

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**EVALUACIÓN DE LA NITRIFICACIÓN EN UN REACTOR SBR EN
PRESENCIA DE 2-CLOROFENOL Y UNA ALTA
CONCENTRACIÓN DE AMONIO**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
ESPECIALISTA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:
I.B.I. JULIO CÉSAR FLORES REYES

DIRECTORA DEL TRABAJO:
Dra. FLOR DE MARÍA CUERVO LÓPEZ

MÉXICO, D.F.

DICIEMBRE 2015

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, gracias al apoyo otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con el proyecto CB-2011-01-165174.


El posgrado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa está inscrito en el marco del Padrón de Posgrado de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

MIEMBROS DEL JURADO

Resumen 1
1. Introducción 2
1.1. 2,4-Diclorofenol 2
1.2. Nitrificación 3
1.3. Factores que afectan la nitrificación 4
1.3.1. Efecto de la temperatura 4
1.3.2. Efecto del pH 5
1.3.3. Efecto de la concentración de oxígeno disuelto 5
1.3.4. Efecto de la materia orgánica 5
2. Antecedentes 6

DIRECTORA DE TESIS

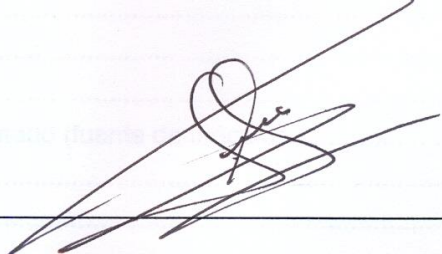
Dra. FLOR DE MARÍA CUERVO LÓPEZ



3. Objetivos 7
3.1. Objetivo general 7
3.2. Objetivos específicos 7
4. Metodología 8

REVISOR EXTERNO

Dr. FELIPE MARTÍNEZ ORTA



5.3. Efectos de los nutrientes secundarios (SiO₂) 14
5.4. Ensayos de recuperación de la nitrificación 15
5.5. Ensayos abióticos 16
5.5.1. Ensayos abióticos 16
5.5.2. Cuantificación de nitrato / nitrato 16
5.5.3. Cuantificación de 2-clorofenol 16
5.5.4. Proteína microbiana 19
5.7. Curvas de respuesta 20
Resultados y discusión 21
7.1. Purificación de técnicas analíticas 21
7.2. Nitrificación en estado estacionario 21
7.3. Cinética nitrificante control 21
7.4. Cinética nitrificante control utilizando un buffer de fosfato 21
7.5. Cinética nitrificante con diferentes retardamientos 21
7.6. Cinética nitrificante con 100 mg/L de H-NH₄⁺ y 40 mg/L de C-NaHCO₃ 21

Contenido	
Resumen	1
1. Introducción	3
1.1. 2-Clorofenol	5
1.2. Nitrificación	6
1.3. Factores que afectan la nitrificación	7
1.3.1. Efecto de la temperatura	7
1.3.2. Efecto del pH	7
1.3.3. Efecto de la concentración de oxígeno disuelto	8
1.3.4. Efecto de la materia orgánica	8
2. Antecedentes	9
3. Justificación	11
4. Hipótesis	11
5. Objetivos	11
5.1. Objetivo general	12
5.2. Objetivos particulares	12
6. Metodología	12
6.1. Cultivo continuo en el reactor de tanque agitado (fuente de inóculo)	12
6.1.2 Medio de cultivo	12
6.2. Ensayo nitrificante control en lote	13
6.3. Reactores de lotes secuenciados (SBR)	14
6.4. Ensayos de recuperación de la nitrificación	15
6.5. Ensayos abióticos	15
6.6. Técnicas analíticas	16
6.6.1. Cuantificación de amonio	16
6.6.2. Cuantificación de nitrito / nitrato	17
6.6.3. Cuantificación de 2-clorofenol	18
6.6.4. Proteína microbiana	19
6.7. Variables de respuesta	20
7. Resultados y discusión	21
7.1. Puesta a punto de técnicas analíticas	21
7.2. Inóculo nitrificante en estado estacionario	21
7.3. Cinética nitrificante control	22
7.4. Cinética nitrificante control utilizando un buffer de fosfatos	24
7.5. Cinética nitrificante con diferentes tratamientos	24
7.6. Cinética nitrificante con 300 mg/L de N-NH ₄ ⁺ y 450 mg/L de C-NaHCO ₃	25

7.7. Estabilización de la nitrificación en los reactores SBR	27
7.8. Ensayos abióticos en los SBRs	33
7.9. Ensayos nitrificantes en presencia de 2-clorofenol.....	34
7.10. Ensayos de recuperación de la nitrificación.....	42
8. Conclusiones	47
9. Recomendaciones	48
10. Referencias.....	49

Resumen

En el presente trabajo se evaluó el efecto del 2-clorofenol (2-CP, 5 mg C-2-CP/L) sobre la nitrificación utilizando un reactor de lotes secuenciados (SBR) y una concentración alta de amonio (300 mg N-NH₄⁺/L). Se utilizó como inóculo un lodo nitrificante fisiológicamente estable obtenido de un reactor nitrificante en continuo que no tuvo contacto previamente con este compuesto. Primero se realizaron ensayos en lote para conocer las condiciones bajo las cuales es posible llevar a cabo completamente la nitrificación con 300 mg N-NH₄⁺/L. Una vez obtenidas estas condiciones, se procedió a estabilizar el proceso nitrificante en dos reactores SBR (SBR1 y SBR2), para lo cual, se instalaron 2 reactores inoculados con 300 mg de proteína microbiana/L y se operaron con 95 ciclos de 24 horas. Posteriormente, se adicionó a los reactores nitrificantes una concentración de 5 mg C-2-CP/L y se evaluó la nitrificación durante 12 ciclos de operación. Finalmente, se realizó un ensayo de recuperación de la nitrificación (se lavó la biomasa con solución salina y se le agregaron las fuentes de C y N) con una duración de 240 horas.

Los ensayos nitrificantes en lote y en ausencia de 2-CP indicaron que con una C/N de 1.5 y 24 horas de cultivo la eficiencia de consumo de amonio ($E_{NH_4^+}$) fue de 90.20% y el rendimiento nitrificante ($Y_{NO_3^-}$) fue de 0.97 sin que se detectara una acumulación de NO₂⁻. Bajo estas condiciones se operaron los reactores SBR y después de 95 ciclos se obtuvo un estado nitrificante metabólica y cinéticamente estable con una $E_{NH_4^+}$ entre 80.29 y 83.95%, un $Y_{NO_3^-}$ entre 0.94 y de 0.85, velocidades específicas de consumo de NH₄⁺ ($q_{NH_4^+}$) entre 0.0220 y 0.0186 y velocidad específica de producción de NO₃⁻ ($q_{NO_3^-}$) entre 0.0281 y 0.0237 para el reactor 1 y 2 respectivamente. Con estos lodos se evaluó el efecto del 2-CP sobre la nitrificación, encontrándose un efecto inhibitorio puesto que después de 12 ciclos no se encontró actividad nitrificante ya que no hubo consumo de NH₄⁺ ni producción de nitrato en ninguno de los reactores. Sin embargo, la eficiencia de consumo de 2-clorofenol (E_{2-CP}) en el ciclo 1 fue de 15.8 y 30.1% en el reactor 1 y 2. Después de 12 ciclos de operación, en ambos reactores el 2-CP fue consumido totalmente a una velocidad específica (q_{2-CP}) de 0.00282 y de 0.00458 respectivamente indicando la capacidad del lodo nitrificante para consumir el compuesto clorado. Finalmente, los ensayos de recuperación indicaron que en el reactor 1 no se encontró actividad nitrificante mientras que en el reactor 2 la $E_{NH_4^+}$ fue de 43% con un $Y_{NO_3^-}$ de 0.99, la $q_{NH_4^+}$ fue de 0.0029 mientras que la $q_{NO_3^-}$ fue de 0.0026, lo que representan una recuperación de 9.58% y 10.40% de la $q_{NH_4^+}$ y $q_{NO_3^-}$, respectivamente. Estos resultados indican

que el 2-CP tiene un efecto inhibitorio sobre la biomasa ya que ésta sólo recuperó su actividad nitrificante parcialmente, pero aún así fue eliminado posiblemente debido a la adaptación de la biomasa gracias al uso del reactor SBR.

1. Introducción

La contaminación de los cuerpos acuáticos, debido a las actividades industriales y a la falta de tratamiento de los efluentes finales, es uno de los principales problemas a resolver. En los últimos 100 años la actividad humana ha duplicado la entrada de nitrógeno en el ciclo global del nitrógeno terrestre. Como consecuencia, en áreas altamente industrializadas y pobladas, hemos contaminado la atmósfera con amoníaco y óxidos de nitrógeno, se han acidificado suelos, corrientes y lagos, se ha disminuido la biodiversidad al afectar las plantas adaptadas al uso eficiente del nitrógeno y se han afectado las pesquerías marinas costeras (Van Breemen, 2002). Además de los elementos nitrogenados, en los efluentes pueden estar presentes elementos orgánicos, como compuestos aromáticos, que pueden ser biodegradables, dichos compuestos pueden repercutir en la salud de los seres vivos (Martínez, 2013).

En la naturaleza, el nitrógeno se transforma en nitrato por medio de una serie de procesos biológicos que conforman el ciclo del nitrógeno y comienzan con la descomposición del nitrógeno orgánico a amonio. El amonio es de nuevo incorporado parcialmente por las plantas y parcialmente oxidado a nitrato por bacterias. El nitrato que no es incorporado por las plantas, puede ser lixiviado a ríos o reducido principalmente a nitrógeno atmosférico por las bacterias desnitrificantes. La desnitrificación cierra el ciclo del nitrógeno, el cual comenzó con la fijación biológica o industrial del nitrógeno molecular a otras formas disponibles para las plantas y microbios, la mayoría de los cuales no pueden usar nitrógeno molecular (Van Breemen, 2002). Concentraciones anormalmente elevadas de NH_4^+ , HNO_2^- y NO_3^- resultan en toxicidad directa para los animales acuáticos, ya que están mejor adaptados a niveles relativamente bajos de nitrógeno inorgánico dado que los ecosistemas naturales (no contaminados) generalmente no están saturados con nitrógeno y las concentraciones naturales de nitrógeno inorgánico usualmente no son muy elevadas (Camargo y Alonso, 2006).

El amoníaco ionizado o ion amonio (NH_4^+) y el amoníaco, se encuentran estrechamente relacionados a través del equilibrio químico $\text{NH}_4^+ + \text{OH}^- \leftrightarrow \text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O}$. Las concentraciones relativas de NH_4^+ y NH_3 dependen básicamente del pH del agua: a medida que los valores de pH aumentan, la concentración de NH_3 también aumenta, pero la

concentración de NH_4^+ disminuye. El amoniaco es muy tóxico para los animales acuáticos, mientras que el ion amonio es mucho menos tóxico. La acción tóxica del NH_3 es debida a una o más de las siguientes causas: destrucción del epitelio branquial, estimulación de la glucólisis y supresión del ciclo de Krebs, inhibición de la producción de ATP y reducción de sus niveles, alteración de la actividad osmorreguladora, y disrupción del sistema inmunológico (Camargo y Alonso, 2007). Además, tanto el ion amonio como el amoniaco son compuestos altamente oxidables y por tanto consumidores de oxígeno, como resultado de su oxidación, el oxígeno disuelto en las aguas receptoras se agota. Aunado a esto, todas las formas de nitrógeno pueden estar disponibles para las plantas acuáticas y, por consiguiente pueden contribuir a la eutrofización (Obaja y col., 2001). Por otro lado, la ingestión de agua con altas concentraciones de nitritos y nitratos (concentraciones mayores a 10 mg/L de N-NO_3^-) puede inducir directamente efectos adversos sobre la salud humana (Fewtrell, 2004). Los niños pequeños, sobre todo los menores de cuatro meses, son los más susceptibles de sufrir metahemoglobinemia, manifestando los síntomas típicos de cianosis, taquicardia, convulsiones, asfixia, y en último término la muerte (Camargo y Alonso, 2007). Algunas evidencias científicas sugieren además, que la ingestión prolongada de nitratos y nitritos podría contribuir al desarrollo de linfomas y cánceres, enfermedades coronarias, infecciones del tracto respiratorio y malformaciones en los recién nacidos (Camargo y Alonso, 2007).

Actualmente existen varios procesos fisicoquímicos para la eliminación del nitrógeno de las aguas residuales, por ejemplo: extracción de amoniaco con vapor, precipitación de amoniaco como estruvita, eliminación de amoniaco y nitratos mediante intercambio iónico selectivo, eliminación de cloramina por carbón activado, adsorción de amoniaco en carbón, entre otros (Capodaglio y col. 2015). Sin embargo, estas tecnologías presentan serios inconvenientes ya que no permiten la degradación completa de compuestos aromáticos que puedan estar presentes en las aguas residuales, pueden generar subproductos peligrosos (contaminantes secundarios) y más importante, representan un costo elevado debido a las altas condiciones de temperatura y presión que son necesarias, así como por las sustancias requeridas como agentes neutralizantes u oxidantes (Ramos y col. 2015). Es por esto que los métodos biológicos de eliminación de nitrógeno de las aguas residuales representan una alternativa atractiva para su tratamiento.

1.1. 2-Clorofenol

Los clorofenoles son compuestos halogenados tóxicos que tienen varios usos en diferentes industrias. Son utilizados principalmente como preservativos de maderas, bactericidas y fungicidas. Los fenoles clorados mayores (fenoles con 3 o más átomos de Cl) y sus sales son utilizados en la industria de preservación de la madera y en tratamientos superficiales de troncos recién cortados contra hongos y moho. Los clorofenoles menores (fenoles con menos de 3 átomos de Cl) se utilizan como intermediarios en la producción de clorofenoles mayores y plaguicidas. El 2-clorofenol (2-CP) se utiliza principalmente para la síntesis de 2,4-diclorofenol, 2,4,6-triclorofenol y pentaclorofenol pero también puede ser encontrado en los efluentes (junto con otros compuestos recalcitrantes) de industrias como la petroquímica, de fabricación del acero, de coque y en fábricas de gasificación del carbón (Ramos y col. 2015). Además de ser producidos comercialmente, se pueden producir pequeñas cantidades de clorofenoles, en especial de mono y diclorofenoles, cuando se utiliza cloro para desinfectar aguas residuales o potables, si hay ciertos contaminantes presentes en ellas. También se producen durante el blanqueamiento de la pulpa de madera en la fabricación del papel.

En general, los clorofenoles entran al ambiente cuando se fabrican o se utilizan como plaguicidas. La mayoría de los clorofenoles que se liberan al ambiente van al agua, con una muy pequeña cantidad hacia el aire. Los compuestos que más probablemente vayan al aire son los mono y diclorofenoles, ya que son los más volátiles. Una vez en el aire, la luz solar ayuda a destruir parte de estos compuestos y el resto es transferido por la lluvia al suelo y cuerpos acuáticos, donde se solubilizan o se adhieren al suelo y sedimento del fondo de ríos, lagos o corrientes. Sin embargo, cuando los clorofenoles se encuentran a bajas concentraciones en el agua, suelo o sedimento, algunos microorganismos pueden degradarlos y removerlos del ambiente en algunos días o semanas, aunque en algunos casos se requiere mayor tiempo para su degradación y ésta puede no ser completa (Toxicological profile for chlorophenols, 1999).

Particularmente, el 2-CP es un líquido desde incoloro hasta ámbar, con un olor desagradable, es soluble en alcohol, éter y soluciones alcalinas. Es un compuesto muy soluble en agua (28.5 g/L), por lo que puede migrar fácilmente a medios acuosos y contaminarlos. De acuerdo al coeficiente de partición octanol-agua (K_{ow} del 2-CP 2.16), que es una medida de cómo una

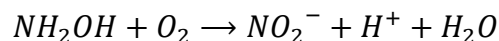
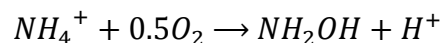
sustancia química puede distribuirse fácilmente en dos solventes inmiscibles, el 2-CP puede fijarse con firmeza a materia orgánica, sedimento y partes lipofílicas de microorganismos, como membranas celulares. Debido a esto y considerando que la vía de exposición al 2-CP generalmente es por la cadena alimenticia, éste tiende a bioacumularse en la grasa corporal de los animales (Beristain-Montiel, 2008). Este compuesto está considerado como un contaminante serio debido a su toxicidad y su significativo impacto ambiental en el aire, agua y suelo (Substance priority list, 2013).

