



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA**

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL 2-CLOROFENOL EN LA
NITRIFICACIÓN UTILIZANDO UN REACTOR DE LOTE
SECUENCIADO (SBR)**

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO DE:
ESPECIALISTA EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA:

I.B.I. MIGUEL ÁNGEL MARTÍNEZ JARDINES

DIRECTORA DEL TRABAJO:

Dra. FLOR DE MARÍA CUERVO LÓPEZ

MÉXICO, D.F.

JULIO 2013

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.

MIEMBROS DEL JURADO

DIRECTORA DE TESIS

Dra. FLOR DE MARÍA CUERVO LÓPEZ



REVISOR EXTERNO

M. en B. JESÚS EMMANUEL PÉREZ ALFARO



AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Flor de María Cuervo López por la dirección, asesoría y revisión de este trabajo. Gracias por su profesionalismo, dedicación, consejos y el tiempo invertido en mi formación.

Al M. en B. Emmanuel por su colaboración a este trabajo, sus sugerencias, disposición, críticas constructivas y el tiempo invertido en la revisión de la tesis.

A los compañeros y amigos del laboratorio de fisiología microbiana, Diego, Emir, Ricardo, Karina, Sergio, Gehovana, Alex, Jaqueline y Toño, gracias por sus consejos y el buen ambiente de trabajo.

A mis amigos Xoch, Towy, Chris, Fer y Tacho por su compañía, consejos y apoyo en los momentos difíciles, gracias.

DEDICATORIAS

A mi familia

Por su confianza y apoyo incondicional

A María

Por su amor y compañía en los buenos y malos momentos

A don Che

Donde quiera que se encuentre

ÍNDICE

1. PANORAMA GENERAL.....	1
2. NITRIFICACIÓN.....	4
2.1. Aspectos bioquímicos de la nitrificación	6
2.2. Microbiología de la nitrificación	7
2.3. Factores que afectan la nitrificación	8
2.3.1. Efecto de la temperatura	8
2.3.2. Efecto del pH	9
2.3.3. Efecto del oxígeno	10
2.3.4. Efecto de la materia orgánica	11
3. NITRIFICACIÓN, MATERIA ORGÁNICA Y 2-CLOROFENOL	13
4. NITRIFICACIÓN EN REACTORES DE LOTES SECUENCIADOS (SBR)	14
5. JUSTIFICACIÓN	16
6. HIPÓTESIS.....	16
7. OBJETIVOS	16
7.1. General.....	16
7.2. Particulares.....	16
8. MATERIAL Y MÉTODOS.....	17
8.1. Reactor	17
8.2. Medio de cultivo	17
8.3. Fuente de inóculo	18
8.4. Cultivo en el reactor de lote secuenciado (SBR)	19
8.5. Ensayos abióticos	19
8.6. Ensayos nitrificante control	20
8.7. Proceso nitrificante en presencia de 2-Clorofenol	20
8.8. Variables de respuesta	20
8.9. Métodos analíticos	22
8.9.1. Cuantificación de amonio.....	22
8.9.2. Cuantificación de nitrito y nitrato.....	24
8.9.3. Cuantificación de 2-Clorofenol.....	25

8.9.4. Cuantificación de proteína microbiana.....	26
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
9.1. Estabilidad y adaptación de la nitrificación.....	28
9.2. Ensayos abióticos	31
9.3. Cinética nitrificante control	32
9.4. Proceso nitrificante en presencia de 2-Clorofenol.....	35
9.5. Consumo de 2-Clorofenol.....	41
10. CONCLUSIONES.....	43
11. REFERENCIAS.....	44

