.1. Consorcio nitrificante en cultivo continuo en el reactor de tanque agitado: fuente de inóculo.....	12

6.2. Medio de cultivo	13
6.3. Ensayos nitrificantes control o de referencia en lote	13
6.4. Ensayos nitrificantes en presencia de 2-CF en lote	14
6.5. Reactor de lote secuenciado (SBR)	14
6.5.1. Ensayos abióticos	14
6.5.2. Estabilización de la nitrificación en un reactor SBR	15
6.5.3 Cultivo nitrificante en un reactor SBR en presencia de 2-CF	16
7. Técnicas analíticas	16
7.1. Cuantificación de amonio	16
7.2. Cuantificación de nitrito/ nitrato	17
7.3. Cuantificación de proteína	18
7.4 Cuantificación de 2-CF	19
7.5 Cuantificación de pH	19
8. Variables de respuesta	20
9. Resultados y discusión	22
9.1. Lodo nitrificante en estado estacionario	22
9.2. Ensayos nitrificantes en lote a diferentes concentraciones de amonio y diferentes C/N	23
9.3. Ensayos en lote con diferentes concentraciones de amonio en presencia de 5 mg C-2-CF/L.	26
9.4. Ensayos en el reactor SBR	28
9.5. Ensayos abióticos en el reactor SBR	28
9.6 Estabilización control en un SBR	34
9.7 Nitrificación en un reactor SBR en presencia de 2-CF	32
10. Conclusiones	38

11. Recomendaciones.....	39
12. Bibliografía.....	40

Resumen

En el presente trabajo se evaluó la respuesta metabólica y cinética de un lodo nitrificante alimentado con altas concentraciones de amonio 100, 200 y 300 mg N-NH₄⁺/L y 2-clorofenol (5 mg C-2-CF/L), tanto en cultivos en lote como en un reactor de lotes secuenciados (SBR). Como inóculo se utilizó un lodo nitrificante en estado estacionario. Los ensayos en lote se realizaron en botellas serológicas de 500 ml de capacidad con un volumen de trabajo de 100 ml. En primer lugar, se evaluó la capacidad de los lodos para llevar a cabo la nitrificación a altas concentraciones: 100, 200 300, 400 y 500 mg N-NH₄⁺/L utilizando dos relaciones C/N: 1.75 y 2.5. Posteriormente, con la mejor C/N y concentraciones de hasta 300 mg N-NH₄⁺/L, se evaluó la nitrificación en presencia de 2-CF. En una tercera fase, en un reactor SBR alimentados con 100 y 200 mg N-NH₄⁺/L, se evaluó el comportamiento fisiológico y cinético del lodo nitrificante a lo largo de los ciclos de operación (ciclos 1-11). Estos ensayos se usaron como control. Posteriormente, con las concentraciones de 200 y 300 mg N-NH₄⁺/L se evaluó el efecto de adicionar 5 mg C-2-CF/L (ciclos 12-22). En todos los casos, el comportamiento fisiológico del lodo nitrificante se evaluó mediante la eficiencia de consumo de amonio (ENH₄⁺) y 2-CF (E2CF) y el rendimiento nitrificante (YNO₃⁻), mientras que el comportamiento cinético se evaluó mediante las velocidades específicas de consumo de amonio (qNH₄⁺), producción nitrato (qNO₃⁻) y consumo de 2-CF (q2CF).

En los ensayos control realizados en botellas serológicas en lote se observó que las mayores ENH₄⁺ y YNO₃⁻ se obtienen cuando se utilizó una relación C/N de 2.5. Se encontró que independientemente de la relación C/N ensayada, la qNH₄⁺ se incrementa al aumentar la concentración de amonio, indicando que se presenta una reacción de primer orden. Asimismo, se observó que los valores de qNH₄⁺ obtenidos en ambas relaciones C/N difirieron entre el 3 y 26%. Los ensayos nitrificantes de referencia realizados en el reactor SBR en ausencia de 2-CF (ciclos 1-11), indicaron que fue posible consumir completamente 100 y 200 mg N-NH₄⁺/L y oxidarlos totalmente a nitrato con rendimientos nitrificantes (YNO₃⁻) cercanos a 1. La adición de 5 mg C-2-CF/L en el ciclo 12 no afectó la ENH₄⁺ ya que el amonio fue totalmente consumido. Sin embargo, causó una inhibición al proceso, dado que la qNH₄⁺ disminuyó significativamente y dado que no se observó, ni la acumulación de nitrito, ni la producción de nitrato, la qNO₃⁻ fue igual a 0. Al incrementar a 300 mg N-NH₄⁺/L y después de 10 ciclos de operación (ciclo 22), se obtuvieron qNH₄⁺ mayores a las velocidades calculadas en ausencia de 2-CF, es decir, el efecto inhibitorio causado por el compuesto halogenado desapareció bajo estas condiciones.

1. Introducción

La eliminación de residuos líquidos procedentes del uso doméstico, agrícola e industrial ha provocado una problemática en la contaminación de los cuerpos acuáticos. Se puede decir que día con día, los problemas de contaminación principalmente por desechos industriales se agravan por la falta de tratamiento de los efluentes finales, por el gran desarrollo industrial, que genera efluentes más complejos y contaminantes y por la falta de planes reguladores para el establecimiento de industrias (Monroy y col., 2000, 2006). Dentro de estos desechos podemos encontrar elementos orgánicos que pueden ser biodegradables o no, y/o elementos inorgánicos nitrogenados como el amonio, nitrito o nitrato (Camargo y Alonso, 2006).

El amonio es considerado un contaminante de las aguas, que genera eutrofización, que es tóxico y que hay que eliminarlo, por este motivo surge la necesidad de implementar sistemas de tratamiento que nos permitan eliminarlo de los efluentes industriales (Camargo y Alonso, 2007). Para eliminar nitrógeno amoniacal del agua se puede hacer uso de tratamientos fisicoquímicos y/o biológicos. Uno de los principales procedimientos biológicos para eliminar nitrógeno amoniacal del agua es la nitrificación que es un proceso respiratorio aerobio que oxida al amonio a nitrito y posteriormente a nitrato (Prosser, 1989; Bernet y Spérandio, 2009).

Otros compuestos contaminantes que se encuentran en el agua son los clorofenoles, que son compuestos orgánicos muy tóxicos y ampliamente distribuidos en el medio ambiente, ya que se utilizan frecuentemente como disolventes fitosanitarios, preservadores de madera, pinturas, fibras vegetales, cuero, limpiadores y como desinfectantes esto debido a sus propiedades antimicrobianas (Wgbis.ces.iisc.ernet.in, 2017). En otras ocasiones los compuestos organoclorados aparecen en forma de subproductos en procesos químicos en los que intervienen el cloro o sus derivados, como es el caso del blanqueo de pasta de papel o la cloración del agua (Wgbis.ces.iisc.ernet.in, 2017).

Los clorofenoles son compuestos químicos orgánicos en los cuales uno o más átomos de hidrógeno del fenol son remplazados por uno o más átomos de cloro. Hay 5 tipos básicos de clorofenoles (mono, di, tri, tetra y penta sustituidos) y 19 clorofenoles diferentes. La mayoría de los clorofenoles son sólidos a temperatura ambiente excepto el 2-clorofenol (2-CF) (ATSDR 2003). El 2-clorofenol es un líquido incoloro o de color ámbar, con un olor desagradable, soluble en alcohol, éter y soluciones alcalinas. El 2-CF es un compuesto con una solubilidad en agua (28.5g/L), por lo que puede emigrar fácilmente a medios acuosos y contaminarlos (Smith y col., 1987). Según la constante de Henry (1.31×10^{-2} atm.L/ mol) y la presión de vapor (2.9×10^{-3} atm), el compuesto tiene baja volatilidad (Tabla 1). De acuerdo con el coeficiente de partición octanol/agua, que es una medida de cómo una sustancia química puede distribuirse fácilmente en dos disolventes inmiscibles, como agua

(solvente polar) y octanol (solvente relativamente no polar, que representa a las grasas), puede fijarse con firmeza a la materia orgánica, sedimentos y microorganismos (partes lipofílicas como membranas celulares) (EPA, 1987).

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas del 2 - CF

Propiedad	Valor
Punto de fusión	175°C
Punto de ebullición	9.3°C
Densidad relativa a 25 °C	1.26
Coefficiente de partición (k _{ow})	2.16
Constante de Henry a 20°C	1.31x10 ⁻² atm L / mol
pKa a 25°C	8.48
Solubilidad del agua	28.5 g/L
Peso molecular	128.56
Presión de vapor a 20°C	2.9X10 ⁻³ atm

Atmosferas (atm), grados centígrados (°C), gramos (g), litro (L). Fuente. Handbook of Environmental Data on Organic Chemicals Index Merk

En comparación con otras clases de compuestos orgánicos (dioxinas e hidrocarburos aromáticos policíclicos), los clorofenoles muestran grados de toxicidad variable, dependiendo de la cantidad de cloros presentes en el anillo aromático. El 2-clorofenol y 3-clorofenol son considerablemente menos tóxicos que los fenoles diclorados, pero el más tóxico de los clorofenoles es el pentaclorofenol (Borzelleca y col., 1985). El 2-CF es muy tóxico para la vida acuática a concentraciones de 2-7 mg/L (Annachatre y col., 1996) y ha sido designado como uno de los contaminantes de alta prioridad por la EPA, ya que es muy tóxico, persistente y cancerígeno (ATSDR, 2003), también se considera como un contaminante grave debido a su toxicidad e impacto ambiental significativo en el aire, el agua y el suelo (Majumder P.S., Gupta S.K., 2007).

1.1 Métodos de eliminación de clorofenoles.

Existen procesos para eliminar los compuestos fenólicos halogenados; se incluyen los procesos fisicoquímicos (irradiación con luz, fotocatalisis y oxidación química) y biológicos (respiración aerobia y anaerobia). Sin embargo, en el caso de los procesos fisicoquímicos se implican mayores costos en el tratamiento y pueden dar como productos compuestos más tóxicos (pirocatecol) que el 2-CF (Mohn y Tiedje, 1992).

1.2 Procesos biológicos

Los clorofenoles pueden ser eliminados del medio ambiente por bacterias que realizan una biotransformación del compuesto, en donde la velocidad de biodegradación dependerá entre otras cosas, de la cantidad de microorganismos presentes y de las características del medio: pH, nivel de oxígeno, cantidad de nutrientes y temperatura, etc. (Cantar y col., 1991)

En condiciones aerobias, la ruta metabólica de degradación de los compuestos clorofenólicos involucra primero una hidroxilación para formar los correspondientes clorocatecoles, en el caso del pentaclorofenol solo se hidroxila y posteriormente se desclora, que son los metabolitos centrales de la degradación aerobia de la mayoría de los clorofenoles Farrell y Quilty (1999). Seguida de la ruptura del anillo aromático que se puede producir mediante la vía *orto* o *meta*, que es catalizada por enzimas dioxigenasas. Posteriormente ocurre la pérdida espontánea de cloro durante el paso de lactonización, hasta finalmente producir CO₂, H₂O e iones cloro, en otras palabras, la mineralización completa del compuesto haloaromático. Sin embargo, se ha propuesto que en el caso del 2-CF puede existir inactivación de las dioxigenasas provocando la acumulación de intermediarios (Farrel y Brid, 1999).

Durante la degradación microbiológica aerobia de clorofenoles, el oxígeno sirve como aceptor de electrones, en base a lo anterior se proponen una posible ruta de oxidación del 2-CP y sus isómeros el 3 y 4-clorofenol bajo condiciones aerobias (Figura 3). Para los 2 primeros se observó la formación de catecoles, en específico el 3-clorocatecol. La ruptura del anillo aromático se puede producir mediante la vía *orto* o *meta*. La mayoría de la ruptura de los clorocatecoles se realiza por vía *meta*. Posteriormente, mediante una oxigenasa, se forma el ácido 5-cloroformil-2-hidroxi-penta-2,4-dienoico. Este compuesto ha sido determinado como suicida, ya que inactiva a la enzima dioxigenasa, resultando por tanto en la acumulación del 3-clorocatecol. En el caso del 4-CP los autores proponen su oxidación completa debido a que por la acción de dioxigenasas, una vez roto el anillo bencénico, es posible su incorporación posterior al ciclo de los ácidos tricarbónicos. Considerando que la nitrificación es un proceso aerobio, cabe la posibilidad que se presente la ruta metabólica propuesta por Farrell y Quilty (1999) y se formen compuestos suicidas que podrían complicar aún más el que la nitrificación se lleve a cabo exitosamente en presencia de 2-CF.

1.3 Nitrificación.

La nitrificación es un proceso de conversión de NH_3 a NO_3^- por bacterias nitrificantes pertenecientes a la familia *Nitrobacteriaceae*, que se encuentran ampliamente distribuidas en suelos y aguas, oxidando aeróbicamente el NH_4^+ y NO_2^- (Figura 1). El proceso nitrificante es llevado a cabo por dos diferentes grupos de bacterias quimiolitotroficas, las bacterias amonio oxidantes (AOB por sus siglas en ingles) y las bacterias nitrito oxidantes (NOB por sus siglas en inglés) (Bernet y Spérandio, 2009).

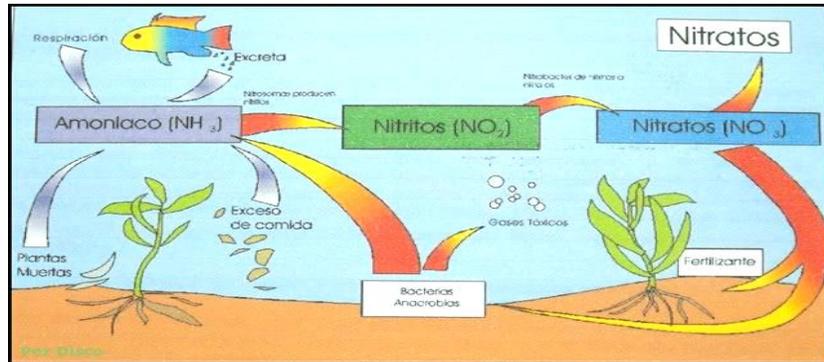


Figura 1. Esquema de la nitrificación.

Por lo tanto el NH_3 es oxidado por bacterias de los géneros *Nitrosomonas*, *Nitrosolobus*, entre otras, produciendo NH_2OH y H_2O por la amonio monooxigenasa (AMO) (ecuación 1) (Madigan y col., 2004). Posteriormente, la oxidación de NH_2OH a NO_2^- se lleva a cabo por la enzima hidroxilamina óxido reductasa (ecuación 2).

Por otra parte, la oxidación de NO_2^- a NO_3^- la realizan bacterias de los géneros *Nitrobacter* y *Nitrosococcus* entre otros, que emplean la enzima nitrito óxido reductasa (ecuación 3).

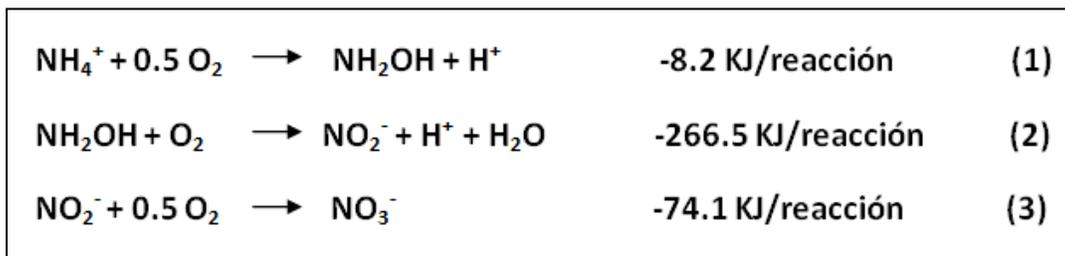


Figura 2. Ecuaciones del proceso nitrificante.