1.2. Nitrificación

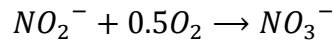
La nitrificación, es un proceso respiratorio aerobio que consiste en la oxidación biológica de amonio a nitrato a través de nitrito, y su importancia ha sido reconocida por más de un siglo. Tanto ingenieros como científicos continúan investigando el proceso para obtener un mejor entendimiento de sus fundamentos que permita utilizarlo en beneficio del hombre.

La nitrificación se lleva a cabo en dos pasos: oxidación de amonio (NH_4^+) a hidroxilamina (NH_2OH) por la enzima amonio monooxigenasa (AMO) de las bacterias amonio oxidantes, después la hidroxilamina es oxidada a nitrito (NO_2^-) por la enzima hidroxilamina óxido reductasa (HAO). El nitrito es convertido a nitrato por la acción de la enzima nitrito óxido reductasa presente en las bacterias nitrito-oxidantes (Prosser, 1989, Hooper y col., 1997). Ambos grupos de bacterias son autótrofos que utilizan CO_2 como fuente de carbono para la biosíntesis y la oxidación de compuestos nitrogenados como fuente de energía. El rendimiento de biomasa relativo a la cantidad de NH_4^+ oxidado es relativamente pequeño (Antoniou y col., 1989). A continuación se presentan las ecuaciones de las reacciones que ocurren en la nitrificación:

Amonio oxidación:



Nitrito oxidación:



1.3. Factores que afectan la nitrificación

La interacción de factores tales como el pH, temperatura, concentración de oxígeno disuelto y la presencia de compuestos inhibitorios influyen en la velocidad a la que se lleva a cabo la nitrificación. (Anthonisen y col., 1976). A continuación se mencionan algunos de ellos.

1.3.1. Efecto de la temperatura

Tanto las bacterias amonio oxidantes (AOB por sus siglas en inglés) como las nitrito oxidantes (NOB por sus siglas en inglés) son microorganismos mesófilos y la temperatura para su crecimiento óptimo se encuentra entre 28 y 36°C. Debido a esto, las velocidades de crecimiento de las bacterias nitrificantes disminuyen cuando disminuye la temperatura, aunque se ha encontrado que la nitrificación es posible incluso a temperaturas de 5 °C (Bernet y Spérandio, 2009). La temperatura tiene un efecto en la velocidad de crecimiento de los microorganismos nitrificantes, pero en diferentes proporciones para las AOB y NOB. A temperaturas superiores a 15°C, las AOB presentan una velocidad de crecimiento mayor que las NOB (Silva, 2011).

1.3.2. Efecto del pH

El crecimiento óptimo de las bacterias nitrificantes ocurre a un pH en el rango de 7.5 – 8. Se considera que tanto la oxidación del amoníaco como del nitrito son óptimas a valores de pH neutros o ligeramente alcalinos (Prosser, 1989). Para el crecimiento óptimo de un cultivo puro de AOB se considera un rango de pH de 5.8 – 8.5 y para las NOB un rango de pH de 6.5 – 8.5 (Spieck y Bock, 2005). Debajo del valor óptimo de pH, la tasa de crecimiento específico decae rápidamente (Keen y Prosser, 1987). La respuesta de la tasa de crecimiento específico de los microorganismos nitrificantes a los valores de pH refleja los valores de pK de sus respectivos substratos. Para NH₄⁺/NH₃ el valor de pK es de 9.25. Se ha demostrado que la reducción del pH también disminuirá la concentración de amoníaco libre en un orden de magnitud por cada

unidad que se reduzca de pH (Prosser, 1989). Además de afectar la velocidad de crecimiento, el pH también afecta la velocidad de nitrificación, es decir, la velocidad de conversión de amonio a nitrato. Shammass (1986) estudió el efecto de la temperatura y el pH sobre la nitrificación y encontró que la velocidad de nitrificación a un pH de 8.3 es casi el doble que a un pH de 7.0.

1.3.3. Efecto de la concentración de oxígeno disuelto

En el proceso respiratorio nitrificante, se utiliza oxígeno como aceptor final de electrones. Se asume generalmente que las concentraciones de oxígeno superiores a 2 mg/L son adecuadas para una nitrificación con éxito. Las bacterias nitrificantes tienen una alta afinidad por el oxígeno disuelto (bajos valores de K_s entre 0.4 y 0.6 mg/L) (Martínez, 2013), pero son muy sensibles a bajas concentraciones de oxígeno. Hanaki y col. (1990) probaron el efecto de la limitación de oxígeno en la nitrificación utilizando dos reactores de flujo mixto de un litro, uno operado con una concentración de oxígeno disuelto (OD) de 6.0 mg/L y otro con una concentración de OD de entre 0.3 y 0.8 mg/L, ambos con una concentración de 80 mg/L de $N-NH_3^+$. Encontraron que la baja concentración de OD no afectó la oxidación de amonio y duplicó el crecimiento de las bacterias amonio oxidantes. Sin embargo, la oxidación de nitrito fue fuertemente inhibida aunque el rendimiento de crecimiento de las bacterias nitrito oxidantes permaneció sin cambios. La oxidación reducida de nitrito y la oxidación de amonio resultaron en una acumulación de nitrito de hasta 60 mg/L después de un tiempo de residencia hidráulico de entre 2.0 y 3.8 días. Los autores concluyen que las bacterias nitrito oxidantes son más sensibles a la limitación de oxígeno, por lo que concentraciones menores a 1 mg/L de OD son suficientes para limitar la actividad nitrito-oxidante en un sistema nitrificante.

1.3.4. Efecto de la materia orgánica

El efecto inhibitorio de los compuestos orgánicos sobre la nitrificación biológica está bien documentado y es un hecho conocido que la estabilidad de los sistemas de nitrificación en plantas de tratamiento de aguas residuales se ve amenazada por la presencia de compuestos químicos inhibitorios o tóxicos (Texier, 2006). La mayoría de los estudios sobre los efectos de los compuestos orgánicos en la nitrificación, han utilizado como inóculo cultivos axénicos o

consorcios, como es el caso de los lodos activados. Bernet y Sperandio (2009) señalan que debido a la baja velocidad de crecimiento de los microorganismos nitrificantes, su inhibición, aunque sea parcial, puede causar que en sistemas de lodos activados, se detenga el proceso nitrificante. Se ha mostrado que los efectos dependen principalmente de la concentración, estructura química y tipo de contaminante orgánico, así como también el tipo de cultivo (axénicos o consorcio) y el origen de los lodos (Martínez, 2013). Zepeda y col. (2006) evaluaron los efectos del benceno, tolueno y *m*-xileno sobre la actividad nitrificante de un lodo y encontraron que, a concentraciones de 10 mg C/L de benceno y *m*-xileno, la eficiencia de consumo de amonio se disminuyó en un 57 y 26% respectivamente, mientras que el tolueno no afectó el proceso de oxidación del amonio. No hubo efectos significativos a una concentración de 5 mg C/L de cada compuesto aromático.

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 0.9 mg/L de 2-clorofenol disminuye un 10% la actividad nitrificante. Silva (2011), encontró un efecto inhibitorio reflejado en un descenso en las velocidades de consumo de amonio y producción de nitrato de 83 y 60%, respectivamente, al poner al lodo nitrificante en contacto con una concentración de 25 mg/L de *p*-cresol. Sin embargo, después de 48 h, los cultivos alcanzaron una eficiencia en el consumo de amonio de 96% y un rendimiento en la producción de nitrato de 0.95 g N-NO₃⁻ producido g⁻¹ N-NH₄⁺ consumido.

2. Antecedentes

Se han probado varios procesos biológicos para la eliminación de clorofenoles, tanto en condiciones anaerobias como aerobias (Martínez-Hernández, 2010). Pérez-Alfaro (2010) reporta que al utilizar un consorcio nitrificante que no tenía contacto previo con materia orgánica y al adicionar concentraciones de 2-CP entre 10, 5 y 2.5 mg/L, mediante pruebas en lote, encontró que las eficiencias de consumo de amonio presentaron una disminución de hasta el 100%, esto es, el compuesto clorado inhibió el consumo y oxidación de amonio a nitrato.

Se ha reportado que una forma de disminuir la toxicidad o efecto inhibitorio de compuestos orgánicos como los clorofenoles sobre los procesos biológicos, puede ser la exposición previa de los lodos depuradores a dichos compuestos. Por ejemplo, Beristain-Montiel (2008), encontró que al utilizar un lodo metanogénico que había sido previamente expuesto a 50 mg/L

de 2-CP durante 50 y 80 días, la velocidad específica de consumo (q_s) del 2-CP se incrementó en un 57% y 114% respectivamente, en comparación con la q_s del lodo control sin exposición previa al compuesto aromático (0.0014 ± 0.0005 mg C/g SSV-d). Posteriormente, utilizando un reactor anaerobio de lotes secuenciados, fue posible aumentar hasta cinco veces la velocidad específica de consumo de diferentes concentraciones iniciales de 2-CP (Beristain-Montiel y col. 2011).

Martínez (2013), utilizando un lodo nitrificante previamente expuesto a 2-CP y un reactor SBR, encontró que bajo condiciones nitrificantes, el amonio se consumía totalmente en un lapso de 40 h. La eficiencia de consumo de NH_4^+ fue de 99.63% y el rendimiento de producción de NO_3^- fue de 0.94. Cuando a este lodo nitrificante, en el primer ciclo de operación con 30 días de reacción, se le adicionaron 20 mg/L de C-2-CP, la eficiencia de consumo de NH_4^+ fue de 12% y el rendimiento de producción de NO_3^- fue de 0.31, esto es, ni el consumo de amonio ni su oxidación fueron completos. Para el ciclo 2, la eficiencia de consumo de NH_4^+ fue de 99.63% y el rendimiento de producción de NO_3^- fue de 1.03. Asimismo, la velocidad de consumo de amonio en el primer ciclo fue de 0.0027 mg N- NH_4^+ /mg de proteína d y se incrementó a 0.0086 mg N- NH_4^+ /mg de proteína d después de tres ciclos de operación. Esto es, usando un reactor SBR y lodos nitrificantes previamente en contacto con el 2-CP, fue posible disminuir el efecto inhibitorio del 2-CP a lo largo de los ciclos de operación.

Por otro lado, Pérez-Alfaro y col. (2013) hicieron ensayos en lote en botellas serológicas en donde se puso en contacto un lodo nitrificante con una concentración de 5 mg/L de 2-CP y 100 mg/L de NH_4^+ , encontrando que después de 40 días no se observó consumo de NH_4^+ , es decir, la nitrificación fue completamente inhibida. Posteriormente, en un ensayo con 5 mg/L de 2-CP y 300 mg/L de NH_4^+ Pérez-Alfaro (2015) observó que el consumo de amonio y su oxidación a nitrato y nitrito se efectuaron en 48 horas. Reporta que bajo estas condiciones, fue posible obtener una eficiencia de consumo de amonio del 20% y un rendimiento de producción de NO_3^- de 0.5. Asimismo, la velocidad específica de consumo de NH_4^+ fue de 0.08 mg N- NH_4^+ /mg de proteína h, lo que indica que la inhibición por el 2-CP puede ser disminuida utilizando una concentración alta de NH_4^+ .

Estos resultados indican que el uso de un reactor de lotes secuenciados y altas concentraciones de amonio, podría ser una buena alternativa para disminuir el efecto inhibitorio

del 2-CP sobre la nitrificación. De esta forma, sería posible mantener y aumentar la capacidad nitrificante de un lodo aun en presencia del compuesto inhibitorio.

3. Justificación

Los sistemas de tratamiento de aguas residuales que pretenden eliminar amonio por medio de la nitrificación pueden verse afectados por la presencia de materia orgánica (en este caso el 2-clorofenol) ya que provoca una inhibición del proceso nitrificante, reflejada en una reducción de las velocidades de consumo y producción del proceso. En trabajos previos se ha reportado que la inhibición de la nitrificación por presencia de 2-CP puede disminuirse utilizando lodos que han sido expuestos previamente al compuesto inhibitorio, pero el tiempo de consumo del mismo es muy largo (Martínez, 2013). También se ha observado que la inhibición disminuye aumentando la concentración de amonio. Sin embargo, es necesario, realizar un análisis cinético y metabólico del proceso nitrificante bajo estas condiciones, a fin de determinar el efecto inhibitorio a lo largo del tiempo. Este análisis puede ser evaluado en un reactor de lotes secuenciados (SBR), con un lodo nitrificante que no ha sido expuesto previamente al 2-CP y utilizando una mayor concentración de amonio, asimismo, este sistema de trabajo también permitirá evaluar el efecto inhibitorio a lo largo de los ciclos de operación. Al determinar el efecto inhibitorio del 2-CP a lo largo del tiempo, sería posible mantener y aumentar la capacidad nitrificante en términos de velocidad de consumo de amonio y generación de nitrato, de un lodo aún en presencia del compuesto inhibitorio.

4. Hipótesis

El efecto inhibitorio del 2-CP sobre la nitrificación se verá disminuido cuando se utilice una concentración alta de amonio (300 mg/L N-NH₄⁺). Asimismo, la operación de la nitrificación bajo estas condiciones en un reactor de lotes secuenciado, permitirá que, a lo largo de los ciclos de operación, la inhibición por el 2-CP sea menor y la nitrificación se realice de manera estable.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Evaluar en un reactor de lotes secuenciados (SBR), el efecto del 2-CP sobre un lodo nitrificante sin contacto previo a este compuesto en presencia de altas concentraciones de amonio.

5.2. Objetivos particulares

Determinar mediante cinéticas en lote, el tiempo de reacción necesario para los reactores SBR. Estabilizar la nitrificación en los reactores SBR en presencia de 300 mg/L de amonio mediante la evaluación de parámetros cinéticos y metabólicos ($E_{NH_4^+}$, $Y_{NO_3^-}$, $q_{NH_4^+}$, $q_{NO_3^-}$).

Evaluar en los reactores SBR con lodos nitrificantes estabilizados, el efecto del 2-CP sobre la nitrificación mediante el cálculo de $E_{NH_4^+}$, $Y_{NO_3^-}$, $q_{NH_4^+}$, $q_{NO_3^-}$ y q_{2-CP} a través de los ciclos de operación.

6. Metodología

Para la realización del presente trabajo, se mantuvo un reactor nitrificante de mezcla completa operado en continuo, a fin de obtener un inóculo en estado estacionario. Posteriormente, con este inóculo se llevaron a cabo ensayos en lote, para finalmente, determinar la duración de los ciclos de reacción e instalar los reactores SBR nitrificantes.

6.1. 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 L para llevar a estado estacionario un consorcio nitrificante que posteriormente fue utilizado como inóculo.

El reactor en continuo se operó bajo las siguientes condiciones: volumen de trabajo de 6 L, temperatura ambiente (25 °C), agitación de 200 rpm, relación carbono/nitrógeno (C/N) de 2.5, tiempo de residencia hidráulica (TRH) de 2.27 d. Se consideró que el lodo alcanzó el estado estacionario cuando las velocidades de consumo y producción tuvieron una variación menor que el 10%.

6.1.2 Medio de cultivo

Para evitar la posible precipitación de los componentes y evitar el crecimiento de organismos dentro de los tanques de alimentación, el medio de cultivo que se utilizó para alimentar el reactor se dividió en dos soluciones: A (fuente de nitrógeno) y B (fuente de carbono) (Tabla 1), el flujo de alimentación para los medios fue 1 L/d y 0.84 L/d respectivamente. La composición de ambos fue la siguiente:

Tabla 1. Composición del medio de cultivo para alimentar el reactor continuo

A	g/L	B	g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.732	NaHCO ₃	9.3
NH ₄ Cl	1.398	CaCl ₂	0.05
KH ₂ PO ₄	2.73		
MgSO ₄	0.6		
NaCl	1.0		

6.2. Ensayo nitrificante control en lote

Con el fin de conocer el tiempo que tarda el lodo nitrificante en consumir 300 mg/L de N-NH₄⁺ se realizaron ensayos en lote en botellas serológicas. Con base en este tiempo de consumo de amonio se determinó la duración de los ciclos en los reactores de lote secuenciado.