1. PANORAMA GENERAL

En la actualidad, es claro que el ser humano tiene una influencia notable sobre los ecosistemas del planeta. El crecimiento de la población lo ha llevado a conseguir cada vez más recursos para su supervivencia. Las actividades que realiza en lo cotidiano, así como en el ramo tecnológico o industrial, han provocado que la problemática de la contaminación de los cuerpos acuáticos vaya en aumento día con día, y que los cursos de agua, arrastren compuestos muy variados y a concentraciones muy diversas. En general, se puede decir que los problemas de contaminación por desechos industriales se agravan por la falta de tratamiento de los efluentes finales, por el gran desarrollo industrial, que genera efluentes más complejos y contaminantes y por la falta de planes reguladores para el establecimiento de industrias (Monroy y col., 2000, 2006). La composición de los efluentes contaminantes varía con el tipo de industria y con el tipo de proceso que se lleva a cabo. Dentro de las sustancias disueltas hay elementos orgánicos que pueden ser biodegradables o no, y/o elementos inorgánicos nitrogenados como el amonio, nitrato o nitrito (Camargo y Alonso, 2006). Estos compuestos pueden repercutir en la salud de muchos seres vivos.

Uno de los compuestos contaminantes nitrogenados encontrados en efluentes tanto industriales como municipales es el amonio (NH_4^+). Debido a las actividades humanas, la cantidad generada de amonio cada vez es mayor (Bremmen, 2002). Particularmente, los efluentes de la industria química, refinería del petróleo, la textil, tenerías, procesadoras de alimentos y papel, producción de látex, manufactureras de explosivos, plaguicidas, entre otras, contienen altas concentraciones de compuestos nitrogenados (Lens y col., 1998). En la industria química y del refinado del petróleo se pueden alcanzar concentraciones de hasta $10 \text{ g NH}_4^+/\text{l}$ (Prosser, 1989). En ecosistemas acuáticos el amonio es uno de los causantes de la eutrofización, que trae como consecuencia la muerte de organismos por asfixia (Bock y col., 1986; Prosser, 1989). Además, la contaminación por nitrógeno inorgánico podría inducir efectos perjudiciales sobre la salud humana (Camargo y Alonso, 2007). Genera

malestares como dolor de cabeza e incluso desmayos, irritación de ojos, nariz y garganta, asimismo, su presencia en el agua impide consumirla.

Además del amonio, los compuestos fenólicos pueden estar presentes en los efluentes industriales en altas concentraciones. Dentro de los compuestos fenólicos, los halogenados, en particular los clorados como el 2-Clorofenol (2-CP), se encuentran contaminando suelos y acuíferos, debido a su uso generalizado como parte estructural de pesticidas y preservantes en la industria de la madera (Puhakka y col. 1995). Aunque actualmente su uso para este fin está prohibido en casi todo el mundo, en muchos países madereros, los problemas de contaminación por clorofenoles persisten debido a su alta vida media en el ambiente (Gallego y col., 1998). El 2-CP también se utiliza en las industrias petroquímicas, textiles y de papel (Kostyal, 1997). Es un compuesto soluble en agua (2.8 g/ 100 mL de H₂O) (Solomons, 2000), por lo que puede migrar fácilmente y contaminar el medio acuoso. Este compuesto es considerado por la OSHA (Occupational Safety and Health Administration) como un contaminante serio debido a su toxicidad y persistencia en el medio ambiente. Los clorofenoles y el 2-CP podrían llegar a ser cancerígenos y mutagénicos (Armenante y col., 1999), por lo que su impacto ambiental en el aire, el agua y el suelo es significativo (Majumder, 2007).

De acuerdo a lo anterior, surge la necesidad de implementar sistemas de tratamiento que nos permitan eliminar tanto al amonio como al 2-CP de los efluentes industriales. Para eliminar nitrógeno amoniacal del agua se puede hacer uso de tratamientos fisicoquímicos y/o biológicos. Uno de los principales procedimientos fisicoquímicos para eliminar nitrógeno amoniacal del agua es el arrastre de amoniaco o “stripping”, que consiste en alcalinizar el agua hasta alcanzar un pH entre 10.5 y 11.5, de forma que el equilibrio NH₄⁺/NH₃⁺ esté desplazado hacia la formación de amoniaco y éste último sea eliminado mediante una corriente de aire (EPA, 1987). La desventaja de este proceso es el elevado costo de la aireación y que el amoniaco sólo se separa del efluente y no se le transforma a un compuesto menos dañino, transportándolo del agua a la atmósfera. Para la eliminación fisicoquímica de compuestos de tipo fenólico