1.4 Factores que afectan la nitrificación

Como podemos mencionar todos los seres vivos incluyendo microorganismos, son susceptibles al medio ambiente que los rodea, en nuestro caso la nitrificación es un proceso biológico que puede verse afectado por la temperatura, pH, concentración de oxígeno y materia orgánica.

1.4.1 Efecto de la temperatura.

En el proceso de la nitrificación, el efecto de la temperatura se ve reflejado en la velocidad de crecimiento de los microorganismos nitrificantes, a temperaturas superiores a 15 °C, las AOB presentan una velocidad de crecimiento mayor que las NOB (Bernet y Spérandio, 2009).

La temperatura tiene también un efecto en las velocidades de amonio y nitrito oxidación. Shammas (1986), realizó una comparación de varios trabajos (con lodos nitrificantes y cultivos axénicos amonio y nitrito oxidantes), que evaluaron el efecto de la temperatura en la velocidad de oxidación de amonio a nitrato, encontrando que la velocidad de nitrificación es una función de la temperatura dentro del intervalo de 5 a 35°C, teniendo la máxima velocidad nitrificante alrededor de los 30°C.

1.4.2 Efecto del pH

Respecto al pH se reporta que en bacterias amonio oxidantes (AOB) y nitrito oxidantes (NOB) alcanzan su mejor desempeño tanto en el crecimiento y como su actividad a valores de pH neutro a ligeramente alcalino (7.5-8.0) (Prosser, 1989; Gieseke y col., 2006). Otros autores como Holt y col. 1994 mencionan que en cultivos axénicos de AOB presentan un mejor crecimiento en un intervalo de pH de 5.8-8.5 mientras que las NOB lo presentan entre 6.5-8.5. Por otro lado, el pH también influye en la disponibilidad del sustrato, ya que se ha observado que el sustrato para las amonio oxidantes puede ser el amoniaco (Watson y col., 1981), por lo que la disminución del pH provocará que la especie predominante sea el amonio. Asimismo, se ha visto que la disminución de la actividad nitrificante a pH menores que 5 también se atribuye a la acumulación de ácido nitroso (HNO₂), el cual inhibe la oxidación del amonio. Aunque también se dice que la reducción en el valor del pH afecta la actividad enzimática (Anthonisen y col., 1976).

1.4.3 Efecto del oxígeno

En la nitrificación se asume que concentraciones de oxígeno superiores a 2 mg/L son adecuadas para la realización del proceso (Gerardi, 2002). En cambio a concentraciones bajas de oxígeno disuelto (0.2-0.5 mg/L) es posible que se muestre una limitación en la actividad nitrito oxidante en proceso nitrificante (Bernet y Sperandio, 2009). Por lo tanto

el proceso respiratorio nitrificante requiere de oxígeno molecular para la oxidación del amonio y para la respiración, tanto de las bacterias amonio oxidantes como de las nitrito oxidantes (Prosser, 1989).

1.4.4 Efecto de la materia orgánica.

Hay reportes que indican que dependiendo del tipo de materia orgánica, serán los efectos sobre la nitrificación. Por ejemplo, en cultivos axénicos nitrificantes, puede haber una inhibición en el crecimiento (Jensen, 1950) o bien, una inhibición de la actividad nitrificante donde la materia orgánica puede ocasionar una disminución en las velocidades del proceso respiratorio nitrificante (Zepeda y col. 2003, 2006; Texier y Gómez, 2007; Silva y col., 2009; Silva, 2011). Kenner y Arp. (1994) mencionan que al aumentar la concentración de materia orgánica en ensayos con *Nitrosomonas europaea*, el proceso nitrificante se veía afectado en la oxidación de amonio.

A pesar de estos efectos, se ha visto que los cultivos nitrificantes tienen la capacidad para consumir cierta materia orgánica. Este es el caso de Texier y Gómez (2007) que bajo condiciones nitrificantes, señalaron que en un reactor de lotes secuenciados nitrificante alimentado con compuestos aromáticos recalcitrantes como el *p*-cresol (25-150 mg C/L) y amonio (100 mg N-NH₄⁺/L), la velocidad de oxidación del *p*-cresol aumentó, mientras que el efecto inhibitorio de este compuesto sobre la nitrificación disminuyó conforme transcurrían los ciclos. También se ha observado que mediante este proceso, ya sea utilizando consorcios microbianos o bien cultivos axénicos (Keener y Arp 1994), es posible oxidar materia orgánica como etanol, acetato y también compuestos aromáticos como el benceno (Zepeda y col., 2003) *p*-xileno, estireno (Keener y Arp. 1994), tolueno, *m*-xileno (Zepeda y col., 2006, 2007), fenol (Pérez-Alfaro, 2007; Pérez-Alfaro y col., 2008) y *p*-cresol (Texier y Gómez. 2002, 2007; Silva, 2007; Silva y col., 2009). Asimismo, Silva y col. (2011) observaron en un reactor de lotes secuenciados que a lo largo de los ciclos de operación, un lodo nitrificante fue capaz de consumir totalmente el *p*-cresol y mineralizarlo a CO₂ sin afectar la eficiencia y el rendimiento de la nitrificación. De esta forma, fue posible eliminar simultáneamente amonio y compuestos inhibitorios o recalcitrantes de aguas residuales. Zepeda y col. (2013) trabajaron con un lodo nitrificante en un reactor SBR operado durante 4 meses, adicionando *m*-cresol a diferentes concentraciones (25-150 mg C-*m*-cresol/L) y 50 mg N-NH₄⁺/L, obteniendo la total eliminación de amonio (ENH₄⁺ = 98 ± 2%), así como la completa eliminación de *m*-cresol.

1.4.5 Relación carbono / nitrógeno (C/N).

Otro parámetro importante dentro del proceso de nitrificación es la relación entre el carbono orgánico y el nitrógeno, debido a que el contenido de estos macronutrientes en

el agua residual puede determinar la competencia en el crecimiento establecida entre las poblaciones de microorganismos autótrofos y heterótrofos (Ferrara y Ramírez, 2010).

1.4.6 Reactores de lote secuenciado (SBR).

En el tratamiento de aguas residuales existen diferentes tipos de reactores que sirven para tratar ciertos tipos de contaminantes del agua como es el amonio, entre ellos se encuentran los reactores de lotes secuenciados (SBR) (Texier y Gómez., 2004). Este tipo de reactores tiene un sistema de trabajo por etapas, dividido en cuatro fases (Figura 3): llenado, reacción biológica, sedimentación y drenado (Lloyd y Ketchum, 1997). Es fácil de operar y la calidad del efluente se puede regular controlando los tiempos de retención, reacción y de sedimentación (Lee y Jong 1999; Alemayehu y col., 2001). Una de las características principales de este tipo de reactor, es que los procesos biológicos tienden a alcanzar una etapa de adaptación y estabilización, pues se ha observado que los tiempos de reacción disminuyen conforme transcurre el número de ciclos (Texier y Gómez, 2007), como también pueden eliminar compuestos tóxicos y/o inhibitorios. Un ejemplo es lo que ha reportado Martínez-Jardines (2013), que al utilizar lodos expuestos a compuestos fenólicos previamente (2-CF y *p*-cresol) en un proceso nitrificante y con un reactor de lotes secuenciados (SBR), la adición de 20 mg de C-2-CF/L provocó un efecto inhibitorio sobre el proceso nitrificante, pues se observó una disminución significativa en las velocidades específicas ($q_{NH_4^+}$, $q_{NO_3^-}$) con respecto a un control. Sin embargo, la inhibición del proceso nitrificante disminuyó a través de los ciclos de operación, observando consumo de 2-CF, NH_4^+ y producción de NO_3^- al final del estudio.

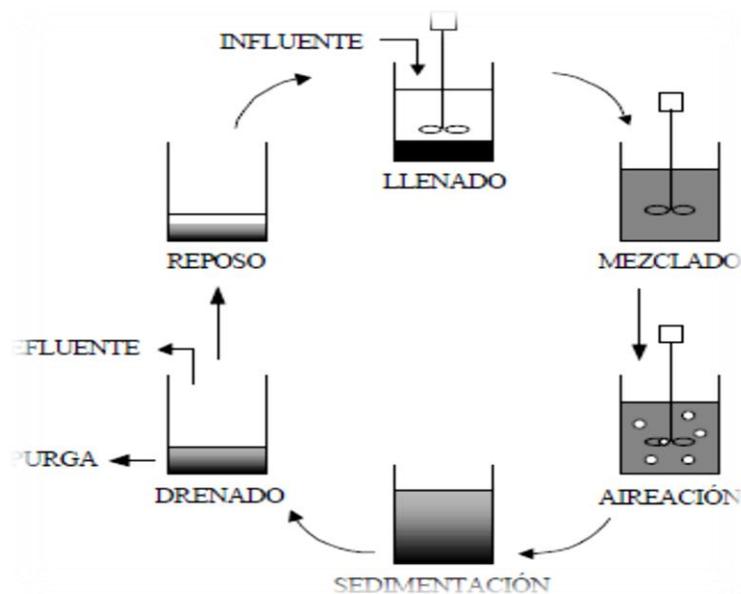


Figura 3. Ejemplo de un proceso cíclico de reactores secuenciados en lote para la eliminación de nitrógeno.

2 ANTECEDENTES

2.1 Degradación de 2-clorofenol bajo condiciones nitrificantes.

Hasta la fecha son escasos los reportes en la literatura sobre el proceso respiratorio nitrificante en presencia de 2-CF. Pero existen autores como Inui y col. (2002), utilizando un cultivo de *Nitrosomonas* como biosensores para la presencia de clorofenoles en un sistema de tratamiento de aguas municipales, encuentran que la presencia de 0.9 mg/L de 2-CF disminuye la actividad nitrificante en un 10%. Sin embargo, no hacen mención a la producción de nitrito o nitrato o al destino del 2-CF Satoh y col. (2005), utilizando microelectrodos y una biopelícula nitrificante, reportan que 10 mg/l C-2-CF inhibe la respiración aerobia y el consumo de amonio. Martínez-Hernández y col., 2011 con lodos sin contacto previo a 2-CF en ensayos nitrificantes en presencia de 100 mg N-NH₄⁺/L y 5 mg C-2-CF/L, se encontró el consumo de solo el 10% de amonio y una conversión completa de este a nitrato en 30 días de cultivo, sin embargo, el proceso nitrificante se inhibió, pues la velocidad de consumo de amonio disminuyó en un 95%. Bajo estas condiciones, se consumió totalmente el 2-CF.

Pérez-Alfaro y col. (2013) mostró que con 100 mg N-NH₄⁺/L, 2.5 y hasta 10 mg 2-CF/L, se encontró una inhibición total del proceso nitrificante, aunque el 2-CF se consumió completamente a los 30 y 80 días de cultivo, respectivamente. Estos trabajos indican un efecto inhibitorio del 2-CF sobre la nitrificación. Por otra parte, estudios utilizando un lodo nitrificante previamente expuesto a 2-CF, indicaron que es posible llevar a cabo la nitrificación aún en presencia de 20 mg C-2-CF/L en un reactor SBR (Martínez-Jardines, 2013). El autor reporta que aunque el 2-CF tiene efectos inhibitorios sobre el proceso nitrificante, la inhibición disminuyó después de 2 ciclos de operación (ciclo 3). Sin embargo, los tiempos de reacción necesarios para la eliminación completa de amonio y su oxidación a nitrato fueron cercanos a 30 días. Recientemente, Pérez-Alfaro (2015), reportó que, en comparación con cultivos nitrificantes adicionados con 100 mg N-NH₄⁺/L, fue posible disminuir el efecto inhibitorio de 5 mg C-2-CF/L sobre la nitrificación, cuando un lodo nitrificante sin contacto previo a este compuesto es alimentado con concentraciones de amonio entre 300 y 500 mg N/L. El autor obtuvo un consumo de amonio de 27 y 42% respectivamente y su conversión a nitrato de 0.59 y 0.64 en periodos entre 24 y 48 horas,. Asimismo, la velocidad de consumo de amonio aumentó en ambos casos con respecto a los ensayos con 100 mg/L de amonio. Al alimentar con concentraciones de 300 y 500 mg N/L observó un consumo entre el 47 y 88% del 2-CF presente a las 48 horas de cultivo.

2.2 Eliminación de compuestos carbonados y nitrogenados en reactores SBR.

Los procesos discontinuos se han explorado para aumentar las eficiencias de eliminación de contaminantes en las aguas residuales (Buitrón y col, 2001). La tecnología del SBR ha sido evaluada en términos de su potencial para la eliminación simultánea de carbono, nitrógeno y fósforo (Murat y col, 2002; Obaja y col., 2003). Diversas son las características asociadas a este tipo de reactor, una de ellas es que los procesos biológicos tienden a una etapa de adaptación, ya que se ha observado que los tiempos de reacción disminuyen conforme transcurre el número de ciclos, lo que sugiere que las velocidades específicas de consumo y producción aumentan al incrementarse el número de ciclos y se alcanza un estado estacionario (Moreno-Andrade y Buitrón, 2004). Buitrón y col. (2001) observaron que en un SBR, utilizando lodos activados y una mezcla de fenol, 4-clorofenol, 2,4-diclorofenol y 2, 4,6-triclorofenol, una vez adaptado el cultivo, el tiempo de reacción se redujo de 40 h a 50 minutos obteniendo eficiencias de eliminación del 99%. De igual forma Martins y col. (2003) observaron que en condiciones aerobias y en un sistema SBR, las velocidades específicas de consumo de acetato, pueden aumentar hasta 2 veces con respecto a su valor inicial.

Se han realizado estudios eliminando compuestos carbonados, nitrogenados (Jong, 1999., Garrido y col, 2001) y fosforados (Nava-Ramírez y González-Martínez, 2000). Trabajando con concentraciones iniciales de $909 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{L}$ y 88.7 mg/L de P-PO_3^{-4} con una duración de 8 h por ciclo, se han encontrado eficiencias de eliminación de nitrógeno y fósforo mayores que 95% y 97% respectivamente, así como un rendimiento nitrificante (YNO_3^-) de 0.73 (Obaja y col, 2003).

3 JUSTIFICACIÓN

Como se puede ver, los reactores de lotes secuenciados son utilizados con éxito para tratar aguas residuales tanto municipales como industriales. Son ampliamente utilizados para el tratamiento de aguas por nitrificación. Dichos reactores tienen como característica principal alcanzar una etapa de adaptación y estabilización, pues se ha observado que los tiempos de reacción disminuyen conforme transcurre el número de ciclos. Por otro lado, se sabe que al utilizar lodos nitrificantes sin contacto previo al 2-CF y concentraciones de 2-CF entre 2 y 10 mg/L, se presenta un efecto inhibitorio sobre la nitrificación y que es posible eliminar de forma simultánea, hasta 20 mg C-2-CF/L y 100 mg $\text{N-NH}_4^+/\text{L}$ en un reactor SBR usando lodos con contacto previo al compuesto clorado, pero los tiempos para lograrlo son largos (30 días).

Se sabe también que al utilizar lodos nitrificantes sin previo contacto al 2-CF, es posible aumentar el consumo de este compuesto cuando se aumenta la concentración de amonio. Los antecedentes sugieren que es posible observar actividad nitrificante aun en presencia de 2-CF si se adicionan concentraciones altas de amonio y se usa un reactor SBR, sin embargo, bajo estas condiciones, no se tiene caracterizado el proceso nitrificante en términos fisiológicos, es decir, en cuanto a eficiencias de consumo y rendimientos de generación de productos, ni en términos cinéticos, esto es, en cuanto a las velocidades específicas de consumo y producción, por lo que es necesario generar esta información.