Los ensayos en lote 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 agregaron 10 mL del medio A y 25 mL del medio B (Tabla 2), 0.5 mL de FeSO₄, 40 mL de inóculo y 24.5 mL de agua para completar 100 mL de volumen total y tener una concentración de 300 mg/L de N-NH₄⁺ y 250 mg/L de C-NaHCO₃. La relación C/N resultante fue de 0.83. Se burbujeó oxígeno durante dos minutos, se inocularon con aproximadamente 300 mg de proteína bacteriana/L, proveniente del reactor nitrificante de tanque agitado en estado estacionario (previamente lavado con solución fisiológica), la botella se selló y nuevamente se introdujo oxígeno durante dos minutos. La temperatura de incubación fue de 30 °C y la agitación de 200 rpm. Bajo estas condiciones de operación se realizaron cinéticas para observar el proceso nitrificante y utilizarlas a manera de control.

Tabla 2. Composición del medio de cultivo para ensayos en lote

A	g/L	B	g/L
---	-----	---	-----

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.95	NaHCO_3	7.0
NH_4Cl	0.77	CaCl_2	0.04
KH_2PO_4	1.12	FeSO_4	0.15
MgSO_4	0.8		
NaCl	0.8		

Todos los ensayos se realizaron por duplicado, se tomaron muestras a diferentes tiempos a fin de determinar los perfiles de consumo de amonio y de producción de nitrato, cada botella correspondió a una medición independiente y se desecharon después de su análisis.

6.3. Reactores de lotes secuenciados (SBR)

Con el fin de evaluar la nitrificación y el efecto del 2-clorofenol sobre ésta, se instalaron y operaron dos reactores SBR (Microferm Fermentor, New Brunswick Scientific, mod. MF-114) de volumen nominal de 1.5 L y volumen de trabajo de 1.1 L. La operación de ambos reactores fue realizada a temperatura ambiente (25°C), la aireación fue suministrada de manera constante mediante dos bombas de aire y la agitación fue de 200 rpm. La alimentación de los reactores se realizó mediante bombas peristálticas (Masterflex, Cole Parmer) programadas en su encendido y apagado con ayuda de temporizadores (810060, SperScientific). Los reactores fueron inoculados con 300 mg/L de proteína microbiana obtenida del reactor continuo nitrificante en estado estacionario previamente descrito. La composición del medio de cultivo para los reactores SBR se realizó manteniendo una relación C/N de 1.5 debido a lo hallado en los ensayos en lote y las relaciones C/S y C/P, de acuerdo a lo reportado en el trabajo de Salas (2014):

Tabla 3. Relaciones C/N, C/S y C/P (Salas, 2014)

C/N	C/S	C/P
1.5	6.8	6.2

Tomando en cuenta las relaciones descritas previamente, la composición del medio de cultivo para los reactores SBR fue la siguiente:

Tabla 4. Composición del medio de cultivo para los reactores SBR

A	g/L	B	g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.707	NaHCO ₃	3.15
NH ₄ Cl	0.572	CaCl ₂	0.032
KH ₂ PO ₄	0.316	FeSO ₄	0.015
MgSO ₄	0.247		
NaCl	0.541		

La concentración inicial teórica de N-NH₄⁺ y C-NaHCO₃ fue de 300 mg/L y 450 mg/L, respectivamente, para obtener una relación C/N de 1.5. Cada ciclo de operación de 24 horas consistió de las siguientes fases: llenado 0.05 h; tiempo de reacción 22 h; sedimentación de los lodos 1.5 h y drenado 0.45 h. A fin de determinar los perfiles de consumo de amonio y de producción de nitrato, se tomaron muestras durante los ciclos de operación y a diferentes tiempos de experimentación.

Una vez que se alcanzó una nitrificación metabólica y cinéticamente estable, se procedió a adicionar 5 mg C-2-CP/L y de igual manera, se tomaron muestras durante los ciclos de operación y a diferentes tiempos de experimentación a fin de determinar los perfiles de consumo de 2-CP y de amonio y de producción de nitrato. Debido al efecto esperado del 2-CP sobre la nitrificación, la duración de los ciclos se extendió inicialmente a 72 horas.

6.4. Ensayos de recuperación de la nitrificación

Después de realizar los ensayos de nitrificación en presencia de 2-CP en los reactores SBR, se dejó de añadir este compuesto y se realizó un nuevo ciclo sin el compuesto fenólico bajo las mismas condiciones de los ensayos nitrificantes control, pero con la excepción de que el tiempo de cultivo se extendió hasta 250 horas. Se tomaron muestras a diferentes tiempos y se analizó la concentración de amonio, nitrito y nitrato, se calcularon las variables respuesta de este ciclo y se compararon con el control.

6.5. Ensayos abióticos

Con el fin de determinar las pérdidas de 2-CP por arrastre o volatilización en los reactores SBR, se realizaron ensayos abióticos utilizando el medio de cultivo antes descrito pero en ausencia de biomasa. Se evaluaron dos concentraciones diferentes de 2-CP (5 y 10 mg/L) aireando de manera continua (durante 12 horas, con bombas de aire) e intermitentemente (durante 8 horas, aireando con oxígeno al inicio y cada 4 horas durante 2 minutos). Se tomaron muestras a diferentes tiempos y se determinó la cantidad de 2-CP perdido en la duración de los ensayos.

6.6. Técnicas analíticas

Las técnicas analíticas que se emplearon en el trabajo experimental se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 5. Técnicas analíticas

Determinación	Método
Nitrógeno amoniacal	Electrodo de ion selectivo
Nitrito / Nitrato	HPLC / Electroforesis capilar
2-Clorofenol	HPLC
Proteína microbiana	Lowry

6.6.1. Cuantificación de amonio

Para cuantificar amonio, se utilizó un electrodo selectivo de amoniaco (Phoenix electrode Co). El principio de medición, se basa en desplazar el equilibrio del par $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ en solución acuosa mediante la alcalinización de las muestras. El ion amonio es convertido a amoniaco al alcalinizar las muestras con NaOH. El amoniaco, que pasa al electrodo a través de una membrana permeable a este compuesto, genera un potencial eléctrico. 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 amoniaco. Bajo agitación constante y temperatura ambiente, se tomó la lectura

del potencial (mV) cuando fue estable (aproximadamente 3 min. después de agregar el NaOH). En la figura 1 se muestra un ejemplo de una curva estándar para cuantificar amonio.

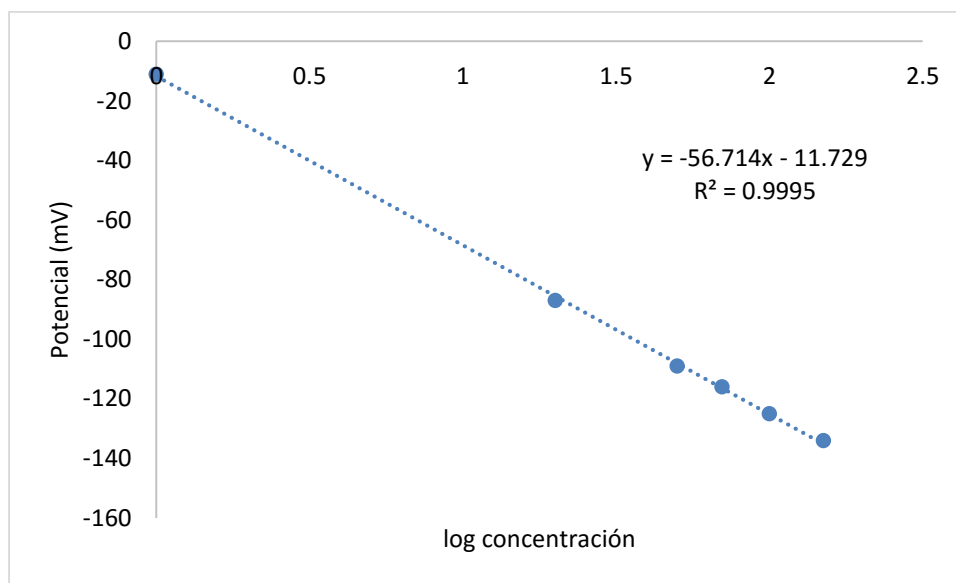


Figura 1. Curva estándar de amonio

6.6.2. Cuantificación de nitrito / nitrato

La detección y cuantificación de nitrato y nitrito se realizó por electroforesis capilar. El equipo utilizado fue un analizador capilar de iones (Beckman PA 800), que consta de un capilar de sílice fundida de 60 cm de largo y 75 μm de diámetro interno, con un suministro de corriente de 35 μA y un voltaje de 20 KV. Los tiempos de toma de muestra y de corrida fueron de 5 segundos y 5 minutos respectivamente por presión a 20 bars durante 0.1 min. Se utilizó un tiempo de 1.5 minutos de purga con NaOH 0.1 M. La absorbancia fue medida con una lámpara de luz ultravioleta a una longitud de onda de 214 nm. El análisis electroforético fue realizado a 25°C, utilizando como electrolito de trabajo una solución de sulfato de sodio, el cual fue preparado de la siguiente forma: A 10 mL de una solución de Na_2SO_4 0.1 M, adicionar 3 mL de la solución comercial OFM anion-BT (Waters), mezclar y aforar a 100 mL con agua desionizada. Se construyó una curva estándar a partir de una solución de 1000 mg/L de NO_2^- y NO_3^- , respectivamente, en mezcla.

A continuación se muestra un ejemplo de una curva de calibración para cuantificar NO_2^- y NO_3^-

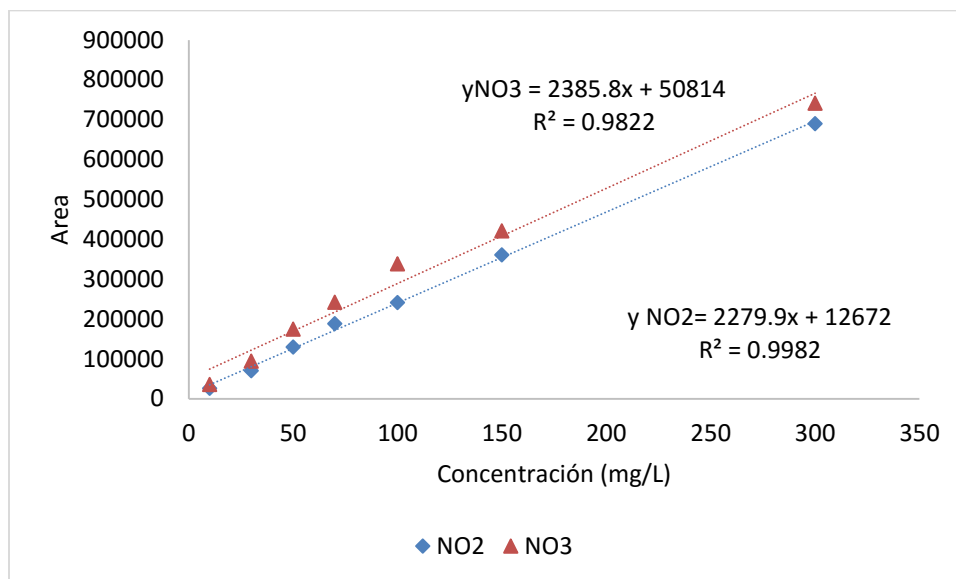


Figura 2. Curva estándar de nitrito y nitrato

6.6.3. Cuantificación de 2-clorofenol

La concentración de 2-clorofenol se determinó por HPLC (Perkin Elmer serie 200) utilizando una columna C-18 fase reversa (Phenomenex) y un detector UV-visible a una longitud de onda de 274 nm. Se utilizó una fase móvil compuesta por acetonitrilo y agua (60:40, v:v) a un flujo de 1.5 mL/min. La fase móvil fue filtrada (0.45 µm) y desgasificada. A partir de una solución madre se realizaron las soluciones estándar con 1, 3, 5, 7 y 10 mg C-2-CP/L. Todas las diluciones se hicieron con agua desionizada y las soluciones fueron filtradas por una membrana de 0.45 µm. La figura 3 muestra un ejemplo de una curva estándar para cuantificar 2-CP.

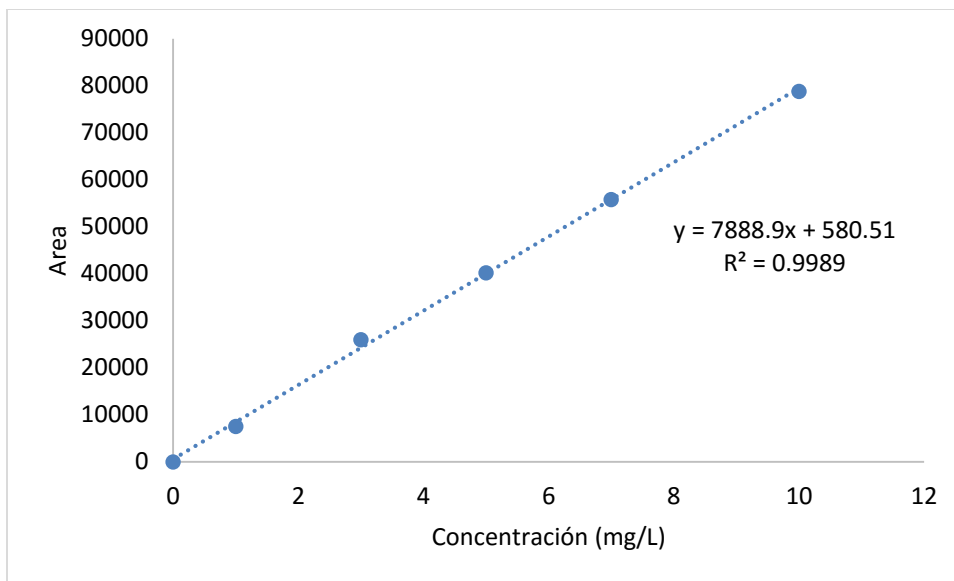


Figura 3. Curva estándar de 2-clorofenol

6.6.4. Proteína microbiana

La concentración de proteína fue determinada por el método colorimétrico de Lowry. Como referencia se utilizó una curva de calibración de 0, 0.12, 0.18, 0.24 y 0.3 g de albúmina/L (Sigma). Se midió la absorbancia con un espectrofotómetro (Shimadzu TM), a una longitud de onda de 750 nm. A continuación se muestra un ejemplo de una curva estándar para cuantificar proteína.

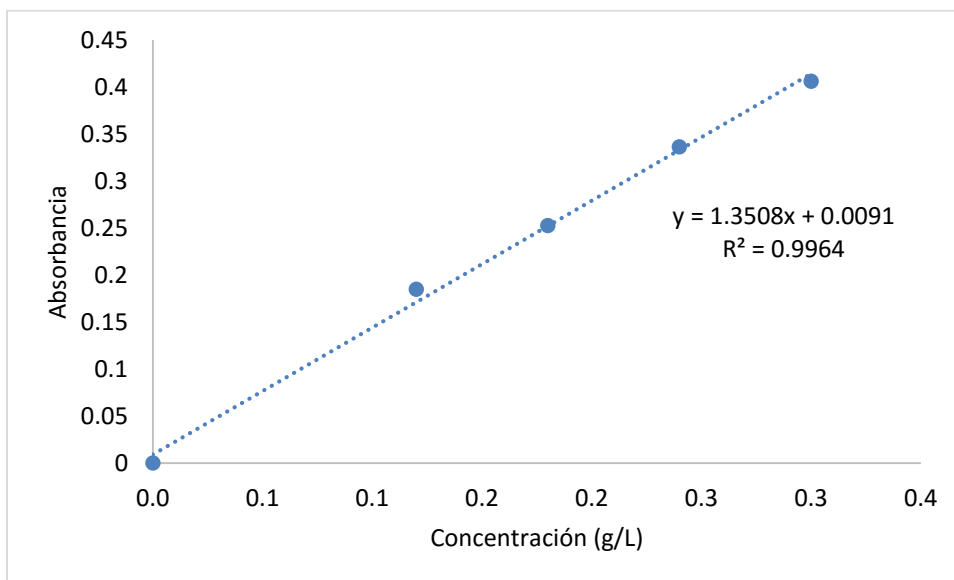


Figura 4. Curva estándar de proteína

6.7. Variables de respuesta

Las variables de respuesta utilizadas para evaluar el proceso nitrificante son las siguientes:

Eficiencia de consumo de N-NH₄⁺:

$$E_{NH_4^+} = \frac{mg \text{ de } N - NH_4^+ \frac{\text{entrada}}{L} - mg \text{ de } N - NH_4^+ \frac{\text{salida}}{L}}{mg \text{ de } N - NH_4^+ \frac{\text{entrada}}{L}} * 100$$

Rendimiento de producción N-NO₃⁻:

$$Y_{N - NO_3^-} = \frac{mg \text{ de } N - NO_3^- \frac{\text{producido}}{L}}{mg \text{ de } N - NH_4^+ \frac{\text{consumido}}{L}}$$

Velocidades específicas de consumo de NH₄⁺ y de producción de NO₃⁻:

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

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

Velocidad específica de consumo de 2-CP:

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

Donde q es la velocidad específica (mg N mg proteína⁻¹ h⁻¹) y [x] es la concentración de biomasa medida como proteína microbiana.