de las aguas residuales, en general existen tres formas: a) La retención (adsorción) sobre un agente externo cuya reutilización o disposición final esté asegurada, b) el uso de agentes físicos que destruyen químicamente las moléculas hasta llevarlas a subproductos y, c) técnicas que se basan en el aprovechamiento de la capacidad de los fenoles para reaccionar con otras sustancias dando lugar a compuestos de menor solubilidad y así poder separarlos del efluente (Pérez A, 2010). De manera general, los tratamientos fisicoquímicos para eliminar amonio y 2-CP del agua podrían ser efectivos y rápidos, sin embargo, generan costos elevados de inversión y operación, además, presentan el grave inconveniente de trasladar el problema ambiental de un lugar a otro. Tomando en cuenta lo anterior, los procesos biológicos, tienen una gran ventaja, por ejemplo mediante la nitrificación, definida como un proceso respiratorio aerobio en donde el amonio, es secuencialmente oxidado a nitrito y posteriormente a nitrato (Bernet y Spérandio, 2009). Posteriormente a ésta, mediante la desnitrificación, que produce nitrógeno molecular a partir de la reducción de nitrito o nitrato, es posible eliminar completamente los contaminantes nitrogenados y convertirlos a compuestos inocuos. Asimismo, mediante la desnitrificación, también es posible oxidar simultáneamente materia orgánica de tipo fenólica hasta CO_2 (Hernández 2005; Hernández y col., 2008).

2. NITRIFICACIÓN

Desde hace más de 100 años, la nitrificación ha sido estudiada como parte del ciclo del nitrógeno, para comprender su papel en ecosistemas acuáticos y terrestres (Winogradsky, 1890). La nitrificación es la oxidación biológica del amonio a nitrato (NO_3^-) a través de nitrito (NO_2^-). Se trata de un proceso respiratorio aerobio donde las bacterias nitrificantes utilizan amonio o nitrito como fuente de energía, dióxido de carbono como fuente de carbono y oxígeno molecular como aceptor final de electrones (Prosser, 1989).

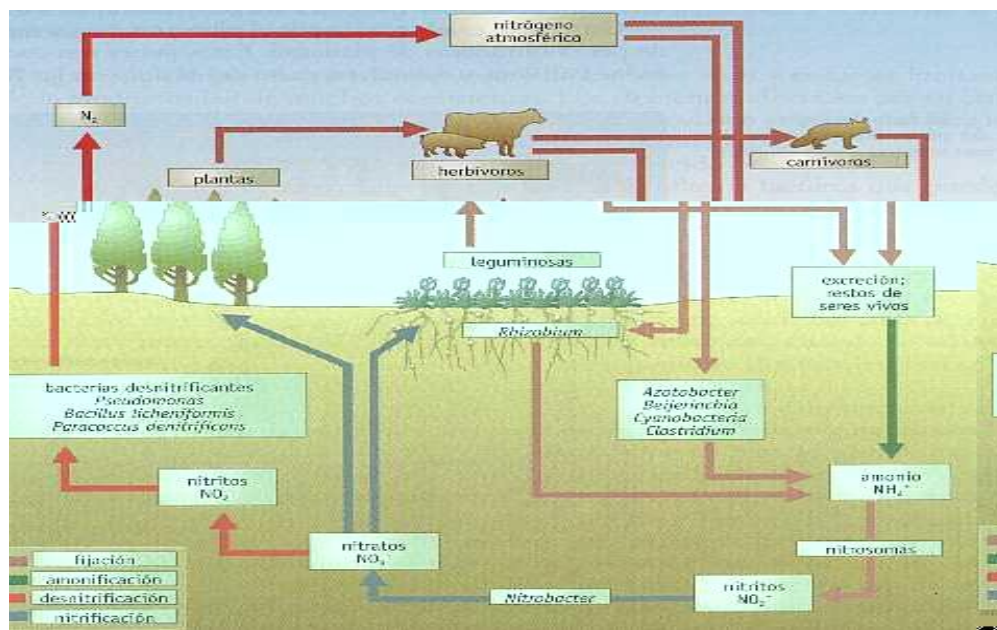


Figura 1. Ciclo del Nitrógeno.