4 HIPÓTESIS

Con el empleo de altas concentraciones de amonio, en conjunto con el uso de un reactor SBR, se disminuirán los efectos inhibitorios del 2-CF sobre la actividad nitrificante, de forma que se promoverá el consumo simultáneo de ambos compuestos en periodos cortos de tiempo.

5 OBJETIVOS.

5.1 Objetivo general.

- Evaluar en un reactor SBR, el comportamiento fisiológico y cinético de un lodo nitrificante sin exposición previa a 2-CF alimentado con altas concentraciones de amonio y en presencia de 2-CF.

5.2 Objetivos específicos.

- Evaluar en ensayos en lote, el efecto de dos relaciones C/N y diferentes concentraciones de amonio, sobre el comportamiento fisiológico y cinético de la nitrificación.
- Determinar en un reactor SBR, las velocidades específicas de consumo de amonio y producción de nitrato en presencia de 2-CF a lo largo de los ciclos de operación.
- Determinar las velocidades específicas de consumo de 2-CF a lo largo de los ciclos de operación.

6 METODOLOGÍA.

Para la realización del presente trabajo, se mantuvo un reactor nitrificante alimentado en continuo, a fin de obtener un inóculo nitrificante en estado estacionario. Posteriormente, el trabajo se desarrolló en varias etapas. En un inicio se llevaron a cabo ensayos en cultivo en lote en ausencia y presencia de 2-CF. Se continuó con la inoculación, puesta en marcha, estabilización y adaptación de un reactor de lote secuenciado (SBR) para la evaluación del proceso de nitrificación en presencia y ausencia de 2-CF. A continuación se describe detalladamente lo anterior.

6.1 Consorcio nitrificante en cultivo continuo en el reactor de tanque agitado: fuente de inóculo.

Se utilizó un reactor de tanque agitado (Bioflo 2000 Fermentor) de la marca New Brunswick Scientific Co. (Edison New Jersey USA), con una capacidad de 10 litros, en el cual se mantuvo un consorcio nitrificante en estado estacionario que posteriormente fue utilizado como inóculo (Figura 4).



Figura 4. Reactor de tanque agitado (Bioflo 2000 Fermentor) laboratorio W004 UAM Iztapalapa.

El reactor en continuo se operó bajo las siguientes condiciones: volumen de trabajo de 6 litros, temperatura de 25 °C, agitación 200 rpm, relación carbono/nitrógeno (C/N) 2.5, tiempo de residencia hidráulico (TRH) 2 días, pH 6.5-7.5, con una velocidad de carga de 200 mg N-NH₄/l d. A fin de tener caracterizado el cultivo nitrificante, se determinaron las eficiencias de consumo de sustrato, los rendimientos nitrificantes y las velocidades de consumo de amonio y producción de nitrato a lo largo del tiempo de operación (65 días). Los lodos nitrificantes cultivados bajo estas condiciones fueron utilizados como inóculo para los subsiguientes estudios. Previo a su utilización, los lodos fueron lavados con solución fisiológica (0.85 g NaCl/L).

6.2 Medio de cultivo

Para evitar la posible precipitación de los componentes y evitar el crecimiento de los microorganismos dentro de los tanques de alimentación, el medio que se utilizó para alimentar el reactor se dividió en dos soluciones: A (fuente de nitrógeno) y B (fuente de carbono) (tabla 2).

Tabla 2. Composición del medio de cultivo para el reactor de tanque agitado.

A	(g/L)	B	(g/L)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5.9	NaHCO_3	9.3
NH_4Cl	4.8	CaCl_2	0.5
KH_2PO_4	7.0	FeSO_4	0.15
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	6.0		
NaCl	5.0		

6.3 Cultivo en lote: ensayos nitrificantes control o de referencia.

En una primera parte, se evaluó en ensayos en lote el comportamiento fisiológico y cinético del consorcio nitrificante utilizando diferentes concentraciones iniciales de $\text{N-NH}_4^+/\text{L}$ (100, 200, 300, 400 y 500) y a dos relaciones C/N, de 1.75 y 2.5. Los resultados obtenidos en estos ensayos se utilizaron como referencia y para definir las condiciones a las que se operarían los reactores SBR.

Los ensayos se realizaron en botellas serológicas de 500 mL de capacidad con un volumen de trabajo de 100 mL y 400 mL de espacio de cabeza. Se utilizó el medio de cultivo descrito en la tabla 3. La concentración de bicarbonato de sodio se modificó de acuerdo a la concentración de amonio requerida para obtener la C/N de 1.75 y 2.5. En todos los casos se adicionó 0.5 ml FeSO_4 , complementando el volumen de trabajo con agua destilada en cada caso. A cada botella se le burbujeó oxígeno durante dos minutos y se inoculó con aproximadamente 200 mg de proteína/L proveniente del reactor nitrificante en continuo (previamente lavada con solución fisiológica). La botella se selló y nuevamente se introdujo oxígeno durante dos minutos. A fin de establecer perfiles de consumo y producción y cinéticas del proceso nitrificante, se tomaron muestras a diferentes tiempos durante 24 h. Los ensayos se realizaron por duplicado a una

temperatura de 30 °C y una agitación de 200 rpm. Cada botella correspondió a una medición independiente y fue desechada posterior a su análisis.

Tabla 3. Composición del medio de cultivo en lote.

A	(g/L)	B	(g/L)
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.95	NaHCO ₃	7.0
NH ₄ Cl	0.77	CaCl ₂	0.04
KH ₂ PO ₄	1.12	FeSO ₄	0.15
MgSO ₄ -7H ₂ O	1.6		
NaCl	0.8		

6.4 Cultivo nitrificante en lote con 2-CF

La evaluación del efecto del 2-CF sobre el proceso nitrificante, se llevó a cabo en las mismas condiciones a las ya descritas para los ensayos control en lote, ahora adicionados con una concentración de 5 mg C-2-CF/L. Todos los ensayos se realizaron por duplicado, en donde cada botella correspondió a una medición independiente y fue desechada posterior a su análisis. En estos ensayos se mantuvo una relación (C/N) de 2.5, ya que resulto con mejores eficiencias de consumo de amonio (ENH₄⁺) a altas concentraciones en el proceso en comparación con una C/N 1.75.

6.5 Reactor de lote secuenciado

6.5.1 Ensayos abióticos

Los ensayos abióticos se llevaron a cabo para conocer la pérdida de 2-CF por volatilización o arrastre en dos reactores de lote secuenciados (SBR1 y SBR2), adicionados con el medio de cultivo descrito en los ensayos anteriores, con una concentración de 5 mg C-2-CF/L y en ausencia de biomasa. Para el posterior desarrollo del trabajo solamente se utilizó un solo reactor. Los reactores fueron sellados herméticamente y se les habilitó una manguera para la salida del aire. Adicionalmente, a esta salida de aire se le instaló una trampa con agua destilada para capturar el 2- CF que pudiera arrastrarse durante la aireación.

El SBR1 fue operado con una aireación constante y el SBR2 con aireación intermitente. En todos los casos, se determinó la concentración de 2-CF en el medio de cultivo inicial, el remanente en el medio de cultivo después de la aireación y la encontrada en la trampa de agua a la salida del reactor. La pérdida de 2-CF por arrastre se determinó en los dos reactores, durante un periodo de 6 días.

6.5.2 Estabilización de la nitrificación en un reactor SBR

Para lograr la estabilización de la nitrificación, se utilizó un reactor SBR con el medio de cultivo descrito en la tabla 5. El SBR fue alimentado con dos concentraciones de amonio: 100 y 200 mg N-NH₄⁺/L y con una relación carbono/nitrógeno (C/N) 2.5. El reactor se inoculó con un lodo nitrificante correspondiente a una concentración de 350 mg de proteína bacteriana/L proveniente del reactor nitrificante alimentado en continuo.

El reactor se operó con un volumen de 1 L, una agitación constante de 200 rpm y una aireación intermitente. Se utilizaron bombas peristálticas para la alimentación, la descarga de efluentes y toma de muestras del reactor. La duración del ciclo fue repartida de la siguiente forma: llenado = 0.05 h; tiempo de reacción = el tiempo necesario para obtener una eficiencia de eliminación de amonio ($ENH_4^+ \geq 95\%$); sedimentación de lodos = 0.50 h, y drenado = 0.05. Bajo estas condiciones se tomaron muestras cada 2 horas durante las 24 horas de reacción y durante 5 ciclos de operación, a fin de determinar el comportamiento fisiológico nitrificante y las velocidades específicas de consumo y producción del proceso.

Tabla 4. Composición del medio de cultivo para los reactores de lotes secuenciados.

A	(g/L)	B	(g/L)
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.47	NaHCO ₃	3.5
NH ₄ Cl	0.38	CaCl ₂	0.02
KH ₂ PO ₄	0.56	FeSO ₄	0.075
MgSO ₄ -7H ₂ O	0.4		
NaCl	0.4		

6.5.3 Cultivo nitrificante en un reactor SBR en presencia de 2-CF.

Una vez que la nitrificación alcanzó el estado estacionario respiratorio deseado en el reactor SBR, se procedió con la evaluación del efecto del 2-CF sobre el proceso nitrificante. Esto se llevó a cabo en las mismas condiciones ya descritas para los ensayos control en un reactor SBR pero adicionado con 5 mg C-2-CF/L. A fin de determinar el comportamiento cinético y fisiológico del lodo, se tomaron 4 muestras por día en un periodo de 7 días (168 horas) en el cultivo y se calcularon la eficiencia de consumo de amonio y 2-CF, el rendimiento nitrificante y las velocidades específicas de consumo y producción a lo largo de los ciclos de operación.

7 Técnicas analíticas

Las técnicas analíticas que se emplearon en el desarrollo experimental de este trabajo se muestran en la Tabla 5 y a continuación se desglosan cada una de ellas.

Tabla 5. Métodos analíticos utilizados.

Método	Determinación
Electrodo de ion selectivo	Nitrógeno amoniacal ($N-NH_4^+$)
HPLC	Nitrito y nitrato ($NO_2^- - NO_3^-$), 2-CF
CIA	Nitrito y nitrato ($NO_2^- - NO_3^-$)
Lowry	Proteína
Potenciómetro	pH

7.1 Cuantificación de amonio

Para cuantificar amonio, se utilizó un electrodo selectivo de amoniac (Phoenix electro de Co). La lectura del potencial (mV) generado por el electrodo se registró con un potenciómetro (Cole-Parmer, DigiSense). El valor del potencial es proporcional al logaritmo de la concentración cuyo valor puede ser calculado directamente de la ecuación de la recta. Se tomó un volumen de muestra de 25 ml y se alcalinizó con 0.5 mL de solución de NaOH (10N) para desprotonar el ion amonio formándose el amoniac. Bajo agitación constante (300 rpm) y temperatura ambiente, se tomó la lectura del potencial (mV) cuando fue estable (aproximadamente 3 min. después de agregar el NaOH).

En la Figura 5, se muestra un ejemplo de curva estándar para la determinación de amonio (0 a 400 mg $N-NH_4^+$ /L).

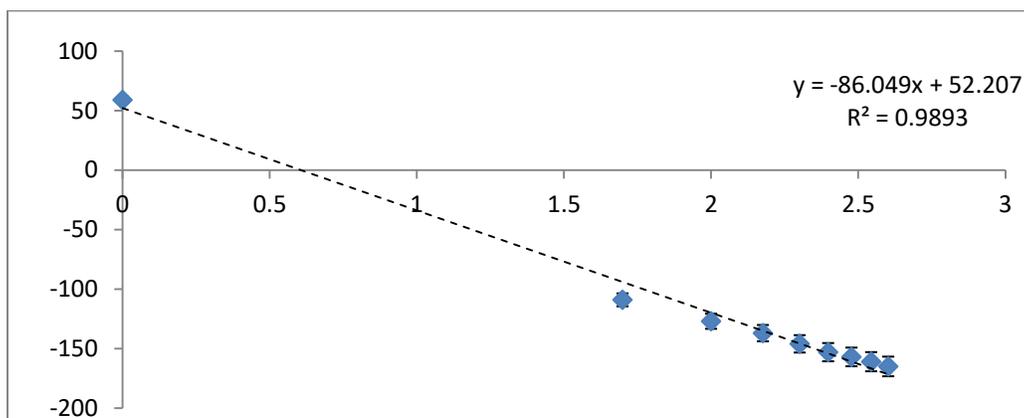


Figura 5. Ejemplo de una curva estándar de amonio con electrodo de ion selectivo.

7.2 Nitrito y Nitrato

Para la cuantificación de nitrito y nitrato, se utilizó un cromatógrafo de líquidos (HPLC, Perkin Elmer serie 200) con una columna de intercambio iónico (Waters IC-pak HC) y un detector UV-visible. La fase móvil consiste en una mezcla de butanol, acetonitrilo y un concentrado de gluconato (20:120:20 v:v) diluidos con agua desionizada a un volumen de 1L. La fase móvil se filtró por medio de una membrana de 0.45 μm . Se midió a una longitud de onda de 214 nm, a un flujo de 2 ml/min.

En la Figura 6 y 7, se muestran un ejemplo de curva estándar de nitritos y nitratos obtenida mediante HPLC y CIA (100 a 500 mg N-NH_4^+ /L).

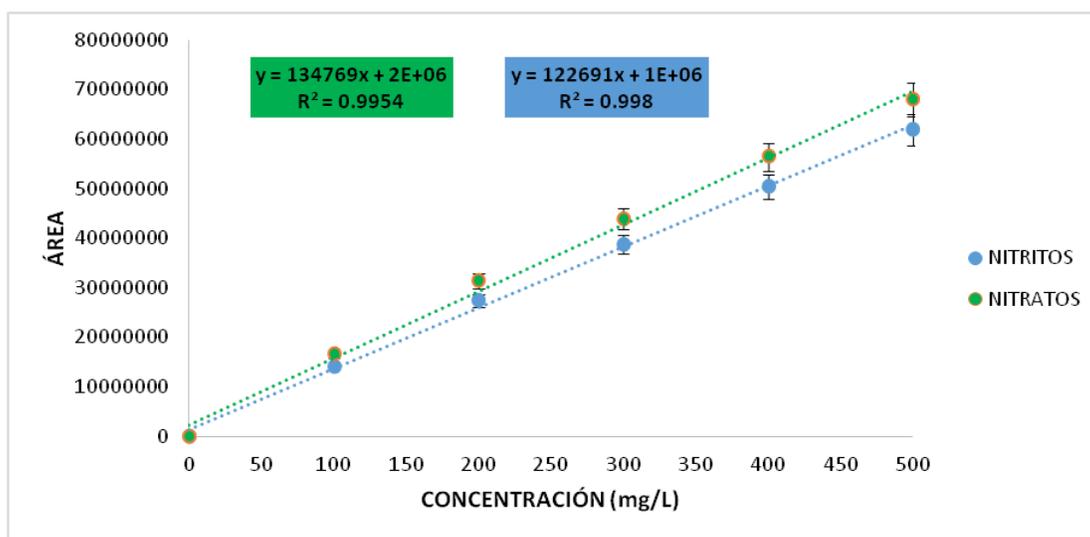


Figura 6. Ejemplo de curvas estándar de nitrito - nitrato HPLC.