7. Resultados y discusión

7.1. Puesta a punto de técnicas analíticas

Las curvas de calibración se realizaron al menos por triplicado, se calcularon promedio, desviación estándar y coeficiente de variación. La tabla 6 muestra los coeficientes de determinación (R^2) así como el coeficiente de variación (CV) para las técnicas analíticas empleadas en el trabajo experimental.

Tabla 6. Técnicas analíticas empleadas

Método	Determinación	R^2	C.V. %
Electrodo de ion selectivo	Amonio	0.991 ± 0.007	0.768
Electroforesis capilar	Nitrito/Nitrato	0.996 ± 0.005	0.525
HPLC	2-CP	0.997 ± 0.003	0.384
Lowry	Proteína microbiana	0.984 ± 0.009	0.968

Todos los métodos presentaron una R^2 mayor a 0.984, lo que indica su linealidad y un coeficiente de variación menor al 10%, indicando que los métodos tienen una buena reproducibilidad.

7.2. Inóculo nitrificante en estado estacionario

Se utilizó un lodo nitrificante metabólicamente estable para minimizar las variaciones en las cinéticas debido a cambios en el metabolismo del consorcio. Para su obtención, se mantuvo un reactor nitrificante operado en continuo y monitoreado durante 75 días bajo las condiciones previamente descritas. De acuerdo al perfil obtenido se observa que hay un consumo de amonio completo y una conversión prácticamente total de amonio a nitrato, con una acumulación transitoria de nitrito, lo que indica que la nitrificación se llevó a cabo completamente. Bajo estas condiciones, la $E_{NH_4^+}$ fue de $98.72 \% \pm 0.68$ y el $Y_{NO_3^-}$ fue de 0.99 ± 0.01 g $N-NO_3^-$ / g NH_4^+ consumido. A partir del día 22 de operación se calculó la velocidad de descarga de nitrato y ésta permaneció constante con un coeficiente de variación cercano al 10%, lo que indica que el lodo nitrificante alcanzó el estado estacionario.

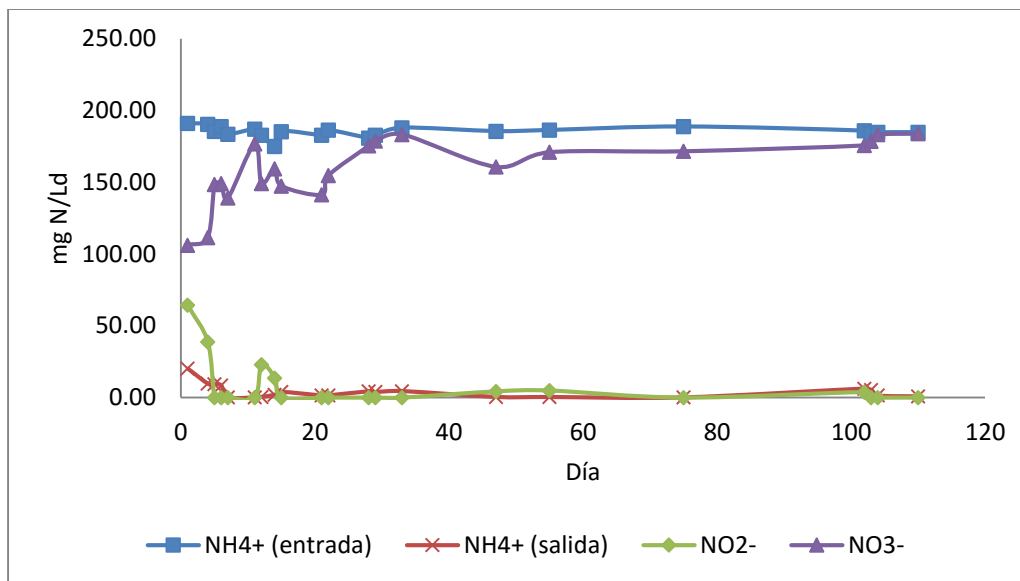


Figura 5. Perfil de la nitrificación en el reactor continuo

Tabla 7. Velocidades de descarga del reactor continuo ($\text{mg N L}^{-1} \text{ día}^{-1}$)

N-NH₄⁺	N-NO₂⁻	N-NO₃⁻
2.29 ± 2.008	1.33 ± 2.27	170.87 ± 10.05

7.3. Cinética nitrificante control

Se realizó una primera cinética por 144 horas para determinar el tiempo necesario para consumir 300 mg/L de N-NH₄⁺, a continuación se muestran los resultados obtenidos:

La Figura 6 muestra el perfil de la primera cinética en lote que se realizó. Se encontró un consumo parcial de amonio y una acumulación transitoria de nitrito durante las primeras 10 horas. Aunque el nitrito desapareció, no se observó que el amonio fuera consumido en su totalidad durante las 144 horas de duración del cultivo.

Es importante mencionar que al momento de realizar esta cinética no se tomó en cuenta que la relación C/N resultante era igual a 0.83, y es probablemente debido a esta menor cantidad de carbono inorgánico en el medio que el pH descendió y esto contribuyó a que la oxidación de amonio fuera parcial y por consiguiente hubo una menor cantidad de nitrato producido.

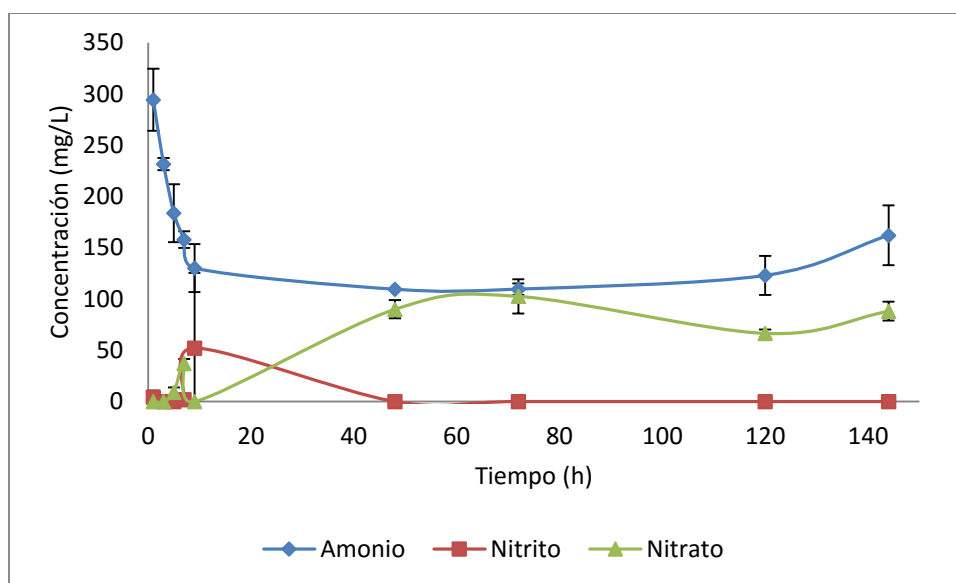


Figura 6. Perfil de la cinética control

Se calcularon las eficiencias de consumo de amonio así como el rendimiento de producción de nitrato para cada punto de la cinética (Tabla 8), encontrándose que la máxima eficiencia de consumo de amonio se da a las 48 h (63.47%) y el máximo rendimiento de producción de nitrato se encuentra a las 72 h (0.53 ± 0.07).

Tabla 8. Rendimiento de producción de nitrato y eficiencia de consumo de amonio en los diferentes tiempos de la cinética

Tiempo (h)	Rendimiento de producción de NO_3^-	Eficiencia de consumo de NH_4^+ (%)
1	0.0	4.49 ± 6.36
3	0.0	22.77 ± 1.99
5	0.07 ± 0.019	38.73 ± 9.45
7	0.26 ± 0.04	47.33 ± 2.71
9	0.0	56.59 ± 7.80
48	0.47 ± 0.04	63.47
72	0.53 ± 0.07	63.42 ± 1.88
120	0.37 ± 0.06	58.97 ± 6.32
144	0.64 ± 0.07	45.93 ± 9.71

Al obtener las muestras también se midió el pH y se encontró que después de las 24 horas éste descendía hasta 5.5 lo cual podría explicar por qué se dejó de consumir el amonio, ya

que la nitrificación puede llegar a detenerse por completo a valores de pH menores a 5. (Prosser, 1989).

7.4. Cinética nitrificante control utilizando un buffer de fosfatos

La segunda cinética fue llevada a cabo bajo las mismas condiciones que la primera pero con una duración de 72 horas y con la adición de 64.5 mL de un buffer de fosfatos 1M a pH 7.0 para evitar la disminución del pH a lo largo de la cinética.

Bajo estas condiciones se encontró que el amonio permaneció sin variación en todos los tiempos a los que se tomaron muestras y que no hubo producción de nitrito ni nitrato (Figura 7). Los resultados sugieren que el uso del buffer de fosfatos a esa concentración inhibió completamente la nitrificación.

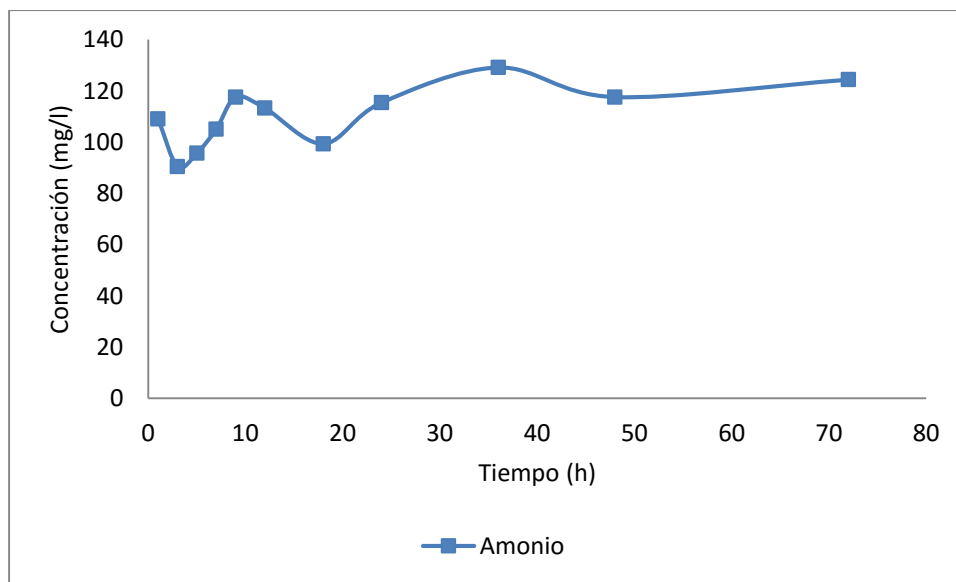


Figura 7. Perfil de consumo de amonio durante la cinética utilizando el buffer de fosfatos 1 M a pH 7.

7.5. Cinética nitrificante con diferentes tratamientos

Se realizó un tercer ensayo en lote utilizando 6 botellas por duplicado bajo las mismas condiciones que las anteriores, variando en cada una la relación C/N, dando lugar a un tratamiento diferente para evaluar el consumo de amonio y la producción de nitrato en un lapso de 24 horas (Tabla 9).

Tabla 9. Tratamientos utilizados en los ensayos en lote

	Control	Tratamiento 1	Tratamiento 2
	250 mg C-NaHCO ₃	450 mg C-NaHCO ₃	700 mg C-NaHCO ₃
	300 mg N-NH ₄ ⁺	300 mg N-NH ₄ ⁺	300 mg N-NH ₄ ⁺
	300 mg biomasa	300 mg biomasa	300 mg biomasa
	0.5 mL FeSO ₄	0.5 mL FeSO ₄	0.5 mL FeSO ₄
	24.5 mL agua	4.5 mL agua	-
Relación C/N	0.83	1.5	2.0

Se observó que la botella con el tratamiento 1 es la que presenta un mayor rendimiento de producción de nitrato (0.873 ± 0.02) y a pesar de que las botellas con el tratamiento 2 (C/N = 2.0) presentaron una mayor eficiencia de consumo, éstas no tuvieron un rendimiento de producción de nitrato tan alto (Tabla 10). Con estos resultados se muestra que con una relación C/N de 1.5 es posible llevar a cabo la nitrificación de manera completa con 300 mg/L de N-NH₄⁺, razón por la cual se mantuvo una relación C/N de 1.5 para realizar los siguientes ensayos nitrificantes y los posteriores ensayos en presencia de 2-CP.

Tabla 10. Resultados de la cinética con diferentes tratamientos

Tratamiento	Relación C/N	Eficiencia consumo NH ₄ ⁺ (%)	Rendimiento NO ₃ ⁻	Rendimiento NO ₂ ⁻	pH
Control	0.83	73.5	0.496 ± 0.03	0.075 ± 0.06	5.52 ± 0.07
1	1.5	96.7 ± 0.34	0.873 ± 0.02	0	5.49 ± 0.16
2	2.0	99.2 ± 0.74	0.621 ± 0.05	0.051 ± 0.07	7.12 ± 0.08

7.6. Cinética nitrificante con 300 mg/L de N-NH₄⁺ y 450 mg/L de C-NaHCO₃

Bajo las mismas condiciones que los ensayos anteriores se llevó a cabo una cinética con una duración de 24 h para comprobar que la nitrificación se lleva a cabo completamente cuando se utilizan 300 mg/L de N-NH₄⁺ y una relación C/N de 1.5. Se calcularon las eficiencias de consumo de amonio así como el rendimiento de producción de nitrato para cada tiempo de la cinética, donde se observó que la mayor eficiencia de consumo de amonio se obtiene a las 24

horas y es de 90.2%, así como el rendimiento de producción de nitrato que es cercano a 1 (Tabla 11). A continuación se muestran los resultados obtenidos.

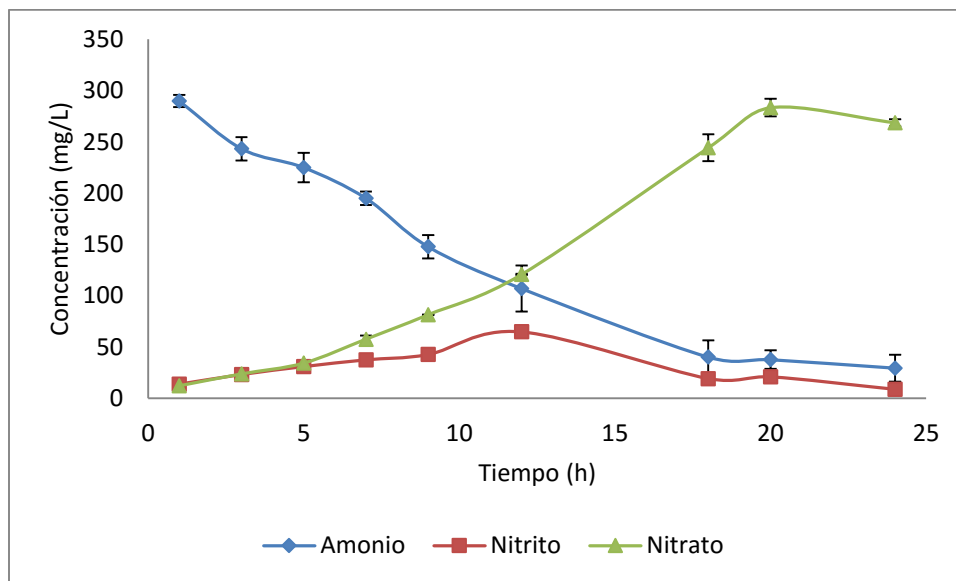


Figura 8. Perfil de la cinética con una C/N de 1.5

Tabla 11. Resultados de la cinética con una C/N de 1.5

Tiempo (h)	Eficiencia consumo	
	NH_4^+ (%)	Rendimiento producción NO_3^-
1	3.16±0.23	1.19±0.58
3	18.87±0.04	0.44±0.006
5	24.99±1.03	0.45±0.007
7	34.98±1.41	0.54±0.03
9	50.74±7.47	0.53±0.0003
12	64.34±5.41	0.62±0.002
18	86.62±3.03	0.94±0.05
20	87.44±4.36	1.04±0.05
24	90.19±1.97	0.99±0.01

Con los resultados obtenidos de esta cinética se comprobó que bajo estas condiciones, la nitrificación se lleva a cabo completamente, por lo que se eligieron como condiciones control para estabilizar el lodo nitrificante en los reactores SBR.