Se ha investigado extensamente a la nitrificación como una primera etapa de eliminación de nitrógeno en el tratamiento biológico de aguas residuales, puesto que la oxidación del amonio y de nitrito a nitrato, puede ser acoplada en una segunda etapa a la desnitrificación, proceso mediante el cual el nitrato es convertido a nitrógeno molecular (Gijss and Robertson, 1994).

La nitrificación se realiza en dos etapas sucesivas. En una primera etapa de la ruta metabólica, el amonio es oxidado a hidroxilamina (NH_2OH) por las bacterias amonio

oxidantes (AOB por sus siglas en ingles) y la oxidación de la hidroxilamina a nitrito se lleva a cabo por la actividad de la enzima hidroxilamina óxido-reductasa. Posteriormente, el nitrito es oxidado a nitrato (nitratación) por las bacterias nitrito oxidantes (NOB, por sus siglas en ingles) (Prosser, 1989; Bock y col., 1991). En cada etapa, las respectivas bacterias nitrificantes utilizan amonio o nitrito como fuente de energía, oxígeno molecular como aceptor final de electrones y CO₂ como fuente de carbono. En la naturaleza, la nitrificación es un proceso que se lleva a cabo en conjunto con la desnitrificación, manteniendo una eficiente recirculación del nitrógeno, pero debido a la enorme generación de amonio por el hombre, la velocidad de recirculación de este elemento puede verse disminuida y causar grandes problemas ambientales (Pérez A, 2007).

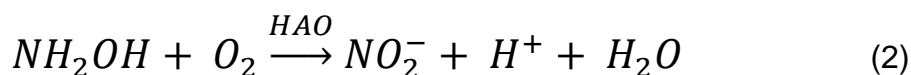
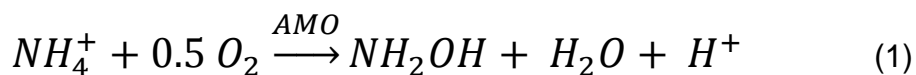
El rendimiento de energía libre estándar (ΔG°) de la oxidación del amonio a nitrito es -275 kJ/mol, lo cual indica que esta oxidación es el paso principal donde las AOB pueden obtener energía (Tabla 1). El ΔG° para la oxidación de nitrito a nitrato es menor que para la oxidación de amoníaco a nitrito y la consecuencia es un menor rendimiento de crecimiento de las NOB que de las AOB (Bernet y Spérandio, 2009). Debido a la baja disponibilidad de energía para la biosíntesis celular en el proceso respiratorio, el crecimiento de las bacterias nitrificantes es lento y escaso, incluso en condiciones óptimas. Por ejemplo, se han encontrado algunos valores de rendimiento de crecimiento de 0,08 g de células/g N-NH₄⁺ para AOB y 0,05 g de células / g N-NO₂ para NOB, respectivamente (Wiesmann, 1994).

Tabla 1. Reacciones y valores de ΔG° de amonio y nitrito oxidación en el proceso nitrificante (Texier y col., 2012).

Reacciones	Ecuaciones	ΔG° (kj/reacción)
Amonio oxidación	$\text{NH}_4^+ + 0.5\text{O}_2 \rightarrow \text{NH}_2\text{OH} + \text{H}^+$	-8
	$\text{NH}_2\text{OH} + \text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}$	-267
Reacción global	$\text{NH}_4^+ + 1.5 \text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_2^- + 2\text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}$	-275
Nitrito oxidación	$\text{NO}_2^- + 0.5 \text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_3^-$	-74

2.1. Aspectos bioquímicos de la nitrificación

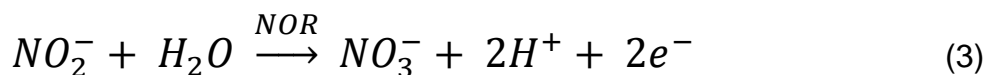
El proceso amonio-oxidante, se lleva a cabo por dos reacciones. En la primera de ellas, catalizada por la enzima amonio monooxigenasa (AMO), el amonio es convertido a hidroxilamina (Ec. 1) (Castingnetti y Hollocher, 1985) y posteriormente, en una segunda reacción, ésta es convertida a nitrito (Ec. 2) mediante la acción de la enzima hidroxilamina oxidoreductasa (HAO) (Andersson y col., 1984).