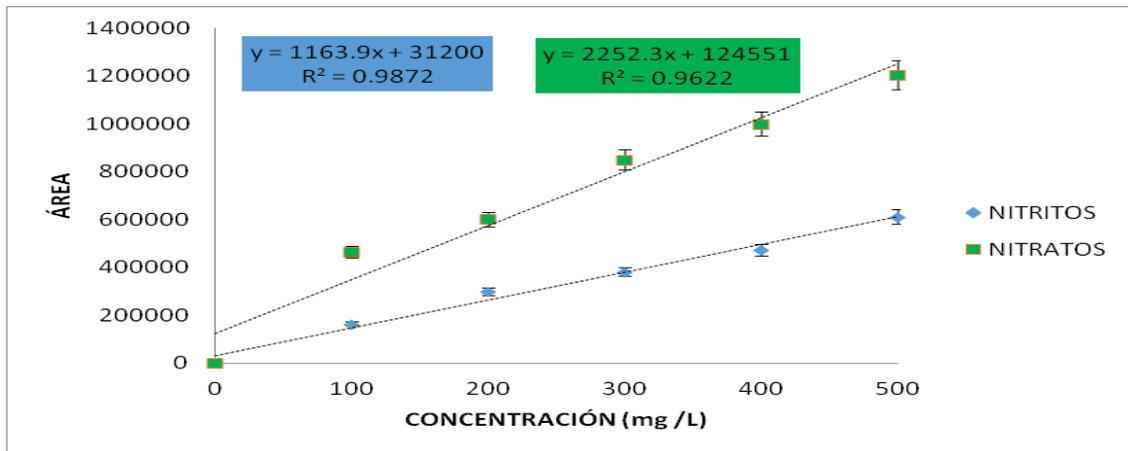


Figura 7. Ejemplo de curvas estándar de nitrito -nitrato CIA.

7.3 Cuantificación de proteína microbiana.

El método colorimétrico de Lowry (Lowry y col., 1951) se utilizó para determinar la concentración de proteína microbiana en el reactor de lotes secuenciados. El método se basa en la reacción para formar un complejo Cu-proteína y la posterior reducción de este complejo por el reactivo de Folin-Ciocalteu, donde se obtiene un color azul en un ambiente alcalino (pH de 10). El reactivo de Folin-Ciocalteu (Hycel) está formado por molibdato, fosfato y tungstato de sodio y produce un máximo de absorción a 750 nm. Esta técnica requiere de proteínas que contengan péptidos con grupos fenólicos que puedan enlazarse con el Cu_2^+ . Se prepararon diferentes curvas de calibración de albúmina (Sigma, 96-99%) de 0 a 300 mg/L. La absorbancia a 750 nm se midió en un espectrofotómetro UV/VIS (Shimadzu, mod. UV-1601).

En la figura 8 se muestra un ejemplo de las curvas realizadas por el método colorimétrico de Lowry.

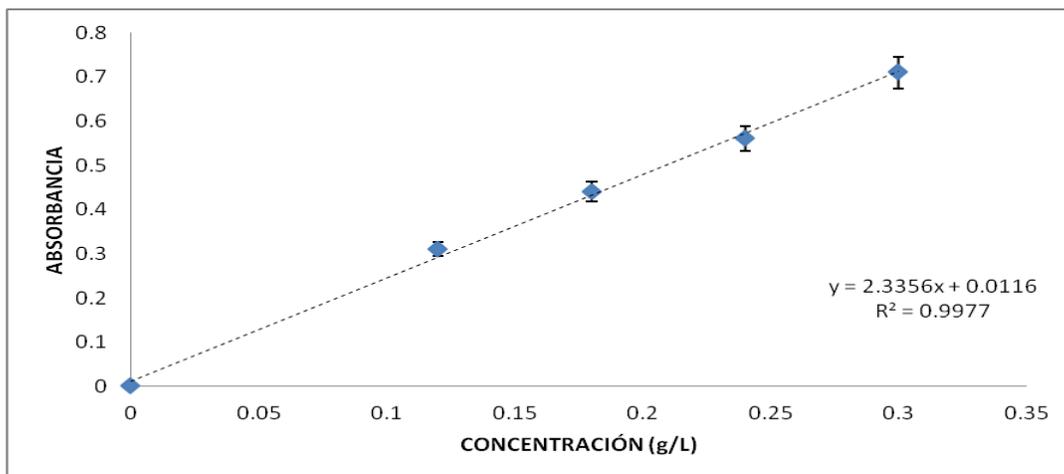


Figura 8. Ejemplo de curva estándar de proteína por el método de Lowry.

7.4 Cuantificación de 2-Clorofenol.

Se utilizó un cromatógrafo de líquidos (HPLC) Perkin-Elmer series 200, una columna Bondclone 10u C-18 (Phenomenex, 300 x 3.9 mm). El equipo cuenta con un detector UV/VIS y la longitud de onda para la detección fue 274 nm. La fase móvil se compuso de una mezcla de acetonitrilo y agua (60:40 v/v), con un flujo de 1.5 ml/min y un tiempo de corrida de 4 min. La inyección de muestra se hizo por un automuestreador fijando el volumen de inyección en 20 µl. A partir de una solución madre se realizaron las soluciones estándar con 1, 2, 3, 4, 5 y 6 mg C-2-CF/L.

En la figura 9 se muestra un ejemplo de la curva realizada para la cuantificación de 2CF (1 a 6 mg C-2CF/L) en HPLC.

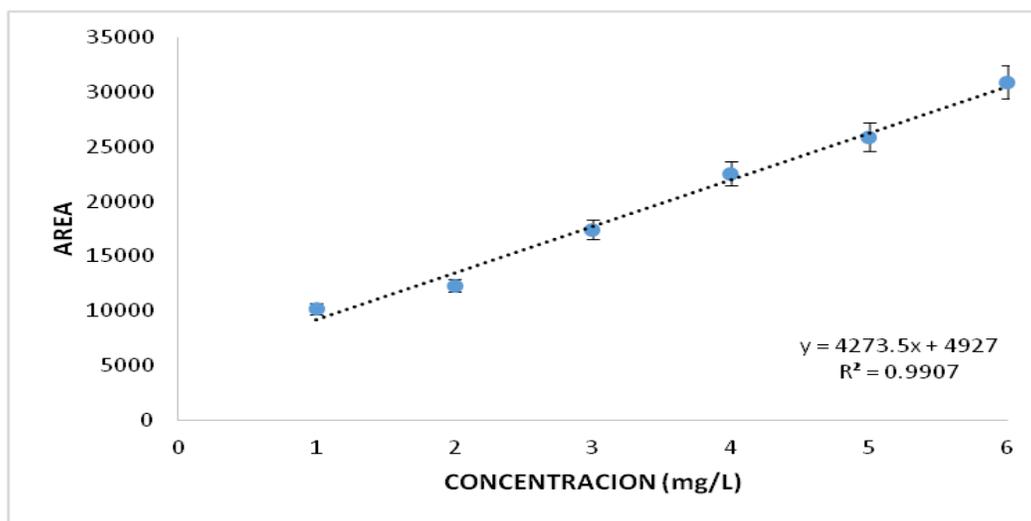


Figura 9. Ejemplo de curva estándar de C-2-CF por HPLC.

7.5 Cuantificación de pH

Se utilizó un multímetro digital portátil (Digital pH / mV / ORP Meter 559-3800) diseñado con electrónica de estado sólido que proporciona operación altamente confiable. La pantalla LCD le permite leer incluso bajo condiciones ambientales brillantes para medir pH (manual), milivoltios mV y determinación de ORP. El equipo cuenta con un bulbo de vidrio de la sonda que debe mantenerse siempre húmedo en una solución buffer de pH 7. La calibración se realizó con soluciones buffer de pH 4 y 7. Se realizó un enjuague con agua destilada al bulbo seco con papel seda.

8. Variables de respuesta.

El comportamiento del proceso nitrificante se evaluó mediante diferentes variables de respuesta, las cuales, para todos los casos, se determinaron a lo largo del proceso. Se describen a continuación.

Eficiencia de consumo de amonio (ENH₄);

$$E_{NH_4} = \frac{\left(\frac{mg_{N-NH_4}}{l} \text{ entrada} - \frac{mg_{N-NH_4}}{l} \text{ salida} \right)}{\frac{mg_{N-NH_4}}{l} \text{ entrada}} * 100$$

Eficiencia de consumo de 2CF (E2CF);

$$E_{2CF} = \frac{\left(\frac{mg_{C-2CF}}{l} \text{ entrada} - \frac{mg_{C-2CF}}{l} \text{ salida} \right)}{\frac{mg_{C-2CF}}{l} \text{ entrada}} * 100$$

Rendimiento de formación de nitrato (YNO₃);

$$Y_{NO_3} = \frac{\left(\frac{N - NO_3}{l} \text{ salida} - \frac{N - NO_3}{l} \text{ entrada} \right)}{\left(\frac{N - NH_4}{l} \text{ entrada} \right) - \frac{N - NH_4}{l} \text{ salida}}$$

Rendimiento de formación de nitrito (YNO₂);

$$Y_{NO_2} = \frac{\left(\frac{N - NO_2}{l} \text{ salida} - \frac{N - NO_2}{l} \text{ entrada} \right)}{\left(\frac{N - NH_4}{l} \text{ entrada} \right) - \frac{N - NH_4}{l} \text{ salida}}$$

Rendimiento de formación de biomasa (Y_{x/s});

$$Y_{\frac{x}{s}} = \frac{\frac{mg - N - PROTEINA}{l} (\text{Producido})}{\frac{mg N - NH_4}{l} (\text{Consumido})}$$

Balances de materia.

$$[N-NH_4^+ \text{ entrada}] = [N-NH_4^+ \text{ salida}] + [N-NO_2^-] + [N-NO_3^-] + [N\text{-proteína}]$$

Velocidades específicas de consumo y producción, donde q ($qp = 1/x \, dP/dt$) es la velocidad específica ($mg / mg \text{ proteína } h$), y Q ($Qp \, x = dP / dt$) es la velocidad volumétrica ($mg \, N-X / Ld$) obtenida de la pendiente de la ecuación de la recta.

Velocidad específica de consumo de NH_4^+ ($q_{NH_4^+}$)

$$q_s = \frac{1}{x} \frac{dS}{dt} [=] \frac{mg \, N - NH_4^+ \text{ consumido}}{mg \text{ proteína } h}$$

Velocidad específica de producción de NO_3^- (q_{NO_3})

$$q_p = \frac{1}{x} \frac{dP}{dt} [=] \frac{mg \, N - NO_3^- \text{ producido}}{mg \text{ proteína } h}$$

Velocidad específica de consumo de 2-CF (q_{C-2CF})

$$q_{2CP} = \frac{1}{x} \frac{d2CP}{dt} [=] \frac{mg \, C - 2CP \text{ consumido}}{mg \text{ proteína } h}$$

9. Resultados y Discusión.

La tabla 6 indica en resumen, la linealidad y coeficientes de variación de los métodos analíticos utilizados durante el desarrollo de este trabajo. Los coeficientes de determinación (R^2) obtenidos fueron mayores que 0.987 y los coeficientes de variación (C.V) menores que el 10%, indicando que los métodos tuvieron una buena reproducibilidad.

Tabla 6. Técnicas analíticas empleadas

MÉTODO	ANÁLISIS	R^2	C.V %
Electrodo de ion selectivo	Amonio	0.991±0.001	0.169
HPLC	Nitrito	0.998±0.006	0.005
HPLC	Nitrato	0.995±0.003	0.002
HPLC	2CF	0.990±0.026	0.027
CIA	Nitrito	0.987±0.002	0.002
CIA	Nitrato	0.962±0.022	0.022
Lowry	Proteína Microbiana	0.994±0.003	0.327

9.1 Reactor continuo: Estabilización y obtención de la fuente de inóculo.

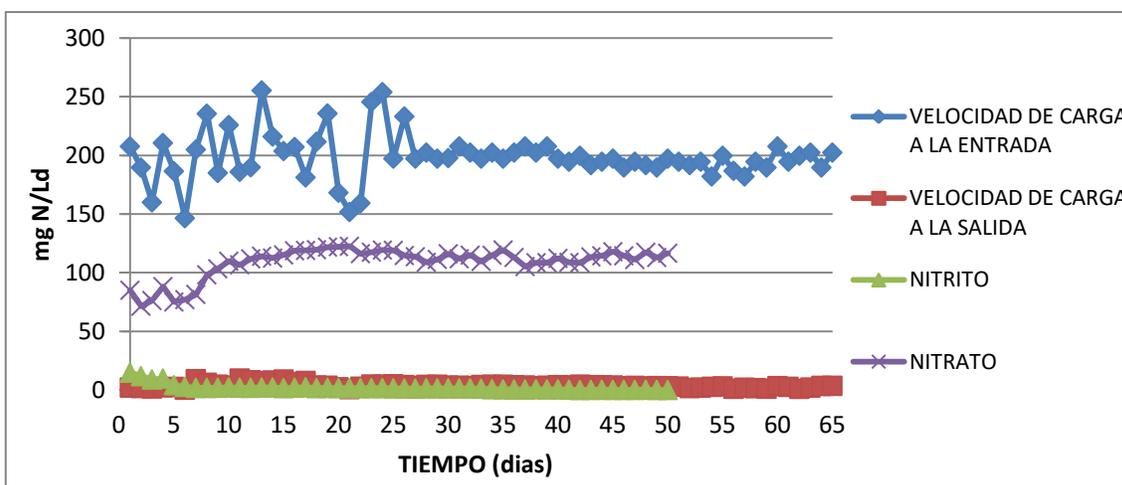


Figura 10. Comportamiento de velocidades de carga de amonio en reactor continuo.

El comportamiento de proceso nitrificante en términos de las velocidades de carga de N-NH_4^+ a la entrada y salida del reactor ($\text{N-NH}_4^+/\text{Ld}$), obtenidos en un período de alrededor de 65 días de operación y un TRH de 2.05 ± 0.08 días, se muestra en la Figura 10. Bajo las condiciones de operación establecidas, se observó que una gran proporción del amonio alimentado fue consumido y que éste fue oxidado a nitrato sin que hubiera acumulación significativa de nitrito. De hecho, se obtuvo en promedio, una eficiencia de consumo de

amonio (ENH_4^+) de 98.06 ± 0.99 %, el YNO_3^- fue de 0.98 ± 0.01 g $\text{N-NO}_3^-/\text{g NH}_4^+$ consumido. Se determinó una velocidad de carga y descarga de amonio de 198.77 ± 19.96 y 3.88 ± 2.04 ($\text{mg N-NH}_4^+/\text{Ld}$) respectivamente, mientras que la velocidad de producción de nitrato y nitrito fue de 102.14 ± 17.28 y 2.05 ± 0.081 ($\text{mg N-NO}_3^-/\text{Ld}$). Como se puede observar el coeficiente de variación (CV) a partir del día 26 se mantuvo debajo del 10%. Con base en estos resultados, se puede decir que el lodo nitrificante alcanzó el estado estacionario.

9.2 Ensayos nitrificantes en lote a diferentes concentraciones de amonio y diferentes relaciones C/N.

En la Figura 11 se presentan las eficiencias de consumo de amonio, así como los valores de pH obtenidos después de 24 horas del proceso nitrificante evaluado en las dos relaciones C/N y diferentes concentraciones de amonio (100, 200, 300, 400, 500 $\text{mg N-NH}_4^+/\text{L}$). Se encontró que independientemente de la concentración de N-NH_4^+ , cuando se usó una relación C/N de 2.5, la ENH_4^+ fue mayor al 95%. Con la C/N de 1.75 solo se obtuvieron eficiencias semejantes con concentraciones de 100, 200 y 300 $\text{mg N-NH}_4^+/\text{L}$. Una causa de este comportamiento podría ser el valor de pH obtenido en cada ensayo, puesto que se ha demostrado que la reducción de éste también disminuirá la concentración de amoniaco libre en un orden de magnitud por cada unidad que se reduzca de pH (Prosser, 1989). En el ensayo a una C/N de 2.5, el pH permaneció entre 6.5 - 7.0. En cambio, a una relación C/N de 1.75 se encuentra entre 5.6 - 6.6. La literatura indica que para que la nitrificación se realice adecuadamente, el pH debe mantenerse entre 6.5 y 8.5 (Holt y col., 1994). Entonces, en el intervalo de concentración de amonio entre 100 y 500 $\text{mg N-NH}_4^+/\text{L}$, la relación de C/N de 2.5 permite obtener las mayores ENH_4^+ y los valores de pH adecuados para llevar a cabo la nitrificación.