7.7. Estabilización de la nitrificación en los reactores SBR

Una vez determinadas las condiciones bajo las cuales la nitrificación se lleva a cabo completamente con 300 mg/L de N-NH_4^+ (relación C/N de 1.5 y 300 mg/L de proteína microbiana), se procedió a realizar la estabilización de la nitrificación en los reactores SBR. El periodo de estabilización en los reactores SBR se llevó a cabo durante 95 ciclos de operación con una duración de 24 horas cada uno. Las Figuras 9 y 10 muestran los perfiles de consumo de NH_4^+ y de producción de NO_2^- y NO_3^- en el ciclo 5 y 95 de operación, respectivamente. Se observa que siguen el perfil típico de una cinética nitrificante, en la que el NH_4^+ se consume completamente, hay una acumulación transitoria de NO_2^- y hay producción de NO_3^- .

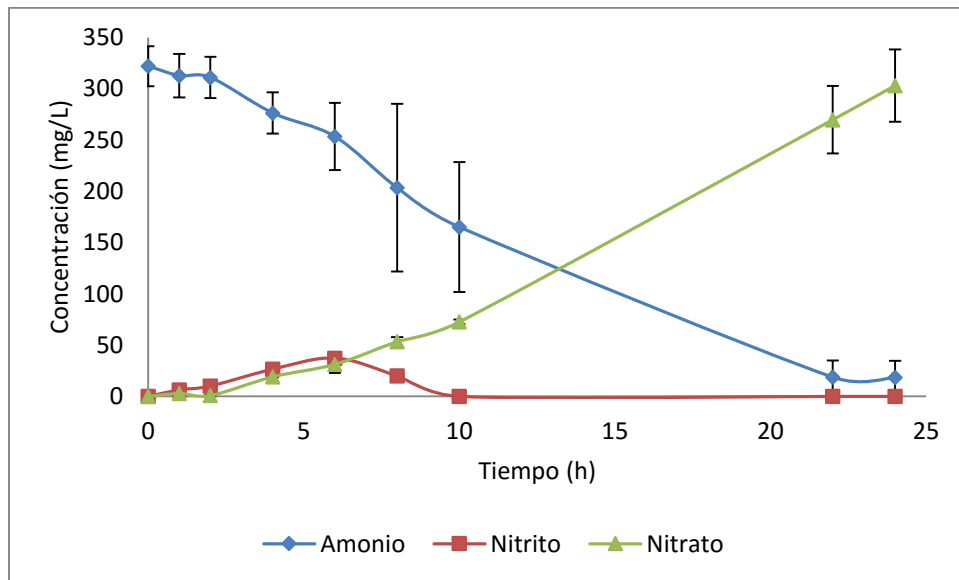


Figura 9. Perfil de la nitrificación en ambos reactores para el ciclo 5 de operación.

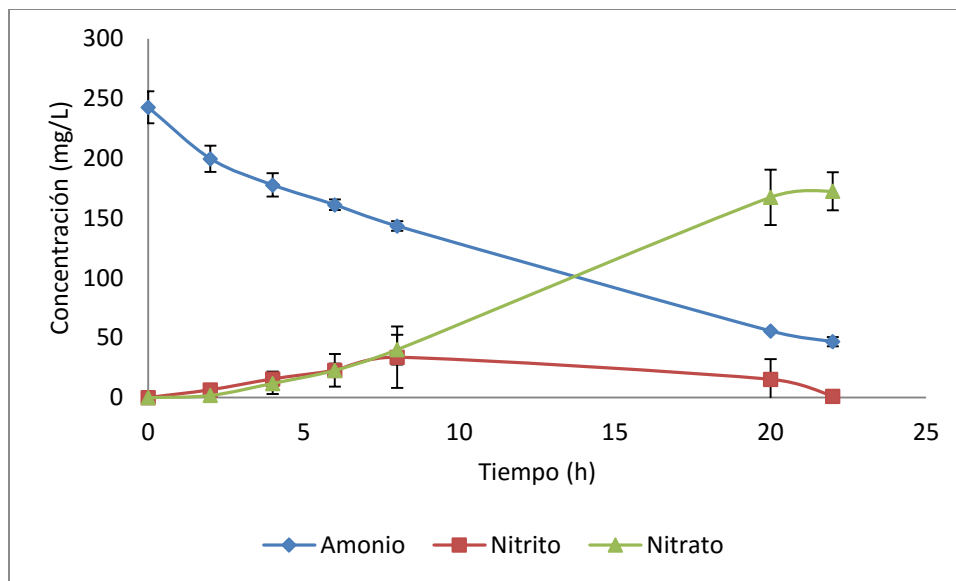


Figura 10. Perfil de la nitrificación en ambos reactores para el ciclo 95 de operación.

Para esquematizar de mejor manera el destino de los compuestos nitrogenados durante los ensayos de estabilización, a continuación se muestra el balance de nitrógeno en cada uno de los ciclos de operación en los reactores SBR:

Tabla 12. Balances de nitrógeno en la estabilización de los reactores SBR

Ciclo	NH ₄ ⁺ ent.	NH ₄ ⁺ sal.	NO ₂ ⁻ sal.	NO ₃ ⁻ sal.	N-Proteína
1	133.96±0.14	2.52±1.05	0	138.19±5.79	-
5	322.07±19.57	18.62±15.95	0	303.10±35.33	1.23±1.01
15	219.82±49.24	35.24±44.99	0	219.85±49.66	0.12±0.89
21	303.93±30.17	42.02±13.53	0	238.49±51.11	7.96±0.08
28	290.50±19.12	96.19±10.89	1.17±1.65	194.33±8.77	4.44±0.30
37	283.91±17.59	63.48±3.04	0	220.85±14.45	12.11±2.78
51	215.87±14.14	83.44±36.78	6.50±8.39	90.69±108.08	2.44±0.12
68	237.30±25.37	31.99±31.82	71.62±101.29	168.21±47.81	9.97±1.16
73	282.09±16.30	105.60±103.72	22.18±31.37	141.49±172.73	1.91±0.86
79	248.61±5.90	34.87±30.49	39.14±55.36	158.29±1.75	10.32±2.35
87	270.96±22.62	124.00±150.24	0	107.10±106.21	6.54±3.32
95	242.69±13.34	46.82±3.86	1.15±0.71	172.57±15.88	3.02±2.87

Todos los valores en mg-N/L

A lo largo de los ciclos de operación la concentración de proteína se mantuvo constante a un valor de 300 mg/L y se puede observar de la Tabla 12 que el aumento de proteína fue mínimo, indicando un proceso nitrificante principalmente desasimilativo. El NO_2^- del efluente también se mantuvo en valores bajos, salvo en los ciclos en los que hubo un problema operacional con la aireación de los reactores (ciclos 68 y 79) y debido a esto, la producción de NO_3^- y el consumo de NH_4^+ también se vieron afectados, aunque estos se normalizaron durante los ciclos finales. Este comportamiento puede observarse de mejor manera en la Figura 11:

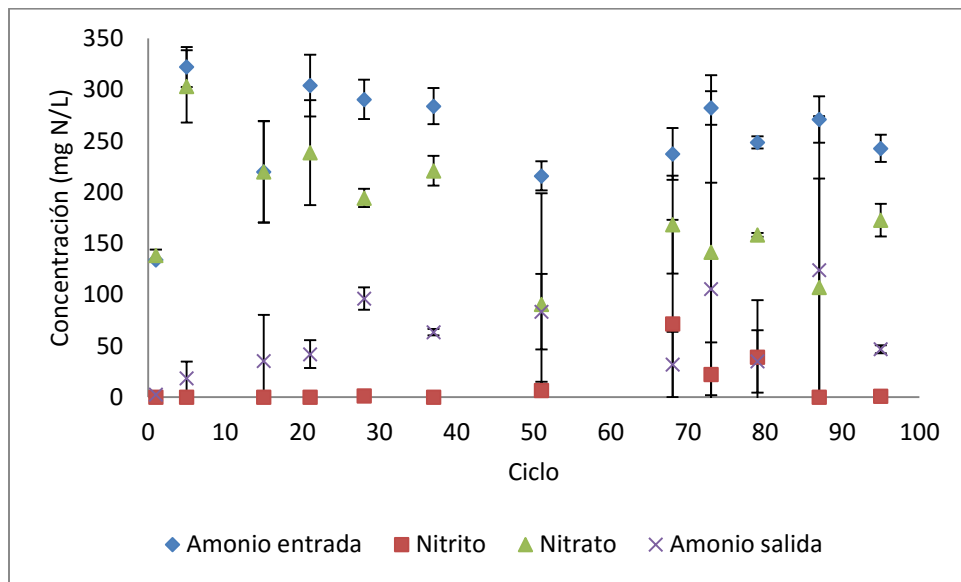


Figura 11. Perfil de los compuestos nitrogenados durante la operación de los reactores SBR

En ambos reactores los lodos nitrificantes tuvieron perfiles similares en cuanto a su comportamiento metabólico. La Tabla 13 muestra los valores de eficiencia de consumo de NH_4^+ y rendimientos de producción de NO_3^- calculados al final de las 24 h en los diferentes ciclos de operación.

Tabla 13. Eficiencias de consumo de NH_4^+ y rendimientos de producción de NO_3^- a lo largo de los ciclos de operación

Ciclo	$E_{\text{N-NH}_4^+}$ (%)		$Y_{\text{N-NO}_3^-}$	
	Reactor 1	Reactor 2	Reactor 1	Reactor 2
1	98	99	1.025	1.077
5	90	98	0.999	0.999
15	63	99	0.980	1.015
21	89	84	0.809	1.004
28	66	68	1.002	0.998
37	77	78	1.002	1.001
51	75	47	0.992	0.148
68	79	96	1.006	0.640
73	89	34	1.009	0.211
79	78	95	0.812	0.679
87	20	93	0.564	0.768
95	80	81	0.796	0.972
Promedio	80.29	83.95	0.949	0.851

$E_{\text{N-NH}_4^+}$ = Eficiencia de consumo de amonio (%)

$Y_{\text{N-NO}_3^-}$ = Rendimiento de producción de nitrato (mg N- NO_3^- producido/mg N consumido)

En el ciclo 1 y 5 la $E_{\text{NH}_4^+}$ fue de 90 y 97%, respectivamente mientras que los $Y_{\text{NO}_3^-}$ fueron de 0.999 y 0.998, indicando que todo el NH_4^+ que se consume se convierte completamente a NO_3^- . Se encontró que hubo un descenso en las eficiencias de consumo de NH_4^+ en ambos reactores, a partir del ciclo 15 para el reactor 1 y del ciclo 21 para el reactor 2, pero los rendimientos de producción de NO_3^- se mantuvieron en 1 o muy cercanos a 1. En algunos ciclos se reportan eficiencias y rendimientos bajos que son debido principalmente a problemas de operación de los reactores, ya que no contaron con la aireación necesaria y esto resultó en una acumulación de nitrito. Es importante mencionar que a pesar de que hubo una disminución en las eficiencias de consumo, lo que se busca con los ensayos de estabilidad de la nitrificación, no es necesariamente un proceso nitrificante altamente eficiente, sino un proceso estable para la posterior adición de 2-CP. Para el ciclo 95, los lodos de ambos reactores lograron recuperar eficiencias relativamente altas (80 y 81%) y rendimientos de producción de nitrato elevados (0.79 y 0.97), lo que indica que alcanzaron un estado metabólico estable. Los valores de $E_{\text{NH}_4^+}$ y $Y_{\text{NO}_3^-}$ encontrados contrastan con los obtenidos por Silva (2011), Martínez

(2013) y Salas (2014), quienes usaron lodos nitrificantes en reactores SBR y reportan consumos totales de N-NH₄⁺ al final de los ciclos de operación de sus reactores (12h, 12h y 48h, respectivamente), sin embargo, esos ensayos se realizaron bajo condiciones diferentes, siendo las principales diferencias una concentración menor de NH₄⁺ y una cantidad diferente de proteína, así como una relación C/N mayor (Tabla 14).

La Tabla 14 muestra las velocidades específicas de consumo de NH₄⁺ y producción de NO₃⁻ a lo largo de los ciclos de operación de los reactores. Para el reactor 1 se encontró que la q_{NO₃} presentó un comportamiento oscilatorio a lo largo de los ciclos de operación, mientras que la q_{NH₄} se mantuvo en valores de alrededor de 0.03 mg de N-NH₄⁺/mg proteína h. En el reactor 2 se encontró que ambas velocidades se mantuvieron constantes a partir del ciclo 21 de operación. Todos estos resultados indican que los lodos nitrificantes alcanzaron un estado estable, tanto metabólicamente como cinéticamente, y pueden ser utilizados para comenzar a estudiar el efecto del 2-CP sobre la nitrificación.

Tabla 14. Velocidades específicas de consumo de NH₄⁺ y producción de NO₃⁻ a lo largo de los ciclos de operación

Ciclo	q _{NH₄}		q _{N-NO₃}	
	Reactor 1	Reactor 2	Reactor 1	Reactor 2
1	0.0164	0.0182	0.0199	0.0216
5	0.0456	0.0501	0.0430	0.0497
15	0.0196	0.0371	0.0136	0.0361
21	0.0348	0.0392	0.0178	0.0209
28	0.0414	0.0342	0.0158	0.0166
37	0.0244	0.0247	0.0249	0.0251
51	0.0137	0.0052	0.0154	0.0031
68	0.0140	0.0256	0.0144	0.0150
73	0.0134	0.0160	0.0170	0.0035
79	0.0129	0.0325	0.0132	0.0257
87	0.0019	0.0316	0.0027	0.0324
95	0.0261	0.0230	0.0259	0.0342
Promedio	0.0238±0.011	0.0302±0.010	0.0201±0.008	0.0255±0.012

q NH₄⁺[=] mg de N-NH₄⁺/mg proteína h

q NO₃⁻[=] mg de N- NO₃⁻ /mg proteína h

En la Tabla 15 se muestran las velocidades específicas de consumo de NH_4^+ y producción de NO_3^- reportadas en la literatura, así como las velocidades específicas promedio encontradas en la operación de los reactores SBR en el presente estudio.

Es importante mencionar que aunque estos datos no pueden ser completamente comparados entre sí, debido principalmente a las diferencias en el tipo de ensayo, tipo de inóculo utilizado, tiempo de reacción, concentración de biomasa y relación C/N, entre otras, pueden ayudar a dar una idea sobre el comportamiento encontrado en este trabajo. Se observa que la principal diferencia en las velocidades reportadas y las del presente trabajo se encuentra en la $q_{\text{NH}_4^+}$. Esto puede explicarse debido a la diferencia en las concentraciones iniciales de NH_4^+ utilizadas, ya que en este trabajo es 2 veces mayor a la utilizada en los otros estudios; esta concentración elevada podría ser la causa de que se obtengan $q_{\text{NH}_4^+}$ menores a las reportadas. Sin embargo, las $q_{\text{NO}_3^-}$ que se encontraron se mantuvieron cercanas a las reportadas por Silva (2011) y Salas (2014), quienes utilizaron reactores SBR para la estabilización de la nitrificación con lodos que no tenían exposición previa a compuestos orgánicos.