En la primera reacción de conversión de amonio a hidroxilamina (NH_2OH), uno de los átomos de oxígeno O_2 se transfiere al NH_3^+ , produciendo la hidroxilamina, mientras que el otro está implicado en la formación de H_2O (Hollecher y col., 1981). La AMO está localizada en la membrana citoplasmática. La AMO ha mostrado la capacidad para la co-oxidación de numerosos compuestos orgánicos, incluyendo alifáticos recalcitrantes, aromáticos y moléculas halogenados (Juliette y col, 1993; Keener y Arp, 1993, 1994; McCarty, 1999). La segunda reacción de la oxidación de amoníaco, la conversión NH_2OH en NO_2^- , es catalizada por el complejo enzimático del sistema HAO, que está situado en el espacio periplásmico (Whittaker y col., 2000). Dos de los electrones producidos en la segunda reacción se utilizan para compensar la entrada de electrones de la primera reacción, mientras que los otros dos se pasan a través de una cadena de transporte de electrones a la oxidasa terminal, generando así una fuerza motriz de protones (Kowalchuk y Stephen, 2001). Esta fuerza motriz de protones se utiliza como fuente de energía para la producción de ATP.

Se puede observar que durante la amonio-oxidación se produce acidez (formación de protones) y que esta reacción es de gran consumo de oxígeno: 1.5 mol de oxígeno por mol de amoníaco, lo que es 3.43 g de oxígeno por g de nitrógeno amoniacal (Bernet y Spérandio, 2009). En el segundo paso de la nitrificación, el

nitrito es oxidado a nitrato por las bacterias nitrito-oxidantes. Esta reacción (ecuación 3) es catalizada por una nitrito óxidoreductasa (NOR). El nitrito es el donante de electrones, mientras que el oxígeno es el aceptor final de éstos.



2.2 Microbiología de la nitrificación

Las bacterias amonio oxidantes se han dividido de acuerdo a sus características fenotípicas en cinco géneros: *Nitrosomonas*, *Nitrosolobus*, *Nitrosovibrio*, *Nitrosococcus* y *Nitrospira* (Watson y col., 1989). El género más estudiado sigue siendo *Nitrosomonas*. Con base en los análisis comparativos de las secuencias del 16S rRNA, las AOB se dividen en dos grupos pertenecientes a *Protobacteria: beta* y *gamma*. *Nitrosomonas*, *Nitrospira*, *Nitrosovibrio*, *Nitrosolobus* y *Nitrosococcus mobilis* constituyen un conjunto cercanamente relacionado con la subclase *beta* de *Protobacteria* (Head y col., 1993; Teske y col., 1994). Mientras que *Nitrosococcus oceanus* y *Nitrosococcus halophilus* pertenecen a la subclase *gamma* de *Protobacteria* (Purkhold y col., 2000).

Las bacterias nitrito oxidantes que han podido ser cultivadas se han clasificado en cuatro géneros reconocidos como: *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospira* y *Nitrospina*. Los dos primeros son parte de la subclase *alfa* y *gamma* de *Protobacteria* respectivamente (Teske y col., 1994) mientras que *Nitrospira* forma una división por separado llamada *Nitrospira-phyllum* (Ehrich y col., 1995) (Figura 2). En el caso particular de *Nitrospina*, su afiliación filogenética no está aún del todo clara. Originalmente se le asociaba a la subclase *delta* de *Protobacteria* (Teske y col., 1994) pero estudios más recientes (Schramm, 2003) señalan que no pertenece a esa categoría, y podría estar más cercana al *phyllum* de *Acidobacterium/Holophaga*. Las NOB están catalogadas como quimioautótrofas, ya que utilizan el nitrito como fuente de energía para asimilar carbono inorgánico para su crecimiento. Sin embargo, no