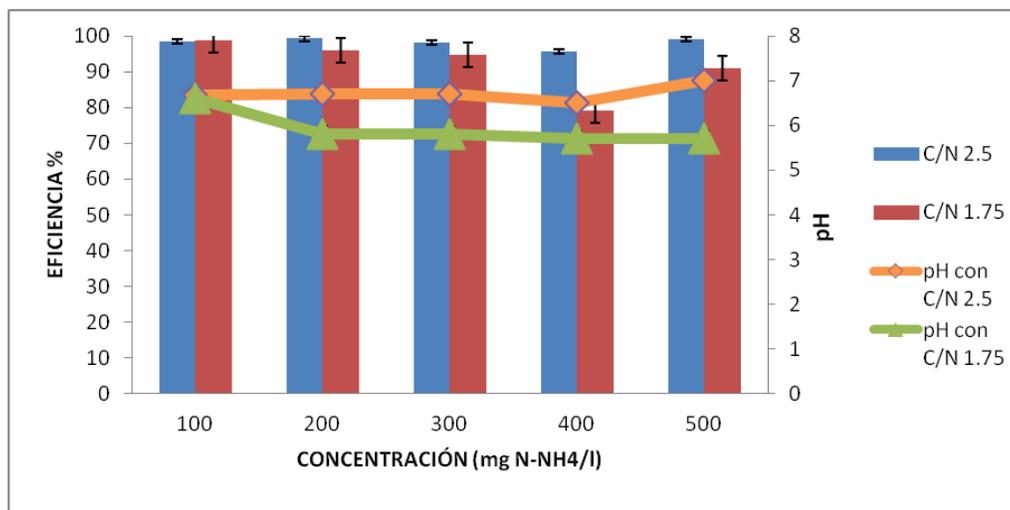


Figura 11. Eficiencias de consumo de amonio y pH obtenidos a dos C/N y diferentes concentraciones de amonio.

Las velocidades específicas del consumo de amonio ($q\text{NH}_4^+$) obtenidas con las dos C/N (1.75, 2.5) y diferentes concentraciones de amonio (100, 200, 300, 400,500 mg NH_4^+ /L) se muestran en la tabla 7. Se encontró que independientemente de la relación C/N ensayada, la $q\text{NH}_4^+$ se incrementa al aumentar la concentración de amonio, indicando que se presenta una reacción de primer orden. Asimismo, se observó que los valores de $q\text{NH}_4^+$ calculados al utilizar la C/N de 1.75 son similares a los calculados con la C/N de 2.5, por lo que se puede decir que la relación C/N utilizada no presenta un efecto significativo sobre la $q\text{NH}_4^+$. En contraste, los mayores valores de velocidades específicas de producción de nitrato ($q\text{NO}_3^-$) se determinaron al utilizar la C/N de 2.5. Por otro lado, los rendimientos de producción de nitrato (YNO_3^-) determinados indican que con ambas relaciones C/N, el amonio consumido fue transformado a nitrato, por lo que bajo las condiciones experimentales ensayadas es posible llevar a cabo la nitrificación. Una vez más, los mayores YNO_3^- se observaron con la C/N de 2.5, por lo que esta relación es la más adecuada para realizar el proceso nitrificante.

Tabla 7. Velocidades específicas del consumo de amonio ($q\text{NH}_4^+$), producción de nitrato ($q\text{NO}_3^-$) y rendimientos de producción de nitrato (YNO_3^-) obtenidos con las dos C/N (1.75, 2.5) y diferentes concentraciones de amonio.

		Concentración (N- NH_4^+ /L)				
C/N	Velocidades específicas	100	200	300	400	500
1.75	$q\text{NH}_4^+$	0.009±0.0002	0.019±0.0005	0.028±0.0016	0.036±0.0013	0.043±0.0011
	$q\text{NO}_3^-$	0.017±0.0006	0.025±0.0003	0.041±0.0068	0.046±0.0016	0.052±0.0001
	YNO_3^-	0.98±0.0013	0.98±0.0011	0.70±0.0059	0.53±0.0017	0.38±0.0082
2.5	$q\text{NH}_4^+$	0.011±0.0007	0.024±0.0028	0.029±0.0022	0.036±0.0011	0.035±0.0005
	$q\text{NO}_3^-$	0.036±0.0035	0.039±0.0007	0.056±0.0003	0.087±0.0007	0.070±0.0010
	YNO_3^-	1.01±0.0002	0.98±0.0012	0.99±0.0049	1.0±0.0001	1.0±0.0001

Rendimiento de producción de nitrato (YNO_3^-)=mg N- NO_3^- Producido/mg N- NH_4^+ Consumido; Velocidad específica de consumo de amonio ($q\text{NH}_4^+$)=mg N- NH_4^+ / mg proteína h; Velocidad específica de producción de nitrato ($q\text{NO}_3^-$)=mg N- NO_3^- / mg proteína h.

Una vez identificada la C/N de 2.5 como la adecuada para realizar la nitrificación, se realizaron ensayos con las diferentes concentraciones de amonio (100, 200, 300, 400,500 mg NH_4^+ /L) a fin de determinar el tiempo en el que se obtuvieran las máximas eficiencias de eliminación y rendimientos de conversión. En la Figura 12 se muestran los resultados obtenidos. Se encontró que con 100 y 200 mg NH_4^+ /L, en un tiempo de 12 h la ENH_4^+ alcanza valores cercanos al 100%, indicando que el consumo de amonio es total.

En cambio, cuando se utiliza una concentración 300 y 400 mg NH_4^+ /L, la ENH_4^+ alcanza valores arriba del 95% en 24 h. Cuando se realiza el ensayo con una concentración de 500 mg NH_4^+ /L, se requiere un tiempo mayor, correspondiente a 40 h para obtener un consumo de amonio total. Al igual que en los ensayos anteriores, los valores de pH se mantuvieron en un intervalo de 6.6-8.5.

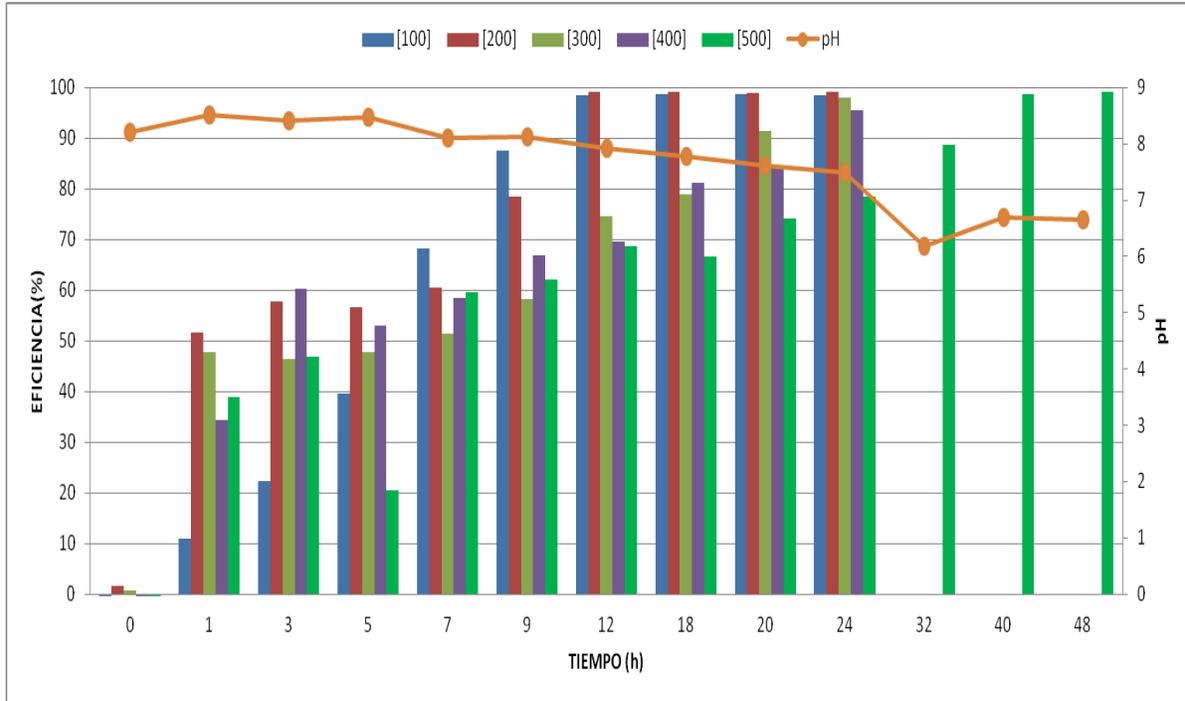


Figura 12. Eficiencias de eliminación de amonio durante el proceso nitrificante con diferentes concentraciones de amonio y C/N de 2.5.

Las velocidades específicas del consumo de amonio ($q\text{NH}_4^+$) y rendimientos nitrificantes calculados en estos ensayos a las 24 horas se muestran en la tabla 8. Se encontró que la $q\text{NO}_3^-$ se incrementa al aumentar la concentración de amonio, indicando que se continúa presentando una reacción de primer orden. Los rendimientos de producción de nitrato (YNO_3^-) indican que en todos los casos el amonio consumido fue completamente oxidado a nitrato, por lo que bajo las condiciones experimentales ensayadas y con una relación C/N de 2.5 es posible llevar a cabo la nitrificación de manera eficiente y completa.

Tabla 8. Velocidades específicas de consumo de amonio ($q\text{NH}_4^+$) y rendimientos de producción de nitrato (YNO_3^-) obtenidos con C/N 2.5 y diferentes concentraciones de amonio.

Concentración (mg N-NH ₄ ⁺ /L)					
Velocidades específicas	100	200	300	400	500
qNH ₄ ⁺	0.044±0.0025	0.039±0.0020	0.041±0.0011	0.052±0.0109	0.041±0.0022
qNO ₃ ⁻	0.039±0.0097	0.053±0.0027	0.142±0.0024	0.094±0.0029	0.074±0.0010
Rendimiento					
YNO ₃ ⁻	0.98	0.98	1.0	1.0	1.0

Rendimiento de producción de nitrato= YNO_3^- (mg N- NO₃⁻ Producido/ mg N-NH₄⁺ Consumido); velocidad específica de consumo de amonio= qNH_4^+ (mg N-NH₄⁺ / mg proteína h); velocidad específica de producción de nitrato = qNO_3^- (mg N-NO₃⁻ / mg proteína h).

9.3 Ensayos en lote con diferentes concentraciones de amonio en presencia de 5 mg C-2-CF/L.

La figura 13 muestra que en los ensayos con una concentración inicial de 100 N-NH₄⁺/L y adicionados con 2-CF, en 24 h de cultivo el consumo de amonio es nulo, mientras que en los ensayos adicionados con 200 y 300 N-NH₄⁺/L, en el mismo intervalo de tiempo se alcanzan eficiencias de consumo de amonio entre el 15 y 25%, indicando que con estas concentraciones de amonio, aunque no de manera completa, el lodo nitrificante sí es capaz de consumir amonio aun en presencia de 2-CF. Estos resultados coinciden con lo reportado por Pérez-Alfaro (2015), donde se indica que con 100 mg N-NH₄⁺/L de amonio y en presencia de 5 mg C-2-CF/L, no se lleva a cabo la nitrificación, mientras que con concentraciones de 200 y 300 mg N-NH₄⁺ /L , se alcanzan consumos de amonio entre el 20 y 27% en un tiempo de 48 h. Asimismo, Martínez-Hernández y col. (2011) ha reportado que la presencia de 5 mg C-2-CF/L, inhibe hasta un 95% de la actividad nitrificante, aunque es posible recuperar una parte de esta actividad. Sin embargo, bajo las condiciones experimentales en ninguno de los ensayos se observó producción de nitrito o nitrato. De hecho, los rendimientos de producción de nitrato (YNO₃⁻) obtenidos indican que a las 24 horas de cultivo, el amonio consumido no fue transformado a nitrato. Es posible que se requiera de más tiempo de experimentación para obtener la formación de nitrato.

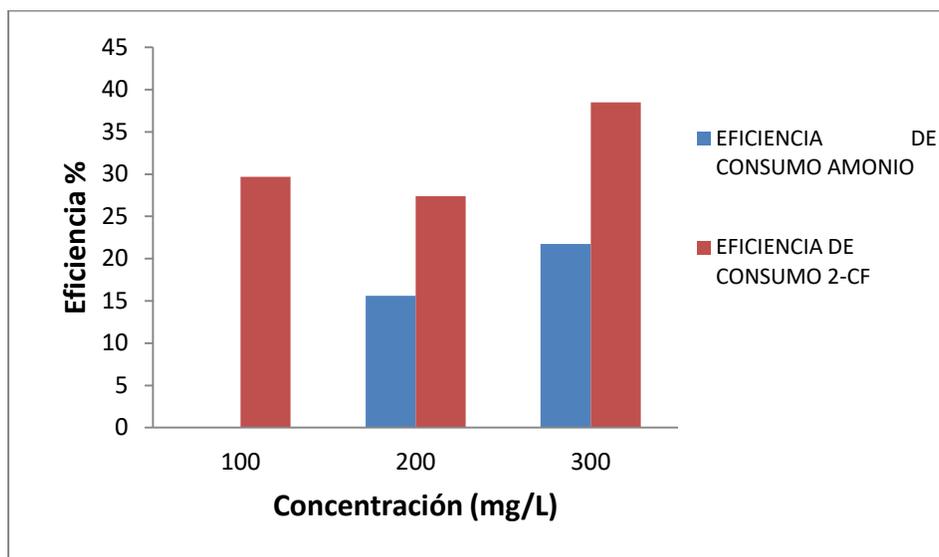


Figura 13. Eficiencias de consumo de 2-CF durante el proceso nitrificante con diferentes concentraciones de amonio y 5 mg C-2-CF/L tras 24 h de cultivo.

Con respecto al comportamiento cinético, se encontró que en los ensayos con 100 mg N-NH₄⁺/L, la adición de 2-CF ocasiona una inhibición completa de la nitrificación (Tabla 9), que puede ser atribuible a un efecto directo de este compuesto sobre las enzimas nitrificantes, como lo sugieren Kenner y Arp. (1994), quienes observaron en ensayos con *Nitrosomonas europea*, que al aumentar la concentración de materia orgánica, la oxidación de amonio resultaba afectada. Los autores propusieron una inhibición competitiva, es decir, una competencia entre el amonio y la materia orgánica por el sitio activo de la enzima amonio mono oxigenasa (AMO), encargada de la oxidación del amonio, o bien, que la materia orgánica se une al sitio activo de la enzima, cambiando su configuración espacial y altera su capacidad oxidativa. En la Tabla 9 se muestra que al utilizar una concentración de 200 mg N-NH₄⁺/L, se logró un aumento en la qNH₄⁺ de 0 a 0.0075 mg N-NH₄⁺/mg proteína h con respecto a la concentración de 100 mg N-NH₄⁺/L. La qNH₄⁺ volvió a aumentar en el ensayo con 300 mg N-NH₄⁺/L. Estos resultados indican que el efecto inhibitorio del 2-CF sobre la velocidad de consumo de amonio se reduce al incrementar la concentración de amonio a 200 y 300 mg N-NH₄⁺/L, puesto que la disminución en la qNH₄⁺ fue del 68 y 52% respectivamente. Bajo estas condiciones, las velocidades específicas de consumo de 2-CF se mantuvieron constantes.