Tabla 15. Velocidades específicas de consumo de NH_4^+ y producción de NO_3^- reportadas en otros estudios y las encontradas en este trabajo

Concentración inicial de NH_4^+ (mg/L)	Concentración de proteína (mg/L)	Tipo de ensayo	$q_{\text{NH}_4^+}$	$q_{\text{NO}_3^-}$	Autor(es)
100	200	Lote	0.075	0.057	Pérez-Alfaro y col. 2013
100	200	SBR	0.12±0.002	0.03±0.01	Silva, 2011
100	200	SBR	0.08±0.003	0.030±0.001	Salas, 2014
100	200	Lote	0.135±0.02	0.076±0.056	Pérez-Alfaro, 2010
100	350	SBR	0.0057	0.0064	Martínez, 2013
300	300	SBR	0.0238±0.01	0.0201±0.008	Este trabajo
			0.0302±0.01	0.0255±0.012	

$q_{\text{NH}_4^+}$ [=] mg de N- NH_4^+ /mg proteína h

$q_{\text{NO}_3^-}$ [=] mg de N- NO_3^- /mg proteína h

7.8. Ensayos abióticos en los SBRs

Para evaluar la pérdida de 2-CP por arrastre o volatilización, se realizaron ensayos abióticos en los SBRs de la manera descrita anteriormente; a continuación se muestran los resultados obtenidos.

Las Figura 12 muestra los resultados de los ensayos abióticos con 5 y 10 mg/L de 2-CP, utilizando aireación intermitente con oxígeno (durante 8 horas, aireando al inicio y cada 4 horas). Se encontró que al final de los ensayos, la pérdida de 2-CP por aireación no fue significativa ya que fue de 5.66% y 0.73%, respectivamente.

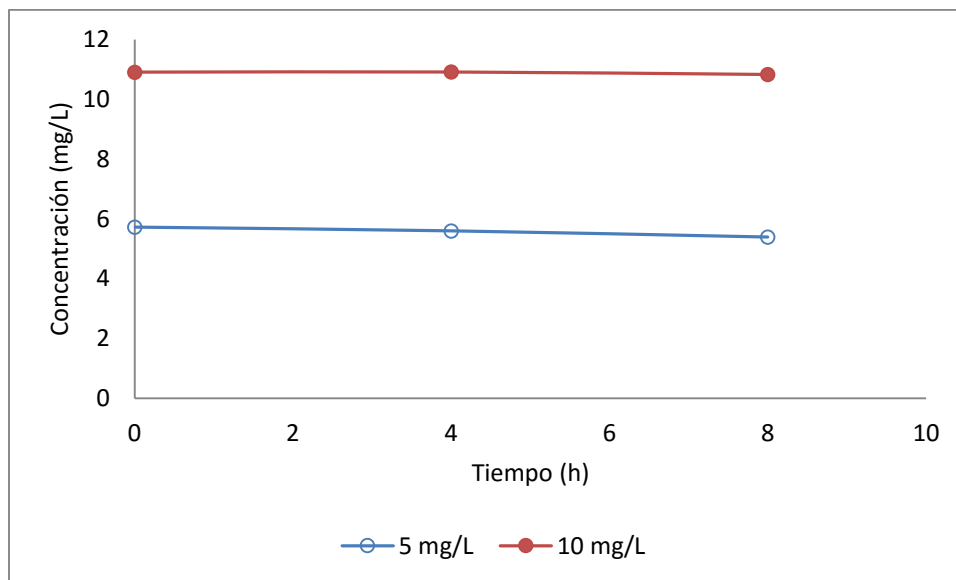


Figura 12. Ensayo abiótico con 5 y 10mg C-2-CP/L y aireación intermitente

La Figura 13 muestra las pérdidas de 2-CP al cabo de 12 horas utilizando aireación continua. Al final de este tiempo las pérdidas fueron de 13.71% y 4.04%, respectivamente. A pesar de que las pérdidas con 5 mg/L de 2-CP fueron mayores al 10%, Pérez-Alfaro y col. (2013) reportan que, utilizando una concentración de 300 mg/L de $N-NH_4^+$ y 5 mg/L de 2-CP en ensayos en lote, el consumo de este compuesto en condiciones nitrificantes se lleva a cabo en menos de 12 horas, por lo que esta pérdida no impactaría significativamente las concentraciones iniciales de 2-CP que se van a comenzar a evaluar en los reactores.

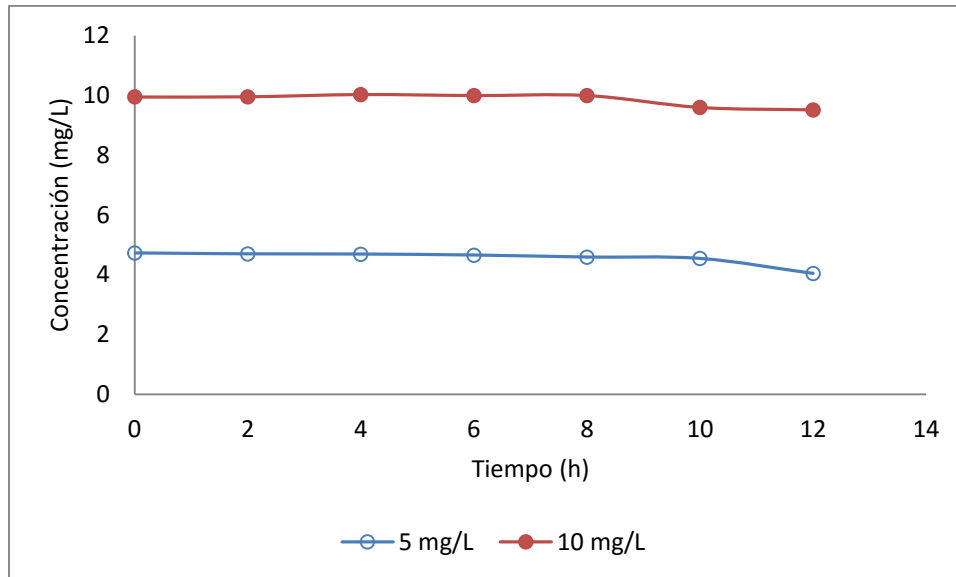


Figura 13. Ensayo abiótico con 5 y 10mg C-2-CP/L y aireación continua

7.9. Ensayos nitrificantes en presencia de 2-clorofenol

Una vez que se obtuvo el proceso nitrificante estable en los reactores SBR, se procedió a evaluar el efecto que tiene el 2-clorofenol sobre la nitrificación utilizando una concentración de 5 mg C-2-CP/L. Para esto se preparó una solución stock de 5000 mg C-2-CP/L y se agregaron a los reactores 1.1 mL de dicha solución para obtener una concentración final de 5 mg C-2-CP/L.

La figura 14 muestra el perfil de la nitrificación en ambos reactores durante el ciclo 1 de operación. Se encontró una disminución de alrededor del 35% en la concentración de amonio en las primeras 10 horas de cultivo, manteniéndose sin cambio después de 72 horas, sin embargo, no se detectó nitrito o nitrato. Bajo estas condiciones se calculó una $q_{NH_4^+}$ promedio de 0.00273 ± 0.0006 mg de N/mg de proteína h, que en comparación con los ensayos control se vieron disminuidas en un 89.5%, lo que indica que el 2-CP inhibe de forma significativa el proceso nitrificante. Estos resultados coinciden con los de Martínez (2013) quien utilizando reactores SBR y un lodo nitrificante (previamente expuesto a materia orgánica) encontró que en su primer ciclo de operación en presencia de 20 mg C-2-CP/L la velocidad de consumo de amonio disminuyó en un 99%. A pesar de que no hubo nitrificación, se observó que el lodo consumió en promedio un 23% del 2-CP alimentado en un periodo de 72 horas. Para este ciclo

se calculó una q_{2-CP} promedio de 0.00133 ± 0.0004 mg de 2-CP/mg proteína d. Un comportamiento similar en los perfiles de amonio, nitrito, nitrato y 2-CP se presentó hasta el ciclo 5 de operación. Hasta este punto, los resultados encontrados en este trabajo difieren del comportamiento reportado por Pérez-Alfaro (2015), quien utilizando ensayos en lote y una concentración de amonio de 300 mg/L y 5 mg/L de C-2-CP, encontró que la nitrificación y el consumo de 2-CP ocurren simultáneamente.

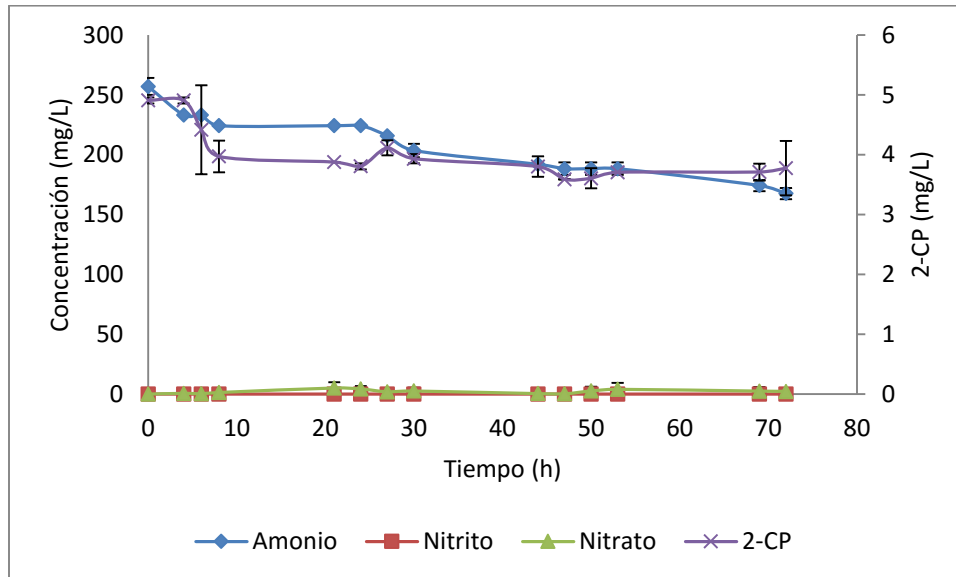


Figura 14. Perfil de la nitrificación en ambos reactores en presencia de 2-CP en el ciclo 1 de operación

Debido a que no se había detectado actividad nitrificante y a que los ciclos previos tuvieron un comportamiento muy similar al ciclo 1, en el ciclo 9 de operación la duración del ciclo se extendió hasta 168 horas. Nuevamente, la concentración de amonio disminuyó un 25% durante los primeros días del cultivo y posteriormente permaneció constante sin que se detectara producción de nitrito o nitrato (Figura 15). Durante las 168 horas, se encontró que hubo un consumo promedio de 2-CP del 85%. Se calculó una $q_{NH_4^+}$ promedio de 0.00297 ± 0.002 mg de N/mg de proteína h, que disminuyó en un 90.5% respecto al control y una q_{2-CP} de 0.0020 ± 0.0002 mg de C-2-CP/mg de proteína d.

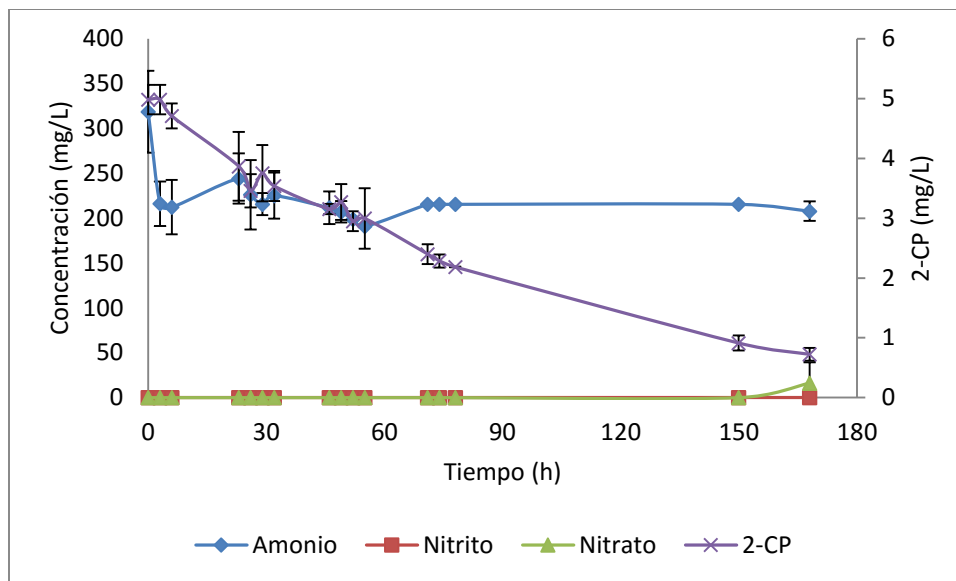


Figura 15. Perfil de la nitrificación en ambos reactores en presencia de 2-CP en el ciclo 9 de operación

En este ciclo se encontró que el pH dentro de los reactores estaba demasiado elevado (8.7-9.0) y que posiblemente era debido a esto que la cantidad de NH_4^+ disminuía sin que se observara una producción acorde de NO_2^- o NO_3^- ni tampoco un incremento en la cantidad de biomasa que justificara una posible asimilación del compuesto, por lo que se ajustó el pH (6.8-7.0) con una solución de HCl 2N y se colocó una trampa con agua para poder captar y cuantificar el NH_4^+ que se pudiera volatilizar de los reactores. El balance de nitrógeno en ambos reactores para el ciclo 9 de operación confirmó que una parte del amonio presente en los reactores se perdió por arrastre (Tabla 16).

Como resultado del control del pH, durante los ciclos 11 y 12 y como lo confirma el balance de nitrógeno, no se detectó pérdida de amonio por arrastre, sin embargo, tampoco se detectó consumo de amonio ni una producción de nitrito o nitrato considerable en ninguno de los reactores. Por otro lado, para el ciclo 12 de operación, el consumo de 2-CP fue total después de 7 días de operación (Figura 16).

En la figura 16 se muestra el perfil de ambos reactores en el ciclo 12 de operación. En el reactor 1 no se encontró consumo de amonio ni producción de nitrito o nitrato pero el 2-CP fue consumido en su totalidad en 6 días, resultando en una $q_{2\text{-CP}}$ de 0.00282 mg C-2-CP/mg proteína d. En el reactor 2 tampoco hubo consumo de amonio ni se detectó una producción significativa de nitrito o nitrato pero se encontró que el 2-CP se consumió totalmente en 72

horas, resultando ser el menor tiempo de consumo en toda la operación de los reactores; la q_{2-CP} resultante para este reactor fue de 0.00458 mg C-2-CP/mg proteína d, la cual resultó ser la velocidad más alta hallada en los ensayos.