todas las NOB son quimioautótrofas obligadas. De hecho, algunas cepas de *Nitrobacter* pueden crecer heterotróficamente (donde la energía y el carbono son obtenidos de una fuente orgánica de carbono) o mixotróficamente (nitrito como fuente de energía y acetato o piruvato como fuente de carbono) (Smith y Hoare, 1968; Steinmüller y Bock, 1977; Watson y col., 1989).

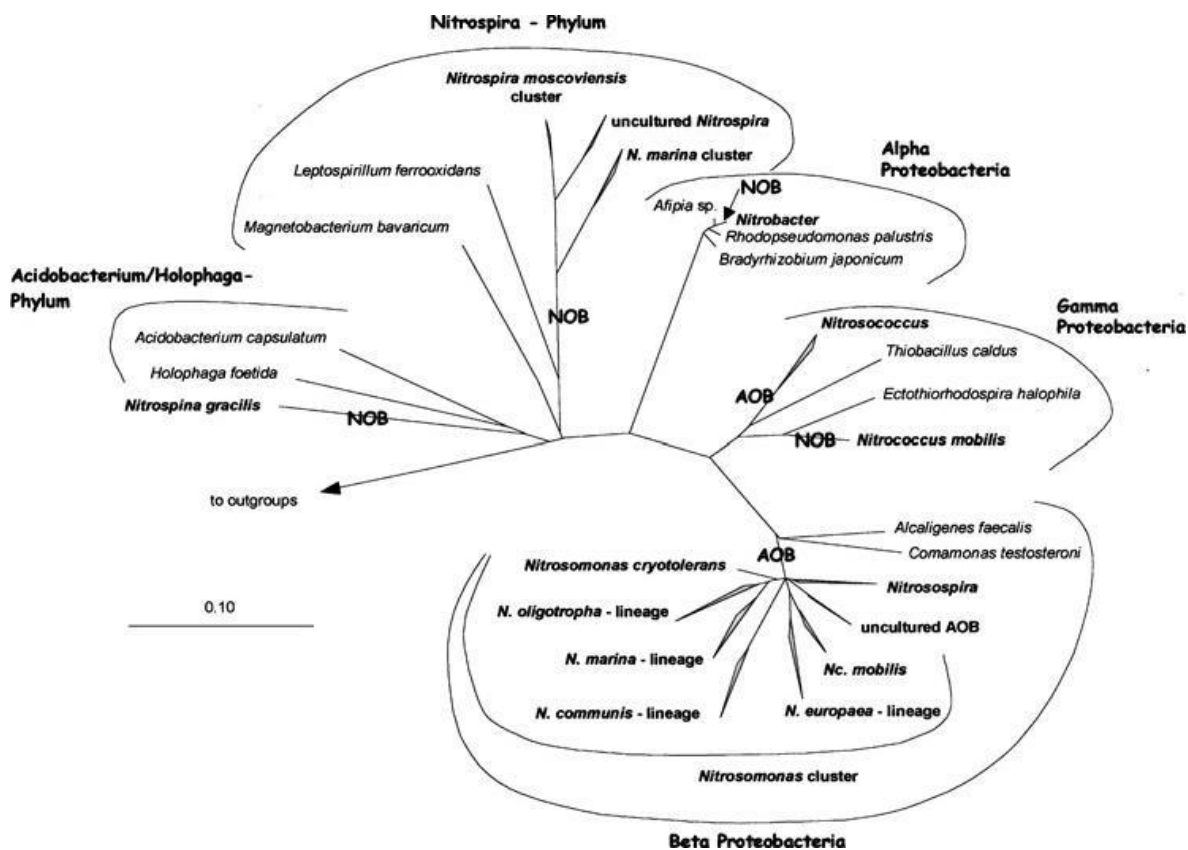


Figura 2. Árbol filogenético de las bacterias nitrificantes basado en el análisis comparativo del 16S rRNA. Los grupos de las bacterias nitrificantes están mostrados en negritas. La barra en escala indica un cambio estimado de 0.1 por nucleótido (Schramm, 2003).