TABLA 9. Velocidades específicas del consumo de amonio (qNH₄⁺), 2-CF (q2CF) y rendimientos de producción de nitrato (YNO₃⁻) obtenidos a diferentes concentraciones de amonio.

Concentración (mg N-NH₄⁺/L)			
Velocidades específicas	100	200	300
$q_{NH_4^+}$	0	0.0075±0.0021	0.0139±0.0014
	(↓ 100%)	(↓ 68%)	(↓ 52%)
q_{2CF}	0.0003	0.0003	0.0004
Rendimiento			
$Y_{NO_3^-}$	0	0	0

Rendimiento de producción de nitrato ($Y_{NO_3^-}$)=mg N- NO₃⁻ Producido/mg N-NH₄⁺ Consumido; velocidad de consumo de amonio ($q_{NH_4^+}$)=mg N-NH₄⁺ / mg proteína h; velocidad de consumo (q_{2CF})= mg C-2-CF / mg proteína h.

9.4 Ensayos en el reactor SBR

9.5 Ensayos abióticos en el reactor SBR

Los ensayos indicaron que bajo aireación continua, durante un tiempo de 3 días las pérdidas de 2-CF por arrastre fueron del 3-17%, mientras que a los 6 días se encontró una mayor pérdida, de entre 67 y 74%. Cuando se aplicó una aireación intermitente, se presentó una pérdida por arrastre del 1 al 5% a los 3 días. A partir de 4 y hasta 6 días, la pérdida fue entre 16 y 49%. En la Tabla 10, se muestra el % de pérdida diaria de 2-CF. Martínez-Jardines (2013) reportó que en ensayos abióticos realizados en un reactor SBR con una concentración de 20 mg C-2CF/L y una aireación intermitente con O₂ puro, el 96.4% del C-2-CF se mantuvo en el cultivo después de 6 días de experimentación. Flores Reyes (2015) reportó también que en ensayos abióticos en reactores SBR en presencia de 5 y 10 mg/L de 2-CF y utilizando aireación intermitente con O₂ (durante 8 horas, aireando al inicio y cada 4 horas), la pérdida de 2-CF por arrastre no fue significativa ya que fue de 5.66% y 0.73%, respectivamente.

Así pues, en el presente trabajo se concluyó que el mejor tipo de aireación para realizar el proceso nitrificante en reactores SBR fue con aireación intermitente.

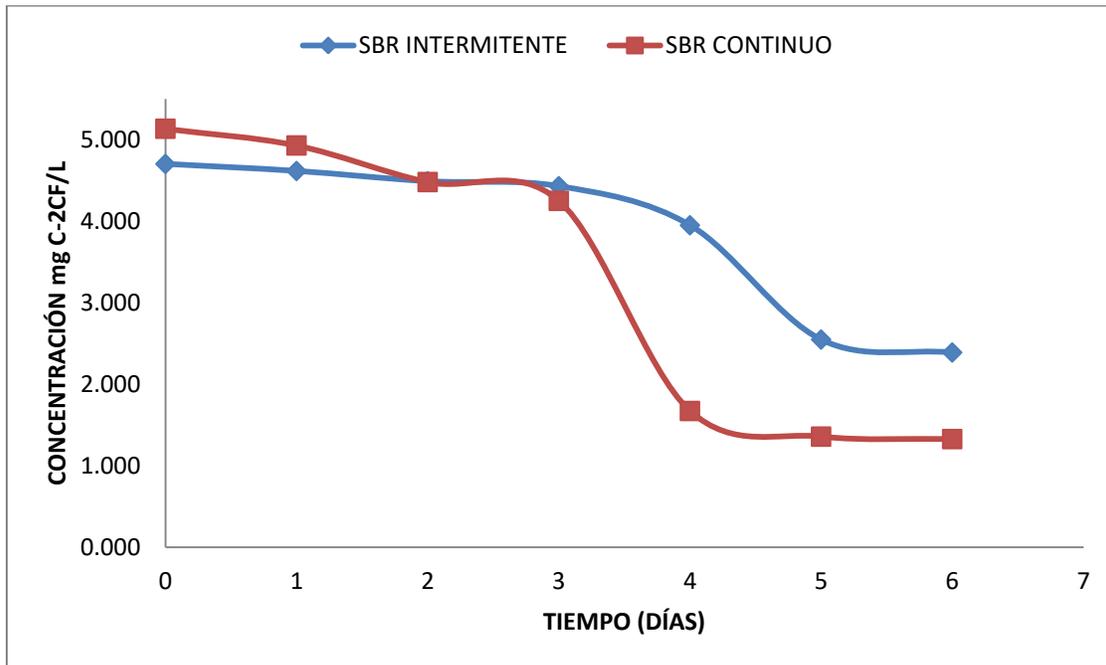


Figura 14. Pérdida de 2-CF en condiciones abióticas en reactores SBR.

TABLA 10. Porcentaje de pérdida de 2-CF con diferentes tipos de aireación.

DÍAS	1	2	3	4	5	6
%Pérdida (Aireación continuo)	3.90	12.70	17.20	67.40	73.50	74.10
% Pérdida (Aireación intermitente)	1.80	4.50	5.80	16.00	45.80	49.10

9.6 Estabilización de la nitrificación control en SBR: 100 -200mg N-NH₄⁺/L.

En la figura 15 se muestran los perfiles de consumo de amonio y producción de nitrato en el ciclo 1 y 5 de operación del reactor SBR alimentado con 100 mg N-NH₄⁺/L. Se determinó el consumo total de amonio en un tiempo de 18 horas, observando también una acumulación transitoria de nitrito y una producción máxima de nitrato a las 20 h. Este comportamiento también se observó con Silva (2011), Martínez (2013) y Salas (2014), quienes utilizando una concentración de 100 mg N-NH₄⁺/L en reactores SBR reportan consumos totales de N-NH₄⁺ al final de los ciclos de operación en tiempos de 12 y 48 h, respectivamente.

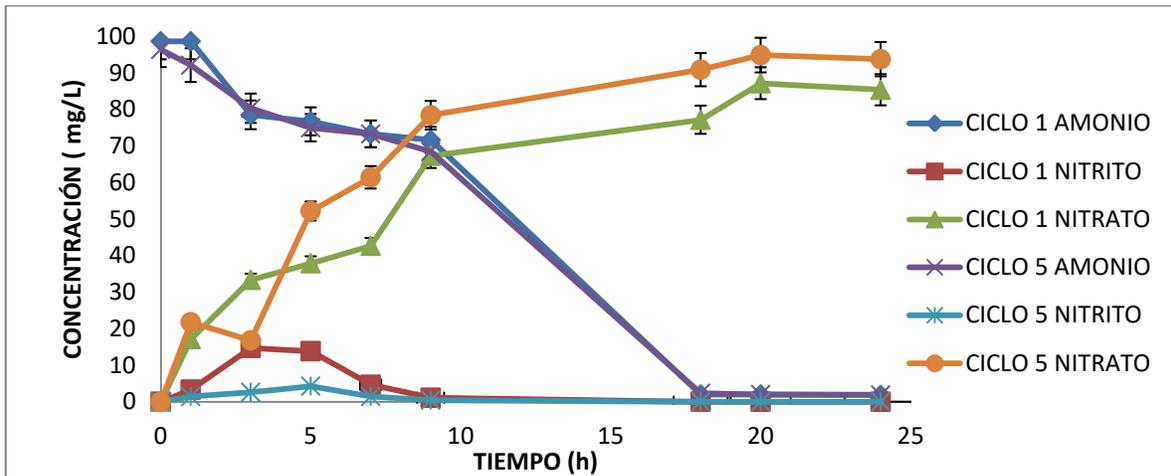


Figura 15. Perfil del consumo amonio y producción de nitrato en el reactor nitrificante SBR en el ciclo 1 y 5 de operación.

Al final de las 24 horas, la eficiencia de consumo de amonio en ambos ciclos (1 y 5) fue de 98% con un rendimiento de producción de nitrato de 0.97. Las velocidades de consumo y producción en ambos ciclos son muy parecidas como se muestra en la Tabla 11. Estos resultados indican que después de 5 ciclos de operación se alcanzó una estabilidad en el proceso nitrificante y coinciden con lo reportado por Moreno-Andrade y Buitrón (2004), quienes indican que en reactores SBR, al incrementarse el número de ciclos, las velocidades específicas de consumo y producción aumentan hasta llegar a un punto en el cual no sufren cambios significativos, es decir, se puede llegar a un estado estacionario.

Tabla 11. Eficiencias de consumo de amonio, rendimientos de nitrato y velocidades específicas obtenidas en los ciclos 1 y 5 de operación de los reactores nitrificantes control.

Concentración (N-NH ₄ ⁺ /l)	100 (24 h)	100
# de ciclo	1	5
ENH ₄ ⁺	98.08	98.89
qNH ₄ ⁺	0.015	0.013
YNO ₃ ⁻	0.953	0.991
qNO ₃ ⁻	0.011	0.011

Eficiencia de consumo amonio (ENH₄⁺)=%; rendimiento de producción de nitrato (YNO₃⁻)=mg N- NO₃⁻ Producido/mg N-NH₄⁺ Consumido; velocidad de consumo de amonio (qNH₄⁺)= mg N-NH₄⁺ / mg proteína h; velocidad de producción de nitrato (qNO₃⁻)=mg N-NO₃⁻ / mg proteína h.

En la figura 16 se muestran los perfiles de consumo de amonio y producción de nitrato en los ciclos 6 y 11 de operación, cuando la concentración inicial de amonio se aumentó a 200 mg N-NH₄⁺/L. El consumo total de amonio se realizó en un tiempo de 48 horas, observando también una acumulación transitoria de nitrito y una producción máxima de nitrato a las 48 h. Después de 5 ciclos de operación, en el ciclo 11, se requirió un tiempo de 18 horas para consumir totalmente al amonio, no se observó nitrito acumulado y la producción máxima de nitrato se presentó a las 48 h. Estos resultados coinciden con lo reportado por Texier y Gómez (2007) quienes indican que los tiempos de reacción disminuyen conforme transcurre el número de ciclos.

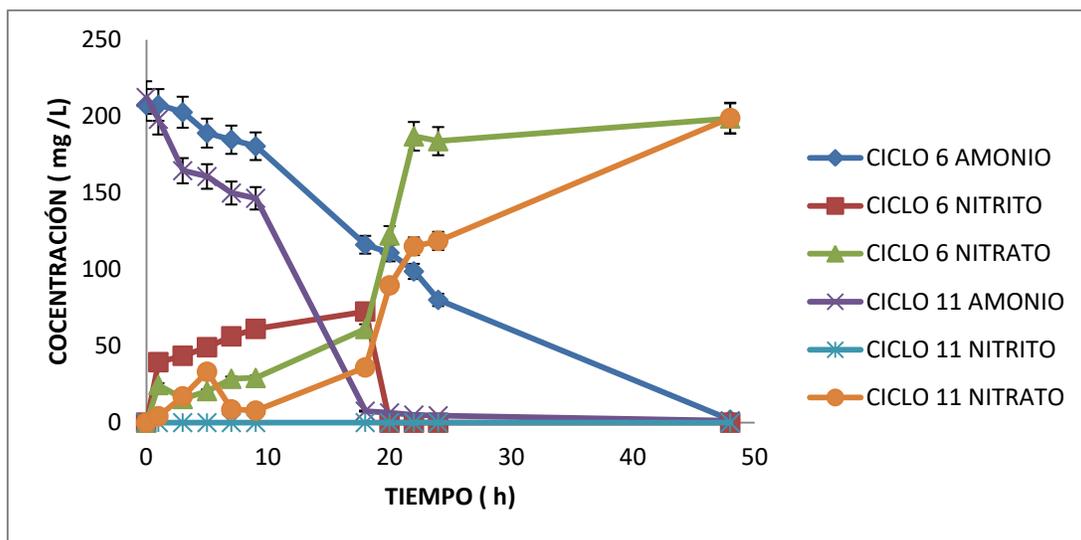


Figura 16. Perfil del consumo amonio y producción de nitratos en el reactor nitrificante SBR en el ciclo 6 y 11 de operación.

Al final de las 48 horas, la eficiencia de consumo de amonio en los ciclos 6 y 11 fue de 99 % y el rendimiento de producción de nitrato de 0.94 (Tabla 12). Se observó un aumento en las velocidades de consumo de amonio de 0.013 a 0.030 mg N-NH₄⁺/mg proteína h y de producción de nitrato de 0.012 a 0.014 mg N-NO₃⁻/mg proteína h. Respecto a lo observado es posible concluir que se logró estabilizar el proceso de nitrificación en reactores SBR con una concentración de 200 mg N-NH₄⁺/L.

Tabla 12. Eficiencias de consumo de amonio, rendimientos de nitrato y velocidades específicas a lo largo de los ciclos de operación de los reactores nitrificantes control.

	Concentración (N-NH ₄ ⁺ /L)	
	200 (48 h)	200(48 h)
# de ciclo	6	11
ENH ₄ ⁺	99	99
qNH ₄ ⁺	0.013	0.030
YNO ₃ ⁻	0.941	0.950
qNO ₃ ⁻	0.012	0.014

Eficiencia de consumo amonio (ENH₄⁺) = %; rendimiento de producción de nitrato (YNO₃⁻) = mg N- NO₃⁻ Producido / mg N-NH₄⁺ Consumido; velocidad de consumo de amonio (qNH₄⁺) = mg N-NH₄⁺ / mg proteína h; velocidad de producción de nitrato (qNO₃⁻) = mg N-NO₃⁻ / mg proteína h.

9.7 Nitrificación en reactores SBR en presencia de 2-CF.

En la figura 17 se muestra el perfil de consumo de amonio desde el ciclo 12 y hasta el 17, cuando se le adicionaron 5 mg C-2-CF/L al reactor SBR. Se determinó el consumo total de 200 mg N-NH₄⁺/L en un tiempo de 144 horas, sin embargo, durante este tiempo no se observó producción de nitrito ni de nitrato. Estos resultados son semejantes a los reportados por Flores-Reyes (2015), quien encontró que en el primer ciclo de operación en un SBR nitrificante, alimentado con 100 mg N-NH₄⁺/L y 5 mg C-2CF/L, hubo una disminución de alrededor del 35% en la concentración de amonio en las primeras 10 horas de cultivo, sin embargo, no se detectó la formación de nitrito o nitrato. El autor menciona que este comportamiento se mantuvo sin cambio después de 72 horas. En el presente trabajo, cinco ciclos después, en el ciclo 17, se observó el consumo total de amonio en 144 horas, se presentó una acumulación transitoria de nitrito y la producción de nitrato al final de 168 horas de reacción biológica. Esto es, fue posible llevar a cabo el consumo de amonio y su oxidación hasta nitrato. El hecho de que 5 ciclos después, en el ciclo 17 se observara una nitrificación prácticamente completa (Tabla 13), se puede atribuir a la utilización de reactores SBR, que promueve el incremento en la actividad metabólica de los lodos depuradores, como ha sido previamente reportado por Texier y col. (2006), Beristain-Montiel y col. (2011), Moreno-Andrade y Buitrón (2012) y Silva y col. (2014).

A pesar de que en el ciclo 1 y durante el tiempo de cultivo no se llevó a cabo la oxidación del amonio consumido, sí hubo un consumo total del 2-CF en un tiempo de 72 horas. Es importante recordar que el reactor fue sellado herméticamente y que en la trampa de

agua habilitada a la salida del aire no se detectó la presencia de 2-CF, por lo que puede decirse que no se presentó pérdida de este compuesto por arrastre. De esta forma, su desaparición estuvo asociada con su consumo mediante el proceso biológico nitrificante.