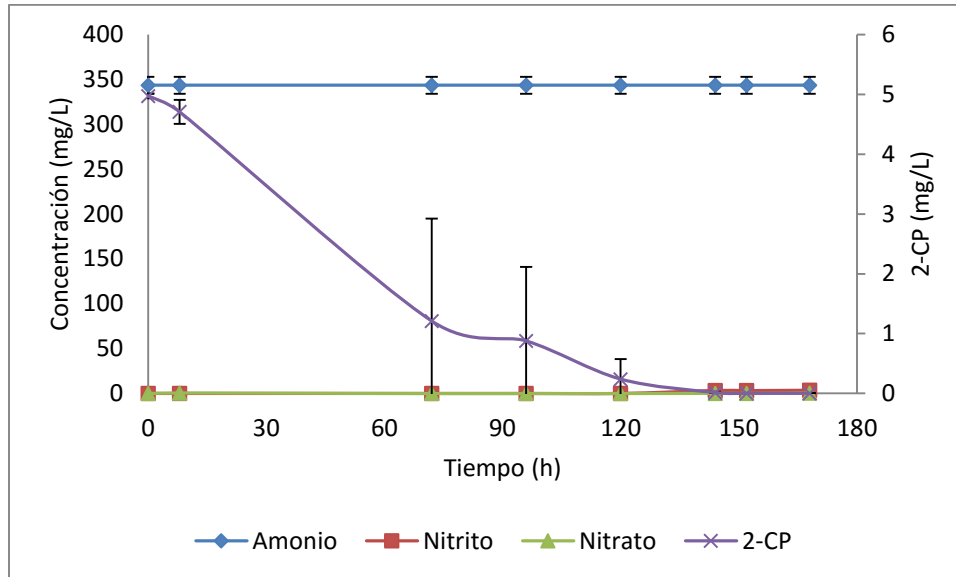


Figura 16. Perfil de la nitrificación en ambos reactores en presencia de 2-CP en el ciclo 12 de operación

Para esquematizar de mejor manera el destino de los compuestos nitrogenados durante los ensayos en presencia de 2-CP, a continuación, se muestran los balances de nitrógeno en los reactores SBR durante esta etapa:

Tabla 16. Balances de nitrógeno en los reactores SBR en presencia de 2-CP

Ciclo	NH_4^+ ent.	NH_4^+ sal.	NO_2^- sal.	NO_3^- sal.	NH_4^+ pérdida	N-proteína
1	257.13±7.07	167.60±4.61	0	2.19±0.36	-	0.029±0.04
5	308.54	221.35±6.11	0	0	-	0.02±0.05
9	318.61±45.57	207.88±10.82	0	16.25±22.99	32.33±11.40	0.76±0.05
10	324.54±37.18	287.33±32.92	0	0	27.30±4.68	0.02±0.07
11	379.11±20.98	379.11±20.98	0	0	0	0.08±0.11
12	343.56±9.51	343.56±9.51	0	0	0	0.19±0.07

En la siguiente tabla se muestran los resultados resumidos de velocidades específicas de consumo de 2-CP y NH_4^+ en ambos reactores a lo largo de los ciclos de operación:

Tabla 17. Velocidades específicas de consumo de 2-CP y NH₄⁺ a lo largo de los ciclos de operación

Ciclo	q _{2-CP}		q _{NH₄⁺}	
	(mg C-2-CP mg proteína ⁻¹ d ⁻¹)		(mg N-NH ₄ ⁺ mg proteína ⁻¹ h ⁻¹)	
	SBR 1	SBR 2	SBR1	SBR 2
1	0.00168	0.00098	0.00227	0.00319
5	0.00233	0.00089	0.00526	0.00391
9	0.00217	0.00184	0.00108	0.00486
10	0.00122	0.00170	-	-
11	0.00175	0.00356	-	-
12	0.00282	0.00458	-	-

Los resultados obtenidos en los reactores nitrificantes en presencia de 2-CP son similares a los reportados por Martínez-Hernández y col. (2010) y Pérez-Alfaro y col. (2013), quienes evaluaron el efecto del 2-CP en la nitrificación mediante ensayos en lote; ellos reportan que al igual con lo encontrado en este trabajo, al utilizar una concentración de 2-CP de 5 mg/L, la nitrificación se ve completamente inhibida ya que no hay consumo de amonio ni generación de nitrato. Bajo estas condiciones, estos autores indican que el 2-CP es consumido completamente después de 30 y 40 días, respectivamente. Sin embargo, en el presente trabajo, a los lodos nitrificantes les tomó menos tiempo consumir el compuesto, ya que en los primeros ciclos, desde los 7 días se observó su consumo y en el último ciclo éste fue consumido totalmente en 3 días. Esto se puede atribuir por un lado, a la utilización de reactores SBR, que promueve el incremento en la actividad metabólica de los lodos depuradores (Texier y col. (2006), Beristain-Montiel (2011), Moreno-Andrade y Buitrón (2012), Silva y col. (2014)) así como a la concentración de amonio presente en los reactores (300 mg/L), ya que es mayor a la utilizada en los trabajos reportados (100 mg/L), lo que podría facilitar el transporte del 2-CP hacia dentro de las células para su degradación o activar un mecanismo de transporte diferente (Pérez-Alfaro y col., 2015).

Debido a que en los primeros ciclos de operación en presencia de 2-CP se detectó una disminución en la concentración inicial de amonio, la cual se asoció a una pérdida por arrastre del compuesto nitrogenado, es posible decir que bajo las condiciones ensayadas en el presente trabajo, no se presentó un consumo de amonio (Figura 16) ni producción de nitrito o nitrato. Estos resultados difieren de lo reportado por Pérez-Alfaro (2015), quien utilizando

ensayos en lote y una concentración de amonio de 300 mg/L y 5 mg/L de C-2-CP, encontró que la nitrificación y el consumo de 2-CP ocurren simultáneamente. Los resultados encontrados en este trabajo son más parecidos a los reportados por Amor y col. (2005) y Martínez (2013), quienes encontraron que la nitrificación ocurre solamente hasta que el compuesto orgánico ha sido consumido total o casi totalmente. Puede haber varias explicaciones para el comportamiento encontrado en este trabajo. En primer lugar, se sabe que la amonio monooxigenasa (AMO), presente en las bacterias nitrificantes, es capaz de oxidar una gran variedad de compuestos orgánicos y en general se le atribuye a esta enzima la eliminación de compuestos orgánicos en condiciones nitrificantes (Keener y Arp (1994), Ely y col. (1997)), sin embargo estos compuestos también pueden dañar a la AMO. Por ejemplo, Ely y col. (1997) evaluaron el efecto de varios compuestos alifáticos clorados (tricloroetileno, 1,1-dicloroetileno, cloroformo, 1,2-dicloroetano y tetracloruro de carbono) sobre cultivos puros de *Nitrosomonas europaea*, encontrando que entre más cloros tiene un carbono, más difícil es su oxidación y de igual forma, los alquenos son degradados más lentamente que los alcanos. También reportan que estos compuestos pueden dañar a las células y específicamente, la presencia y oxidación de tricloroetileno y 1,1-dicloroetileno dañaron a la AMO, puesto que la actividad amonio oxidante del cultivo disminuyó en presencia de estos compuestos. El 2-CP podría tener un efecto similar sobre la enzima AMO, ya que su presencia inhibe el consumo de amonio, aunque también se ha reportado que podría participar en el consumo del 2-CP (Pérez-Alfaro, 2015). Por otro lado, la falta de consumo de amonio podría estar relacionada con la poca disponibilidad de oxígeno, como lo reportan Kim y col. (2007), quienes estudiaron el efecto de fenol, p-cresol y otros compuestos tóxicos sobre la nitrificación y mencionan que incluso a bajas concentraciones, el fenol puede afectar negativamente la nitrificación debido a mecanismos indirectos como el agotamiento de oxígeno, debido al rápido crecimiento de bacterias heterótrofas. Que esta situación haya ocurrido en el presente trabajo suena poco probable, ya que los reactores se mantuvieron con una aireación constante que resultó en concentraciones de oxígeno disuelto mayores a 2 mg O₂/L y no se detectó un incremento significativo en la biomasa desde la adición de 2-CP a los reactores.

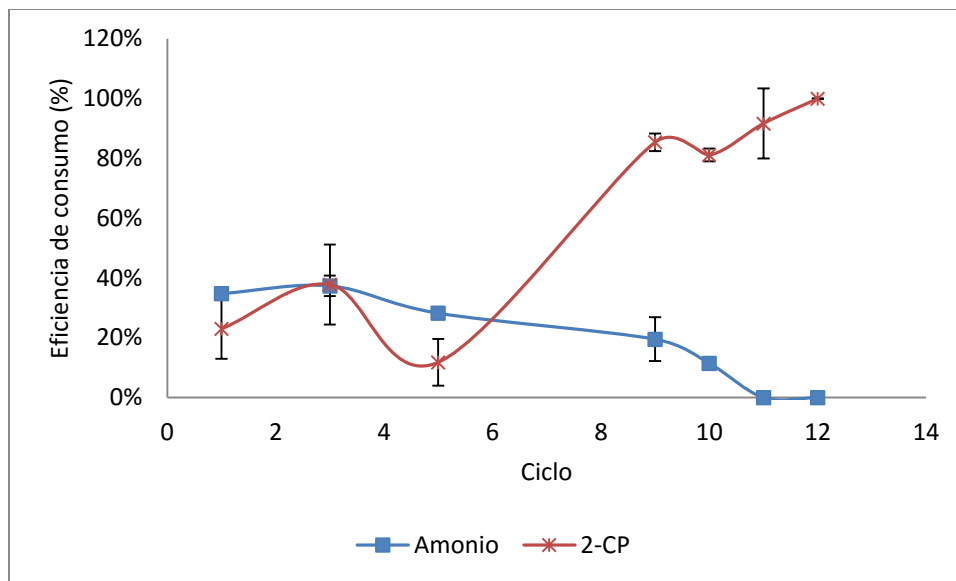


Figura 17. Eficiencias promedio de consumo de amonio y 2-CP en los reactores SBR

Por otro lado, a pesar de que no hubo actividad nitrificante, en el presente trabajo se encontró que la eficiencia de eliminación de 2-CP aumentó con el paso de los ciclos hasta alcanzar el 100% en el ciclo 12 (Figura 17). Asimismo, se encontró que las velocidades de consumo de 2-CP (q_{2-CP}), aunque pequeñas, fueron aumentando conforme pasaron los ciclos (Figura 18); puesto que en el ciclo 1, el promedio de la q_{2-CP} fue de 0.00133 ± 0.0004 mg de C-2-CP/mg de proteína d y en el ciclo 12 esta aumentó a 0.0037 ± 0.001 mg de C-2-CP/mg de proteína d, lo que representa un aumento del 278%, indicando el incremento de la capacidad metabólica de los lodos nitrificantes para oxidar el compuesto clorado.

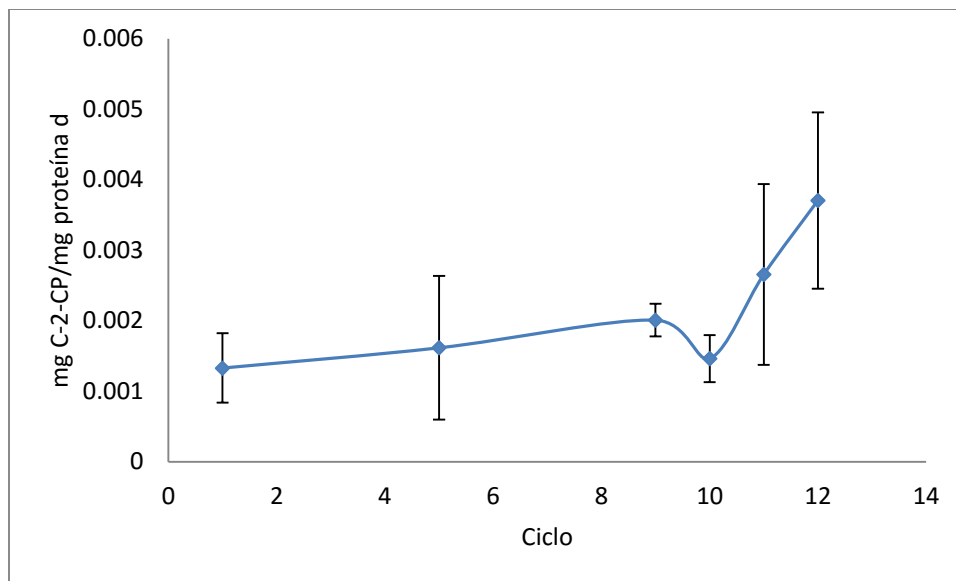


Figura 18. Velocidades específicas de consumo de 2-CP a lo largo de los ciclos de operación

Estos resultados coinciden con lo reportado por Silva y col. (2014), donde utilizaron reactores SBR para evaluar el efecto del p-cresol sobre la nitrificación y observaron que las velocidades de consumo de p-cresol aumentaron de 30 a 106 mg C-p-cresol/(g SSV h) en 120 ciclos de 12 horas; esto lo atribuyen a la utilización de reactores SBR, que al operar mediante ciclos consecutivos, permitió el incremento de la capacidad metabólica de los lodos para oxidar el compuesto fenólico. De igual forma, en el trabajo de Téllez-Pérez y col. (2013), utilizando un reactor SBR con un lodo nitrificante sin exposición previa a compuestos orgánicos, evaluaron el efecto de concentraciones incrementales (25 – 400 mg C/L) de p-hidroxibenzaldehído sobre la eliminación de amonio. Los autores mencionan que el uso de un SBR permitió la adaptación de la biomasa nitrificante al compuesto fenólico a través de los ciclos de operación, ya que después de un periodo de adaptación (70 ciclos de 12 horas), la adición de p-hidroxibenzaldehído, incluso a concentraciones de 400 mg-C/L, no tuvo un efecto significativo sobre el consumo de amonio ni sobre la producción de nitrato, además de que en todos los ciclos el compuesto fenólico fue consumido completamente. Finalmente, Zepeda y col. (2013) evaluaron el efecto de concentraciones incrementales iniciales de m-cresol sobre la nitrificación en un reactor SBR, encontrando que la adición m-cresol produjo una inhibición en el consumo de amonio y producción de nitrato reflejado en la disminución de las velocidades específicas de consumo de amonio y producción de nitrato. También encontraron que, al igual que lo observado en el presente trabajo, al incrementar las concentraciones de m-cresol, la tasa de nitrificación fue disminuyendo mientras que la velocidad de consumo de m-cresol fue

aumentando al pasar los ciclos, sugiriendo que la utilización de un SBR provocó una mejora en la estabilidad fisiológica del consorcio a través de los ciclos de operación.

7.10. Ensayos de recuperación de la nitrificación

Posterior a los ensayos de nitrificación en presencia de 2-CP, se realizaron ensayos de recuperación de la nitrificación con el fin de conocer si el efecto del 2-CP sobre la nitrificación fue inhibitorio o tóxico. En estos ensayos, después de lavar el cultivo nitrificante, se adicionaron 300 mg N-NH₄⁺/L y se realizó un nuevo ciclo extendiendo el tiempo de cultivo hasta 240 horas. La inhibición y toxicidad son dos fenómenos diferentes pero ambos dependen del tiempo de exposición y de la concentración del compuesto inhibitorio. La inhibición se define como un proceso reversible, mientras que la toxicidad como un proceso irreversible. La presencia de un compuesto tóxico para los microorganismos se refleja en una menor tasa de crecimiento de los mismos, aunque no todos los microorganismos se ven afectados de la misma forma por los mismos compuestos. Por otra parte, la toxicidad (o inhibición irreversible) indica daños al microorganismo, asociados generalmente con la muerte celular (Lotti y col. 2012).

Los resultados indicaron que en el reactor 1 no se encontró consumo de amonio ni producción de nitrato en la duración del cultivo, lo que sugiere un efecto tóxico del 2-CP sobre el lodo nitrificante. Estos resultados coinciden con los reportados por Ramos y col. (2015), quienes evaluaron el efecto de compuestos orgánicos (o-cresol, p-nitrofenol, 2-CP y quinolina), solos y en mezcla, sobre la actividad de un lodo enriquecido para realizar el proceso anammox mediante ensayos en lote. Posteriormente a estos ensayos evaluaron el efecto inhibitorio o tóxico de los compuestos realizando ensayos de recuperación. Ellos encontraron que de los compuestos ensayados, el 2-CP tuvo el mayor efecto negativo, ya que causó una disminución de más del 60% de la actividad específica anammox a una concentración de 9 mg/L. Después de realizar los ensayos de recuperación (lavando la biomasa dos veces con buffer de fosfatos), encontraron que la biomasa expuesta a 10 mg/L de 2-CP con un tiempo de cultivo de 6 horas, no logró recuperar su actividad específica, por lo que clasifican al 2-CP (junto al o-cresol y quinolina) como un compuesto tóxico para la biomasa anammox. Por el contrario, en el reactor 2 (Figura 19) se encontró que un consumo parcial de amonio ocurrió después de un periodo de 21 horas, alcanzando una E_{NH₄⁺} del 43% con un Y_{NO₃⁻} de 0.99, indicando que prácticamente

todo el amonio que se consumió fue convertido a nitrato y que el proceso más afectado fue la amonio oxidación. Estos resultados contrastan con los de los ensayos control, siendo la principal diferencia que en 24 horas se consumió completamente el amonio y éste fue oxidado a nitrato, mientras que en los ensayos de recuperación el amonio no fue consumido completamente incluso después de 240 horas de cultivo. Pérez-Alfaro (2010) estudió el efecto del 2-CP sobre la nitrificación en ensayos en lote y reporta que en lodos nitrificantes que fueron expuestos a 10 mg C-2-CP y en ausencia del compuesto clorado, la eficiencia de consumo de amonio fue de 48% después de 250 horas de cultivo, resultando en una acumulación de nitrito y sin producción de nitrato, lo que indica que el proceso nitrito oxidante fue el principal afectado a diferencia de lo encontrado en este trabajo, donde el proceso amonio oxidante fue el que se encontró más reducido. Esto podría atribuirse a las diferencias en las condiciones utilizadas para llevar a cabo los ensayos, por ejemplo, la concentración de amonio, la cantidad de biomasa, la relación C/N, el tiempo de cultivo, el tipo de ensayo y la concentración de 2-CP.