2.3 Factores que afectan la nitrificación

Como cualquier proceso biológico, la nitrificación está condicionada al ambiente que la rodea. Se sabe que la eficiencia de la transformación de amonio a nitrato puede estar determinada, entre otros factores, por la concentración de oxígeno, pH,

temperatura y también por la presencia del mismo sustrato (amonio) o de materia orgánica.

2.3.1. Efecto de la temperatura

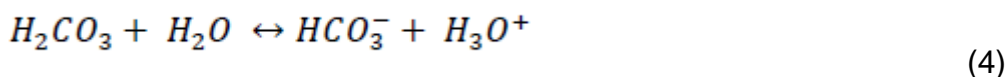
Tanto las AOB como las NOB pueden sobrevivir en un intervalo de temperatura de 4-45°C, sin embargo, al ser microorganismos mesófilos, su mejor crecimiento se puede encontrar entre 28 y 36°C (Bernet y Spérandio, 2009). Aunque la temperatura tiene un efecto en la velocidad de crecimiento de los microorganismos nitrificantes, a temperaturas superiores a 15°C, las AOB presentan una velocidad de crecimiento mayor que las NOB (Bernet y Spérandio, 2009).

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

2.3.2. Efecto del pH

Se considera que el crecimiento y la actividad de las AOB y NOB alcanzan su mejor desempeño a valores de pH neutro a ligeramente alcalino (7.5-8.0) (Prosser, 1989; Gieseke y col., 2006). Los cultivos axénicos de AOB presentan un mejor crecimiento en un intervalo de pH de 5.8-8.5 mientras que las NOB lo presentan entre 6.5-8.5 (Holt y col., 1994). Por otro lado, los consorcios nitrificantes utilizados en el tratamiento de aguas residuales pueden ser afectados por un pH bajo. Se ha reportado que a un pH de 6, la velocidad de amonio y nitrito oxidación disminuye, mientras que a un pH de 5 o menor, la actividad nitrificante se detiene (Gerardi,

2002; Lin y col., 2009). Un pH bajo en el medio, permite la formación y acumulación de ácido nitroso (HNO_2), que es el resultado de la protonación del nitrito. El ácido nitroso es conocido por inhibir la nitrificación y se cree que podría tener un efecto en la actividad enzimática de las bacterias nitrificantes (Anthonisen y col., 1976; Peng y Zhu, 2006). Otro efecto de un pH bajo en la nitrificación está relacionado con la disponibilidad de carbono inorgánico disuelto (principalmente el bicarbonato) para el crecimiento de las bacterias nitrificantes. A pH ácidos, el equilibrio entre las especies $\text{H}_2\text{CO}_3/\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ se desplazaría a H_2CO_3 (CO_2) disminuyendo la disponibilidad de bicarbonato en el medio de cultivo.



También la nitrificación puede ser afectada por pH alcalino, ya que puede cambiar la disponibilidad de NH_4^+ en el cultivo (Stein y col., 1997). En la ecuación siguiente se muestra el equilibrio entre amonio y amoniaco.



El par $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ tiene un pKa de 9.24 a 25°C (Harris, 2003). A un pH alcalino, la mayor parte del sustrato está como amoniaco y si se cuenta con un sistema abierto, éste puede ser arrastrado, disminuyendo la disponibilidad del sustrato para las AOB.