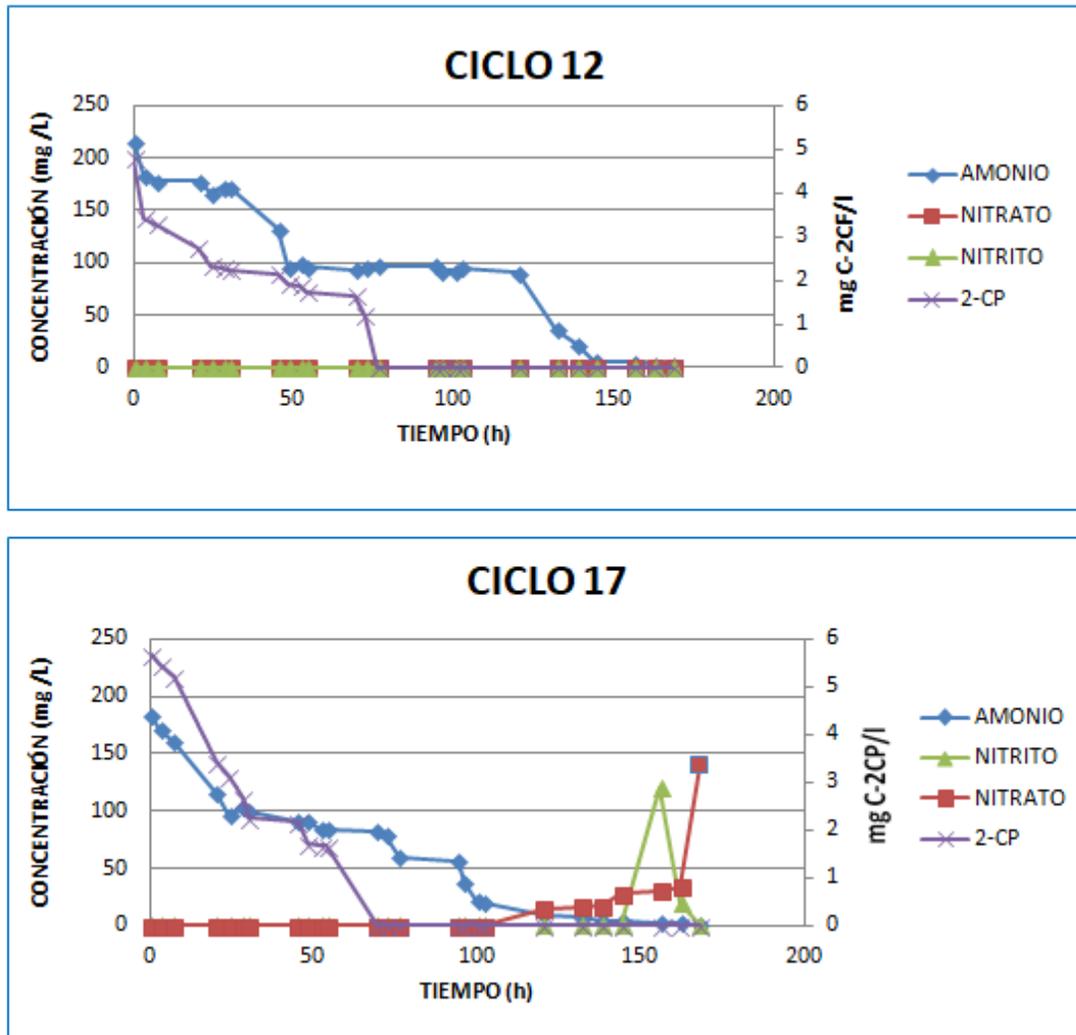


Figura 17. Perfil del consumo amonio, C- 2-CF y producción de nitratos en el reactor nitrificante SBR en el ciclo 12 y 17de operación.

Aunque en el ensayo en presencia de 2-CF se mantuvo una eficiencia de consumo de amonio similar a la obtenida en el ensayo en ausencia del compuesto clorado y cercana al 100%, las velocidades de consumo de amonio disminuyeron un 90% con respecto al ensayo control sin 2-CF (Tabla 13). Estos resultados son similares a los encontrados por Flores-Reyes (2015), quien en el ciclo 1 de operación en presencia de 5 mg C-2CF/L y 100 mg N-NH₄⁺/L, observó una disminución cercana al 89% en la qNH₄⁺, indicando que el 2-CF inhibió de forma significativa el proceso nitrificante en comparación con los ensayos control. Para el ciclo 17 la velocidad de consumo de amonio permaneció prácticamente constante en 0.003 mg N-NH₄⁺/ mg proteína h, mientras que es importante mencionar

que hubo una recuperación en la velocidad de producción de nitrato, puesto que se incrementó de 0 a 0.014 mg N-NO₃⁻/mg proteína h. También es destacable el aumento de la velocidad de consumo de 2-CF a lo largo de los ciclos de operación (Tabla 13). Se ha reportado que con el uso de reactores SBR es posible estabilizar los procesos respiratorios y obtener mejoras en la velocidad de consumo de los compuestos alimentados, de manera que la actividad metabólica se mejora a lo largo de la operación (Texier y col., 2006; Beristain-Montiel y col., 2011; Moreno-Andrade y Buitrón 2012; Silva y col., 2014), así pues, los resultados obtenidos en este trabajo podrían ser el resultado de una adaptación y estabilización del proceso nitrificante en presencia de 2-CF. Sin embargo, también se ha propuesto que los incrementos en las velocidades específicas podrían ser debidas a una selección de cepas microbianas capaces de adaptarse al ambiente establecido en el reactor SBR (Irvine y col., 1997; Ketchum, 1997).

Tabla 13. Eficiencias de consumo de amonio, rendimientos de nitrato y velocidades específicas a lo largo de los ciclos de operación de los reactores nitrificantes.

Concentración (N-NH₄/L)	200 Ausencia 2-CF	200 (168 h) Presencia 2-CF	200 (168 h) Presencia 2-CF
# de ciclo	11	12	17
ENH₄⁺	99	98	99
qNH₄	0.030	0.003	0.003
YNO₃	0.94	0	0.77
qNO₃	0.014	0	0.014
E2-CF	0	100	100
q2-CF	0	0.0001	0.0002

Eficiencia de consumo (ENH₄⁺-E2-CF) =%; rendimiento de producción de nitrato (YNO₃⁻)=mg N- NO₃⁻ Producido/mg N-NH₄⁺ Consumido; velocidad de consumo de amonio (qNH₄⁺)= mg N-NH₄⁺ / mg proteína h; velocidad de consumo (q2CF)= mg C-2-CF / mg proteína h; velocidad de producción de nitrato (qNO₃⁻)=mg N-NO₃⁻ / mg proteína h.

Nitrificación en reactores SBR en presencia de 2-CF y 300 mg N-NH₄/L

En la figura 18, se muestra el perfil de consumo de amonio, producción de nitrito y nitrato cuando en el ciclo 18 y 22 se le adicionaron 5 mg C-2-CF/L al reactor SBR y se incrementó a 300 mg NH₄⁺/L. Bajo estas condiciones, se determinó el consumo total de amonio en un tiempo de 168 horas. No se observó acumulación de nitrito y todo el amonio consumido fue transformado a nitrato en un tiempo de 168 horas, indicando una nitrificación completa. Asimismo, se determinó el consumo total del 2-CF en un tiempo de 96 horas.

Pérez-Alfaro (2015) reporta que en ensayos en lote con 300 mg NH_4^+ /L y en presencia de 5 mg C-2-CF/L, se obtuvo en 48 horas, un consumo del 20% de amonio y una nitrificación parcial, puesto que se detectó nitrito y nitrato. La mayor eficiencia de consumo de amonio obtenida en este trabajo y su completa oxidación puede ser atribuida a un mejor desempeño metabólico de los lodos nitrificantes asociados con el modo de operación del reactor SBR. Después de 5 ciclos de operación en el ciclo 28, se requirió un tiempo menor para consumir el amonio alimentado, puesto que el consumo total de este compuesto se encontró a las 68 horas, no se detectó nitrito y la máxima producción de nitrato se observó a las 168 horas. Esto es, el proceso nitrificante se realizó de manera eficiente y completa. El consumo total del 2-CF también se registró en un tiempo de 68 horas.

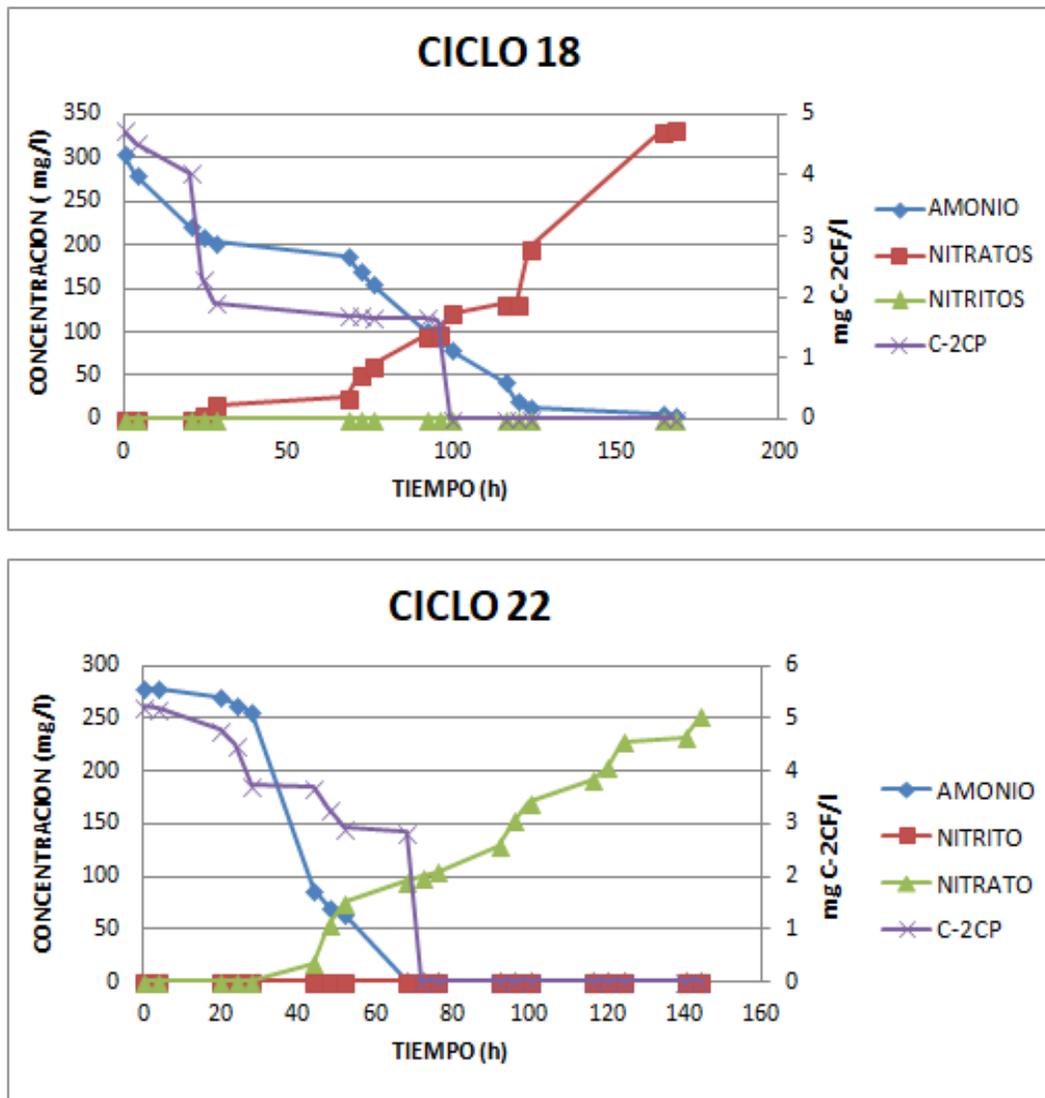


Figura 18. Perfil del consumo amonio, 2-CF y producción de nitratos en el reactor nitrificante SBR en el ciclo 18 y 22 de operación.

En términos cinéticos, al aumentar en el ciclo 18 la concentración de amonio a 300 mg N-NH₄⁺/L en presencia de 2-CF, el proceso nitrificante presentó una inhibición del 81% en la velocidad de consumo de amonio y de 72% en la velocidad de producción de nitrato. Sin embargo, bajo estas condiciones al transcurrir 5 ciclos de operación, aunque la inhibición en el proceso nitrificante se mantuvo, ésta fue menor, puesto que, en comparación con el ensayo nitrificante control en ausencia de 2-CF y 200 mg N-NH₄⁺/L (ciclo 11), la disminución en las velocidades específicas de consumo de amonio y producción de nitrato solo fue de 57 y 60% respectivamente. Texier y Gómez (2007) observaron que en un reactor nitrificante de lotes secuenciados (SBR), la alimentación con *p*-cresol provocó una inhibición en el proceso nitrificante, y que el porcentaje de inhibición en la nitrificación disminuyó significativamente conforme aumentó el número de ciclos de operación.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que con el uso de reactores SBR y al aumentar la concentración inicial de amonio es posible disminuir la inhibición ocasionada por el 2-CF sobre la nitrificación. De hecho, en el ciclo 18, al aumentar la concentración de amonio a 300 mg N-NH₄⁺/L, a pesar de la presencia de 2-CF, la velocidad de consumo de amonio presentó un incremento de 125%, mientras que la velocidad de producción de nitrato se incrementó en un 25%. Estos resultados coinciden con lo reportado por Moreno y Buitrón (2004), quienes observaron que al utilizar un reactor SBR y un lodo aclimatado a 4-clorofenol (4-CF), los tiempos de consumo de este compuesto disminuyeron a lo largo de los ciclos de operación. También coinciden con los resultados obtenidos por Silva y col. (2014), que observaron que al utilizar reactores SBR con lodos nitrificantes alimentados con amonio y *p*-cresol, las velocidades de consumo de *p*-cresol aumentaron de 30 a 106 mg C-*p*-cresol/ (g SSV h) después de 120 ciclos; sugiriendo que la operación mediante ciclos consecutivos en los reactores SBR, permitieron el incremento de la capacidad metabólica de los lodos para oxidar el compuesto fenólico. Así pues, en el presente trabajo, con una relación carbono/nitrógeno (C/N) de 2.5, se encontró que al aumentar la concentración de amonio y al paso de los ciclos operación, se disminuye el efecto inhibitorio del C-2CF sobre la nitrificación, puesto que las velocidades de reacción ($q_{NH_4^+}$, $q_{NO_3^-}$ y q_{2CF}) van en aumento.

Tabla 14. Eficiencias de consumo de amonio, rendimientos de nitrato y velocidades especificas a lo largo de los ciclos de operación de los reactores nitrificantes control.

Concentración (N-NH ₄ /l)	300 Presencia 2-CF	300 (168 h) Presencia 2-CF
# de ciclo	18	22
ENH ₄ ⁺	99	99
qNH ₄ ⁺	0.0057	0.0128
YNO ₃ ⁻	1	0.90
qNO ₃ ⁻	0.0040	0.0055
E2-CF	100	100
q2CF	0.00008	0.0001

Eficiencia de consumo (ENH₄⁺-E2-CF)= %; rendimiento de producción de nitrato (YNO₃⁻)=mg N- NO₃⁻ Producido/mg N-NH₄⁺ Consumido; velocidad de consumo de amonio (qNH₄⁺)= mg N-NH₄⁺ / mg proteína h; velocidad de consumo (q2CF)= mg C-2-CF / mg proteína h; velocidad de producción de nitrato (qNO₃⁻)=mg N-NO₃⁻ / mg proteína h.