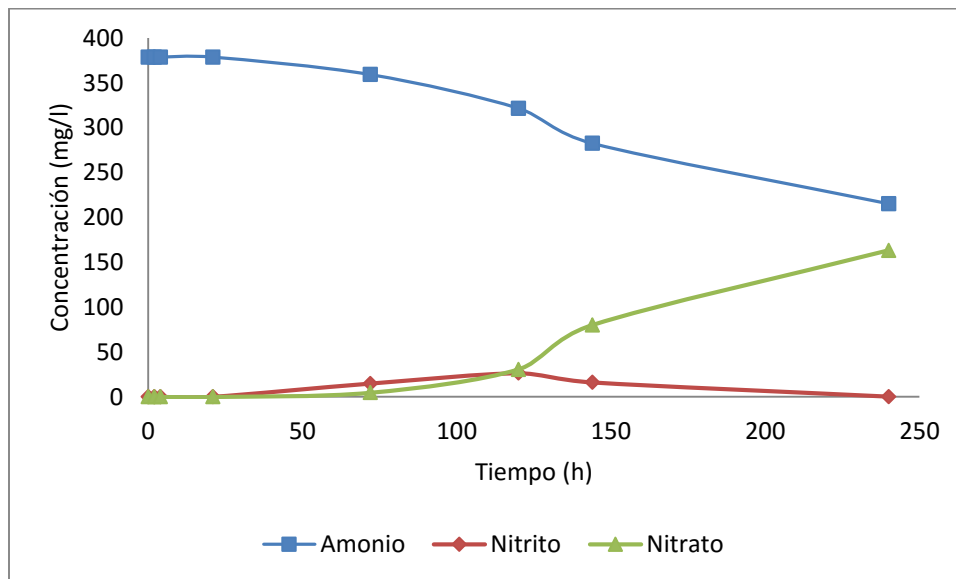


Figura 19. Perfil de la nitrificación en el ensayo de recuperación del reactor 2

En estos ensayos de recuperación, la $q_{NH_4^+}$ calculada fue de 0.0029 mg N-NH₄⁺/mg proteína h, la cual se redujo en un 90.4% respecto al promedio de velocidades calculado para el reactor 2 en los ensayos en ausencia de 2-CP (0.0302 mg N-NH₄⁺/mg proteína h, Tabla 12), mientras que la $q_{NO_3^-}$ fue de 0.00266 mg N-NO₃⁻/mg proteína h, la cual se vio reducida en un 89.5% respecto a los ensayos control (0.0255 mg N-NO₃⁻/mg proteína h, Tabla 12). Con base en los resultados obtenidos se puede observar que la exposición prolongada al 2-CP tiene un claro

efecto negativo sobre el metabolismo y cinética de los microorganismos presentes en el lodo nitrificante. Estos resultados coinciden con los reportados por Zepeda y col. (2006) quienes evaluaron el efecto del benceno, tolueno y m-xileno sobre la nitrificación en ensayos en lote y Zepeda y col. (2013) quienes evaluaron el efecto del m-cresol sobre la nitrificación en reactores SBR; en ambos casos encontraron que, en presencia de estos compuestos, el proceso mas afectado fue la oxidación de amonio, reflejado en una disminución de las velocidades específicas de consumo y en la poca acumulación de nitrito encontrada.

Con los resultados obtenidos es posible decir que el 2-CP tuvo un claro efecto negativo (tóxico e inhibitorio) sobre la biomasa nitrificante de ambos reactores, ya que en el reactor 1 se perdió completamente la actividad nitrificante, mientras que en el reactor 2 la actividad sólo se recuperó parcialmente (Figura 19). Existen algunos mecanismos conocidos por los cuales los compuestos aromáticos como el 2-CP pueden causar un efecto tóxico a las células. Uno de ellos es la hidrofobicidad de este tipo de compuestos, puesto que se ha encontrado una alta correlación entre la toxicidad del compuesto y su efecto sobre la membrana celular debido a la hidrofobicidad (Sikkema y col. 1995). De hecho, los problemas de toxicidad parecen estar asociados con la acumulación de compuestos lipofílicos en la bicapa lipídica de la membrana citoplasmática, lo que ocasiona cambios en las propiedades funcionales y estructurales de la membrana, ya que como resultado de la acumulación de moléculas lipofílicas, la membrana pierde su integridad y se genera un aumento en la permeabilidad de protones e iones (Sikkema y col. 1995).

El carácter lipofílico de un compuesto está relacionado con su carácter hidrofóbico. Está parametrizada por el coeficiente de partición de equilibrio, P de un compuesto en n-octanol y agua y se representa generalmente como $\log P$ o $\log K_{ow}$. De tal manera que entre mayor es la hidrofobicidad de un fenol monosustituido, mayor será su efecto tóxico sobre las bacterias (Selassie y col. 2015). En la Tabla 18 se muestran los $\log K_{ow}$ de algunos compuestos fenólicos encontrados en la literatura, que se han utilizado para evaluar su efecto sobre la nitrificación. Se observa que el compuesto con el $\log K_{ow}$ mas alto es el 2-CP, por lo que el elevado valor de $\log K_{ow}$ del 2-CP, respecto al de otros compuestos fenólicos monosustituídos, podría dar una idea de su hidrofobicidad y por lo tanto de su toxicidad para las bacterias.

Tabla 18. log K_{ow} de algunos compuestos fenólicos

Compuesto	log K_{ow}	Referencia
Fenol	1.48	Amor y col. (2005)
2-clorofenol	2.15	Martínez-Hernández y col. (2010), Martínez (2013), Pérez-Alfaro (2015)
o-cresol	1.99	Salas (2014)
m-cresol	1.96	Salas (2014)
p-cresol	2.00	Texier y col. (2006), Silva (2011), Salas (2014), Silva y col. (2014)
p-nitrofenol	1.91	Ramos (2015)

8. Conclusiones

- Se obtuvo un inóculo nitrificante en estado estacionario para realizar los ensayos nitrificantes en lote e inocular los reactores SBR.
- La nitrificación se realizó completamente con 300 mg N-NH₄⁺/L al utilizar una relación C/N de 1.5 y 300 mg/L de proteína microbiana.
- Se instalaron y operaron reactores SBR nitrificantes y se logró la estabilidad metabólica y cinética de la nitrificación.
- Se evaluó la nitrificación en los reactores SBR durante 95 ciclos de 24 horas y se obtuvo un lodo metabólicamente y cinéticamente estable.
- La concentración utilizada de 2-CP inhibió completamente el consumo de amonio y la producción de nitrito y nitrato.
- Después de 12 ciclos de operación, el 2-CP fue consumido totalmente después de 140 horas en el reactor 1 y 72 horas en el reactor 2.
- La velocidad de consumo de 2-CP fue aumentando conforme pasaron los ciclos en los reactores.
- Los ensayos de recuperación de la actividad nitrificante mostraron que en el reactor 1, el 2-CP ocasionó un efecto tóxico sobre la biomasa nitrificante, ya que no fue posible recuperar el consumo de amonio ni la producción de nitrato durante el cultivo, mientras que la biomasa del reactor 2, fue capaz de recuperar un 10% de la velocidad específica de consumo de amonio en comparación con el control, indicando un efecto inhibitorio del 2-CP sobre este lodo nitrificante.

9. Recomendaciones

Con la concentración de amonio utilizada en este trabajo se esperaba que la nitrificación y el consumo de 2-CP ocurrieran simultáneamente sin embargo esto no ocurrió, se encontró que la concentración evaluada de 2-CP tuvo un efecto tóxico sobre la biomasa nitrificante por lo que sería interesante utilizar lodos que ya han tenido un contacto previo con compuestos fenólicos para evaluar la nitrificación con la misma cantidad de amonio (300 mg/L) o incluso utilizar concentraciones mayores.

De igual forma, sería interesante ver si un periodo de aclimatación al compuesto inhibidor presentaría algún beneficio para el metabolismo de los microorganismos y si con esto se lograrían altas eficiencias de eliminación con concentraciones altas del compuesto fenólico. Esto, aunado al uso de reactores SBR que ayudan a la adaptación metabólica de los microorganismos mediante la operación en ciclos consecutivos, podría ayudar a disminuir el efecto inhibitorio o tóxico que presentan los compuestos fenólicos como el 2-clorofenol sobre la actividad nitrificante.

10. Referencias

- Amor, L., Eiroa, M., Kennes, C., Veiga, M.C. (2005). Phenol biodegradation and its effect on the nitrification process. *Water Research* Vol. 39, 2915 – 2920.
- Anthonisen, A., Loehr, R., Prakasam, T. and Srinath, E. (1976). Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *Journal (Water Pollution Control Federation)*, Vol. 48, No. 5, 835 – 852.
- Antoniou, P., Hamilton, J., Koopman, B., Jain, R., Holloway, B., Lyberatos, G., and Svoronos, S. (1990). Effect of temperature and pH on the effective maximum specific growth rate of nitrifying bacteria. *Water Research* Vol. 24, No. 1, 97 – 101, 1990.
- Beristain- Montiel, L. M. (2008). Metanización y mineralización del 2-clorofenol en condiciones metanogénicas. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana
- 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., Sperandio, M. (2009). Principles of nitrifying processes. En: *Environmental technologies to treat nitrogen pollution*. 1era edición. Editorial: IWA Publishing, London. pp. 23-29
- 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.
- Camargo J. A. y Alonso A. (2007). Contaminación por nitrógeno inorgánico en los ecosistemas acuáticos: problemas medio ambientales, criterios de calidad del agua, e implicaciones del cambio climático. *Ecosistemas* 16 (2007): 98-110.
- Capodaglio, A., Hlavínek, P., Raboni, M. (2015) Physico-chemical technologies for nitrogen removal from wastewaters: a review. *Ambiente&Água* Vol. 10 (2015), No. 3, 481-498.
- Ely, R., Williamson, K., Hyman, M., Arp, D. (1997) Cometabolism of chlorinated solvents by nitrifying bacteria: kinetics, substrate interaction, toxicity effects and bacterial response. *Biotechnology and bioengineering*, 1997.
- Fewtrell, L. (2004). Drinking-water nitrate, methemoglobinemia, and global burden of disease: a discussion. *Environmental health perspectives* Vol. 112 (2004) No. 14, 1371-1374.

- Hanaki, K., Wantawin, C., Ohgaki, S. (1990). Nitrification at low levels of dissolved oxygen with and without organic loading in a suspended-growth reactor. *Water Research* Vol. 24, No. 3, 297-302, 1990.
- Hooper, A., Vannelli, T., Bergman, D., Arciero, D. (1997). Enzimology of the oxidation of ammonia to nitrite by bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 71 (1997) 59-67.
- 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 (2002) 271-278.
- Keen, G., Prosser, J. (1987). Steady state and transient growth of autotrophic nitrifying bacteria. *Archives of microbiology* 147 (1987) 73-79.
- Keener, W., Arp, D. (1994) Transformations of aromatic compounds by *Nitrosomonas europaea*. *Applied and Environmental Microbiology* 60 (1994) 1914 - 1920
- Kim, Y., Park, D., Sung, D., Park, J. (2007). Inhibitory effects of toxic compounds on nitrification process for cokes wastewater treatment. *Journal of Hazardous Materials* 152 (2008) 915 – 921.
- Lotti, T., van der Star, W. R. L., Kleerebezem, R., Lubello, C., van Loosdrecht, M. C. M. (2012). The effect of nitrite inhibition on the anammox process. *Water Research* 46 (2012) 2559 – 2569.
- Martínez-Hernández S., Anne-Claire Texier, Flor de María Cuervo-López, Jorge Gómez (2010). 2-Chlorophenol consumption and its effect on the nitrifying sludge. *Journal of Hazardous Materials* (2010).
- Martínez, M. (2013) Evaluación del efecto del 2-clorofenol en la nitrificación utilizando un reactor de lote secuenciado. Tesis de especialidad. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Moreno-Andrade, I., Buitrón, G. Biodegradation of 4-methylaniline in a sequencing batch reactor. *Water Science & Technology* (2012) 1081 - 1086
- Obaja D., S. Mace, J. Costa, C. Sans, J. Mata-Alvarez (2001) Nitrification, denitrification and biological phosphorus removal in piggery wastewater using sequencing batch reactor. *Bioresource Technology* 87 (2003) 103–111
- Pérez-Alfaro J. E. (2010). Efecto del 2-clorofenol sobre la nitrificación. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana.

- Pérez-Alfaro J. E.^a& G. Buitrón& J. Gomez & A.-C. Texier& F. M. Cuervo-López (2013) Kinetic and Physiological Evaluation of Ammonium and Nitrite Oxidation Processes in presence of 2-Chlorophenol. *Applied Biochemistry and Technology* 169(3):990-1000
- Pérez-Alfaro J. E.^b& G. Buitrón & J. Gomez& A.-C. Texier& F. M. Cuervo-López (2013). Reducción del efecto inhibitorio del 2-clorofenol en la nitrificación por la presencia de altas concentraciones de amonio. Segundo Simposium: Perspectivas en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana.
- 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. (1989) Autotrophic nitrification in bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* 30.pp 125-181
- Ramos, C., Fernández, I., Suárez-Ojeda, M. E., Carrera, J. (2015) Inhibition of the anammox activity by aromatic compounds. *Chemical Engineering Journal* 279 (2015) 681-688.
- Salas, J. A. (2014) Oxidación de cresoles por un lodo nitrificante en un reactor de lotes secuenciados. Tesis de especialidad. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Selassie, C., Verma, R. P. (2015) QSAR of toxicology of substituted phenols. *Journal of Pesticide Science* Vol. 40 No. 1 (2015) 1 – 12
- Shammas, N. (1986) Interactions of pH, temperature and biomass on the nitrification process. *Water Pollution Control Federation.* Vol. 58, No. 1 (1986) 52 - 59
- Sikkema, J., de Bont, J. A. M., Poolman, B. (1995) Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews* Vol. 59 No. 2 (1995) 201 - 222
- Silva, C. D. (2011) Estudio fisiológico de la nitrificación y oxidación del p-cresol en un consorcio nitrificante. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Silva, C., Beristain-Montiel, L., Cuervo-López, F., Texier, AC. (2014) p-Cresol mineralization and bacterial population dynamics in a nitrifying sequential batch reactor. *Journal of Environmental Sciences* 26 (2014) 1885 – 1893.
- Speck, E., Bock, E. (2005) Nitrifying bacteria. En: *Bergey's manual of systematic bacteriology.* (R.E. Buchanan and N.E. Gibson Eds). Williams and Wilkins Baltimore 2da edición.

- Substance priority list (2013) U.S. Department of Health and Human Services, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2013.
- Téllez-Pérez, S. K., Silva, C. D., Texier, A. C. (2013) Oxidación simultánea de amonio y p-hidroxibenzaldehído en un reactor de lotes secuenciados. Revista Mexicana de Ingeniería Química Vol. 12 No. 1 (2013) 97-104.
- 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., Gómez J., Cuervo-López F. M. (2013) Inhibitory, toxic and structure effects of toluene on microbial consortia involved in wastewater treatment. Toluene: chemical properties, applications and technology. 93-123
- Toxicological profile for chlorophenols (1999). U.S. Department of Health and Human Services, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1999.
- Van Breemen, N. (2002). Nitrogen cycle: Natural organic tendency. Nature. 415: 381-382
- Zepeda, A., Texier A.C., Razo-Flores E., Gomez, J. (2006). Kinetic and metabolic study of benzene, toluene and m-xylene in nitrifying batch cultures. Water research 40 (2006) 1643– 1649.
- 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