10 Conclusiones.

- Se logró la estabilización en estado estacionario de un reactor nitrificante alimentado en continuo a fin de obtener el inóculo para realizar los ensayos en lote y operar reactores SBR nitrificantes.
- Se determinó mediante ensayos en lote, que la nitrificación se realiza completa y eficientemente con concentraciones de amonio entre 100 y 500 mg N-NH₄⁺/L a una relación C/N de 2.5.
- Se instaló y operó un reactor SBR donde se obtuvo la estabilidad fisiológica y cinética del proceso nitrificante de referencia a concentraciones de 100 y 200 mg NH₄⁺/L, obteniendo rendimientos de formación de nitrato y eficiencias de consumo de amonio cercanos a 1 y a 100% respectivamente.
- Es posible en reactores SBR, disminuir el efecto inhibitorio del C-2CF sobre la nitrificación al utilizar 200 y 300 mg N-NH₄⁺/L, puesto que las velocidades específicas qNH₄⁺, qNO₃⁻ y q2CF, van en aumento al paso de los ciclos.
- Es posible eliminar completa y simultáneamente hasta 300 mg N-NH₄⁺/L y 5 mg C-2-CF/L en reactores SBR después de 10 ciclos de operación y en solo 168 h.

11 Recomendaciones.

Como se mostró en este trabajo, al utilizar una concentración de 200 y 300 mg NH_4^+ /L, se logró disminuir el efecto inhibitorio de 5 mg 2-CF /L sobre el proceso nitrificante y obtener el consumo simultaneo de amonio y 2-CF. Sería de gran interés, continuar ensayos en las mismas condiciones de este estudio, con lodos sin exposición previa a compuestos orgánicos y la utilización de reactores SBR, pero ahora incrementando la concentración de amonio y 2-CF, de forma que se pueda evaluar si se sigue favoreciendo tanto el proceso nitrificante como el consumo de 2-CF. También se podría estudiar qué tipo de bacterias realizan el consumo del 2-CF, es decir, bacterias heterótrofas y/o autótrofas.

12 Bibliografía

- Alemayehu y col., 2001. Use of Sequencing Batch Reactor for Biological Denitrification of High Nitrate-Containing Water. *Journal of Environmental Engineering* Vol. **127**(3): 273-278.
- Annachhatre A.P. y Gheewala S.H (1996). Biodegradation of chlorinated phenolic compounds. *Biotechnol. Adv.* **14**: 35-56.
- Anthonisen A.C., Loehr R.C., Prakasam T.B.S. y Srinath E.G. (1976). Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *J. Wat. Pollut. Control. Fed.* **48**: 835 – 852.
- ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry (2003). Comprehensive Environmental Response, Compensation, and Liability Act (CERCLA) priority list of hazardous substances. Available from: <<http://www.atsdr.cdc.gov/cercla/05list.html>>.
- Bersitain-Montiel L. M. (2011). Estudio fisiológico y poblacional de la metanogénesis del 2-clorofenol (2-CP) en un reactor anaerobio de lote secuenciado (ASBR). Tesis de doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Bernet N. and Spérandio M. (2009). Principles of nitrifying processes. En: *Environmental technologies to treat nitrogen pollution*. 1ra edición. Editorial: IWA Publishing, London. pp. 23-39.
- Borzelleca J. F., J.R. Hayes, L.W. Condie y J.W. Egle. Acute toxicity of monochlorophenols, dichlorophenols and pentachlorophenol in the mouse (1985). *Toxicology Letters*: **29**: 39-42.
- Buitrón G., Soto G., Vite G. and Moreno J. (2001). Strategies to enhance the biodegradation of toxic compounds using discontinuous processes. *Water Science and Technology*. **43**(3): 283-290.
- Camargo J. A. y Alonso A. (2006). Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: a global assessment. *Environment International* **32** (2006), 831-849.
- Cantar y col., 1991. Degradation of chlorinated aromatic compounds. *Microbiological Sciences*, **4**, 300-303.
- EPA (Environmental Protection Agency). (1987). Design manual: phosphorus removal. EPA/625/1-87/001. Cincinnati, OH. U.S.A.
- Farrell and Brid (1990). Degradation of mono-chlorophenols by a mixed microbial community via *meta*- cleavage pathway *Biodegradation* **10**, 353–362.

- Farrel A. y Brid Q. (1999). Degradation of mono-chlorophenols by mixed microbial community via a *meta*-cleavage pathway, *Biodegradation*, **10**:353-362.
- Ferrara de G., Ramírez A. (2010). Influencia de la relación C/N en la remoción de nitrógeno usando un sistema combinado de reactores por carga secuencial. Revista de la Facultad de Ingeniería U.C.V. **25**:4 pp. 41–51.
- Flores Reyes (2015). Evaluación de la nitrificación en un reactor SBR en presencia de 2-clorofenol y una alta concentración de amonio. Tesis de especialidad. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Garrido J.M., Omil F., Arrojo B., Méndez R. And Lema J.M. (2001). Carbon and nitrogen removal from a wastewater of an industrial dairy laboratory with a coupled anaerobic filter-sequencing batch reactor system. *Wat. Sci. Tech.*, **43(3)**: 249-256.
- Gerardi M.H. (2002). Nitrification and Denitrification in the Activated Sludge Process. Editorial: Wiley-Interscience, John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Gieseke A., Tarre S., Green M., and Beer D. (2006). Nitrification in a biofilm at low pH values: Role of in situ microenvironments and acid tolerance. *Applied and Environmental Microbiology*. **72(6)**: 4283-4292.
- Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.A., Stanley J.T. y Williams S.T. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9na Edición. Editorial: Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia. pp 447-450.
- Inui T., Tanaka Y., Okayasu Y. and Tanaka H. (2002). Application of toxicity monitor using nitrifying bacteria biosensor to sewerage systems. *Water Science and technology*. **45**, 271-278.
- Irvine R., Wilderer P., Flemming H. (1997). Controlled unsteady state processes and technologies – an overview. *Water Science and technology*. **35(1)**: pp 1-10.
- Jensen H.L. (1950). Effect of organic compounds on *Nitrosomonas*. *Nature*. **165**: 968 - 974.
- Keener W. and Arp D. J. (1994) Transformation of aromatics compounds by *Nitrosomonas europaea*. *Applied and Environmental Microbiology*. **60**: 1914-1920.
- Ketchum J. (1997). Design and Physical Features of Sequencing Batch Reactors. *Water Science and technology*. **35(1)**: 11-18.
- Lee D., Jong M.P. (1999) Neural network modeling for on-line estimation of nutrient dynamics in a sequentially-operated batch reactor. *Journal of biotechnology*. **75**: 29-239.

- Lloyd H. Ketchum Jr. (1997). Design and physical features of sequencing batch reactors. *Water Science and technology*. **35(1)**: pp11-18.
- Madigan M., Martinko J. and Parker J. (2003). Brock Biología de los Microorganismos. 10ma edición. Editorial Pearson Prentice Hall. Madrid. pp 359-360.
- Majumder P.S., Gupta S.K. Removal of chlorophenols in sequential anaerobic-aerobic reactors, *Bioresour. Technol.* 98 (2007) 118–129
- Martinez-Hernandez S., Texier A-C., Cuervo-López F., Gomez J. (2011). 2-Chlorophenol and its effect on the nitrifying sludge, *J. Hazard.Mater.* **185**: 1592–1595.
- Martínez F. (2003). Sedimentabilidad de un lodo nitrificante en dos tipos de reactores y en presencia de material orgánica. Tesis doctoral. Laboratorio de Fisiología Microbiana, CBS Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México.
- Martínez M. (2013) Evaluación del efecto del 2-clorofenol en la nitrificación utilizando un reactor de lote secuenciado. Tesis de especialidad. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Martins AMP, van Loosdrecht MCM, Heijnen JJ. 2003. Effect of feeding pattern and storage on the sludge settleability under aerobic conditions. *Water Res* **37**: 2555-2570.
- Mohn W.W y Tiedje, J.M (1992) Microbial reductive dehalogenation. *Microbiology review* **56**:482-507.
- Monroy O., Fama G., Meraz M.; Montoya L. and Macarie H. (2000). Anaerobic digestion for wastewater treatment in México: State of the technology. *Water Research*. **36(4)**:1803-1816
- Monroy O., Galván A., Gómez E. y González A. (2006) Manejo sustentable del agua en el Distrito Federal, México En el SXXI, Editorial UAM-I.
- Moreno-Andrade I., y Buitrón G. (2004). Evolución en la actividad de los microorganismos en los procesos de aclimatación y desaclimatación al 4-clorofenol. XIV Congreso Nacional de la Federación Mexicana de Ingeniería Sanitaria y Ciencias Ambientales AC, Mazatlán, Sinaloa.
- Moreno-Andrade I., Buitrón G. Biodegradation of 4-methylaniline in a sequencing batch reactor. *Water Science & Technology* (2012) 1081 – 1086.
- Murat S., Genceli E. A., Taş R., Artan N. y Orhon D. (2002). Sequencing batch reactor treatment of tannery wastewater for carbon and nitrogen removal. *Wat. Sci. Technol.* **46(9)**: 219-227.

- Nava-Ramírez C., y González-Martínez S. (2000). Phosphorus uptake kinetics in a biofilm sequencing batch reactor. *Bioprocess Engineering*. **23**: 143-147.
- Obaja D., Macé S., Costa J., Mata-Alvarez. (2003). Nitrification, denitrification and biological phosphorus removal in piggery wastewater using a sequencing batch reactor. *Bioresource Technology*, **87**: 103-111.
- Pérez A. (2007). Evaluación del efecto del fenol en la nitrificación y sedimentabilidad de un lodo utilizando un reactor de lote secuenciado (SBR). Tesis de especialidad. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.
- Pérez J.E., Martínez F. and Cuervo-López F.M. (2008). Nitrification and phenol elimination: respiratory process and sludge settleability. Proceedings of 4th IWA Specialized Conference on Sequencing Batch Reactor Technology SBR. S. Michele a Ripa, Rome, Italy. 127-130.
- Pérez-Alfaro J. E. (2010). Efecto del 2-clorofenol sobre la nitrificación. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Pérez-Alfaro J. E., Buitrón G., Gómez J., Texier A-C. and Cuervo-López F. M. (2013). Kinetic and Physiological Evaluation of Ammonium and Nitrite Oxidation Processes in Presence of 2-Chlorophenol. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **169(3)**:990-1000
- Pérez-Alfaro J. E. (2015). Estudio fisiológico de la nitrificación en presencia de 2-clorofenol utilizando un consorcio nitrificante. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Prosser, J.I. (1989). Autrophic nitrification in bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* **30**. pp 125-18.1 .
- Salas, J. A. (2014) Oxidación de cresoles por un lodo nitrificante en un reactor de lotes secuenciados. Tesis de especialidad. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Sato H., Sasaki, Y., Nakamura Y., Okabe S., Suzuki T. (2005). Use of microelectrodes to investigate the effects of 2-chlorophenol on microbial activities in biofilms. *Wiley Interscience*. **91**, 133-137.
- Silva C. D., Gómez J., Houbron E., Cuervo-López F.M. and Texier A.-C.(2009). *p*-Cresol biotransformation by a nitrifying consortium. *Chemosphere* **75**, 1387-1391.
- Silva C.D., Gómez J., Beristain-Cardoso R. (2011). Simultaneous removal of 2-chlorophenol, phenol, *p*-cresol and *p*-hydroxybenzaldehyde under nitrifying conditions: Kinetic study. *Bioresource Technology*. **102**: 6464–6468.

- Silva C., Beristain-Montiel L., Cuervo-López F., Texier A. C. (2014) p-Cresol mineralization and bacterial population dynamics in a nitrifying sequential batch reactor. *Journal of Environmental Sciences* **26** (2014) 1885 – 1893.
- Schmidt L. M., Delfino J. J., Preston J. F., Laurent G. (1999) Biodegradation of low aqueous concentration pentachlorophenol (PCP) contaminated groundwater *Chemosphere* **38** (12), 2897-2912
- Shammas N.K. (1986). Interactions of temperature, pH and biomass on the nitrification process. *Journal. Water Pollution Control Federation.* **58**(1): 52-59.
- Smith, J.A., Novak, J.T. (1987). Biodegradation of chlorinated phenols in subsurface soils. *Water Air Soil Pollut.* **33**:29–42.
- Takai T., Hirata A., Yamauchi K. and Inamori Y. (1997). Effects of temperature and volatile fatty acids on nitrification-denitrification activity in small- scale anaerobic - aerobic recirculation biofilm process. *Water Sci. and Technology.* **35**, 101-108
- Texier A-C. and Gomez J. (2002). Tolerance of nitrifying sludge to *p*-cresol. *Biotechnol. Lett.* **24**, 321-324.
- Texier A. C., Gómez J. (2006) Simultaneous nitrification and *p*-cresol oxidation in a nitrifying sequencing batch reactor. *Water Research* **41** (2007) 315 – 322.
- Texier A-C. and Gomez J. (2007). Simultaneous nitrification and *p*-cresol oxidation in a nitrifying sequencing batch reactor. *Wat. Res.* **41**, 315-322.
- Watson S.W., Bock E., Koops H.P. and Hooper A. (1981). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volumen 3. Editorial: The Williams and Wilkins, Baltimore. pp 1808-1834.
- Wgbis.ces.iisc.ernet.in.(2017).Clorofenoles.Recuperado:
<http://wgbis.ces.iisc.ernet.in/energy/HC270799/HDL/ENV/envsp/Vol314j.htm>.
- Young K., Daniel J., Lewis S. (2002). Kinetic and inhibition studies for the aerobic cometabolism of 1,1,1-trichloroethane, 1,1-dichloroethylene and 1,1-dichloroethane by a butane-grown mixed culture. *Biotechnology and Bioengineering.* **80**,498-508.
- Zepeda A., Texier A-C., Razo-Flores E. and Gómez J. (2003). Benzene Transformation in Nitrifying Batch Cultures. *Biotecnología Progress*, **19**, 789–793.
- Zepeda A., Texier A-C., Razo-Flores E. and Gomez J. (2006). Kinetic and metabolic study of benzene, toluene and *m*-xylene in nitrifying batch cultures. *Wat. Res.* **40**, 1643-1649.

-Zepeda A., Texier A-C. and Gomez J. (2007). Batch nitrifying cultures in presence of mixtures of benzene, toluene, and *m*-xylene. *Environ. Technol.* **28**, 355-360.

-Zepeda A., Ben-Youssef C., Rincón S., Cuervo-López F., Gómez, J. (2013) Complete and simultaneous removal of ammonium and *m*-cresol in a nitrifying sequencing batch reactor. *Biodegradation* **24** (2013), 377-385



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS

No. 00181
Matrícula: 2153803646

ELIMINACIÓN SIMULTÁNEA DE 2-CLOROFENOL (2-CF) Y ALTAS CONCENTRACIONES DE AMONIO EN UN REACTOR DE LOTE SECUENCIADO (SBR).

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 21 del mes de julio del año 2017 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. FLOR DE MARIA CUERVO LOPEZ
DR. JESUS EMMANUEL PEREZ ALFARO




AARON VILLASECA HERNANDEZ
ALUMNO

siendo la primera asesora del alumno y lector el segundo, de la Idónea Comunicación de Resultados, se reunieron a evaluar la presentación cuya denominación aparece al margen, para la obtención del diploma de:

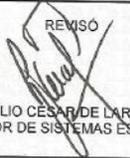
ESPECIALIZACION EN BIOTECNOLOGIA

DE: AARON VILLASECA HERNANDEZ

y de acuerdo con el artículo 79 fracción II del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

REVISÓ



LIC. JULIO CÉSAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

Acto continuo, se comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS



DRA. EDITH PONCE ALCÁZAR

ASESORA



DRA. FLOR DE MARIA CUERVO LOPEZ

LECTOR



DR. JESUS EMMANUEL PEREZ ALFARO