2.3.3. Efecto del oxígeno

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 (Gerardi, 2002). La nitrificación es muy sensible a bajas concentraciones de oxígeno disuelto las bacterias nitrificantes tienen una alta afinidad por él (bajos valores de K_s entre 0.4 y 0.6 mg/L) (Robinson y col., 2004). La AOB y NOB pueden presentar diferentes

afinidades por el oxígeno (K_{O_2}) y las NOB son más sensibles a la limitación de O_2 que las AOB (Laanbroek y Gerards, 1993). Por lo tanto, una baja concentración de oxígeno disuelto, alrededor de 0,2 a 0,5 mg/l, es una condición posible para limitar la actividad nitrato-oxidante en los sistemas de nitrificación (Bernet y Sperandio, 2009).

2.3.4. Efecto de la materia orgánica

Aunque las bacterias amonio oxidantes presentan cierta capacidad para oxidar materia orgánica, también está bien documentada la alta sensibilidad de las bacterias nitrificantes a los efectos tóxicos o inhibitorios de los compuestos orgánicos (Schweighofer y col., 1996, Texier y col., 2012). 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. Algunos autores 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 (Bernet y Spérandio, 2009). 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 (Gómez y col., 2000; Zepeda y col., 2006).

Desde la década de los 80, se ha estudiado el efecto de la materia orgánica sobre el proceso nitrificante, proponiéndose dos posturas. Una en la que se dice que la presencia de materia orgánica favorece el crecimiento de organismos heterotróficos sobre los organismos nitrificantes (Michael y col., 1985; Daigger y col., 1985). Así pues, se propone que la presencia de la materia orgánica ocasiona la disminución en la eficiencia nitrificante al desviar el proceso respiratorio a uno asimilativo. La otra postura propone un efecto directo sobre las enzimas nitrificantes. Kenner y Arp. (1994) realizaron ensayos con *Nitrosomonas europaea* en los cuales observaron que si la concentración de materia orgánica se aumentaba, el proceso nitrificante se veía

afectado en la oxidación de amonio. Se propone una competencia entre el amonio y la materia orgánica por el sitio activo de la enzima encargada de la oxidación del amonio (inhibición competitiva), o bien, que la materia orgánica se une al sitio activo de la enzima, cambiando su configuración espacial y alterando su capacidad oxidativa (Kenner y Arp. 1994).

3. NITRIFICACIÓN, MATERIA ORGÁNICA Y 2-CLOROFENOL

Existen pocos trabajos en la literatura que abordan el efecto del 2-CP en un proceso nitrificante. Satoh y col. (2005), utilizando microelectrodos y una biopelícula nitrificante, reportan que 10 mg/l C-2-CP inhibe la respiración aerobia y el consumo de amonio. 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 con 0.9 mg/l de 2-clorofenol, se inhibe en un 10% la velocidad de respiración nitrificante. Sin embargo, no hacen mención a la producción de nitrito o nitrato o al destino del 2-CP. Pérez-Alfaro y col. (2013), encontró que cuando un lodo nitrificante fisiológicamente estable que no ha tenido un contacto previo con 2-CP, se pone en presencia de concentraciones iniciales de 2.5 y hasta 10 mg C-2-CP/l, no existe consumo de amonio y por tanto no hay formación de nitrito ni de nitrato, es decir, no se lleva a cabo la nitrificación, aunque sí fue posible eliminar las diferentes concentraciones de 2-CP, en 40 y 80 días de cultivo, respectivamente. Por otra parte estudios utilizando un lodo nitrificante previamente expuesto a 5 mg/l de 2-CP indicaron que aunque el 2-CP tiene efectos inhibitorios sobre el lodo nitrificante, donde el proceso de amonio oxidación fue más afectado que el de la nitrito oxidación, fue posible recuperar una parte de la actividad nitrificante del lodo (Martínez-Hernández y col., 2011).

Por otro lado, se encontró que la utilización de lodos metanogénicos con un contacto previo (80 días) al 2-CP, resultó en una reducción de 57% en la fase de retardo para el consumo de este compuesto y en un incremento de 114% en la velocidad específica de su consumo. Por lo tanto, la utilización de los lodos con contacto previo al con 2-CP resultó ser una estrategia clave para mejorar la velocidad específica de consumo (Beristain-Montiel y col., 2010). Posteriormente, utilizando un reactor anaerobio de lotes secuenciados, fue posible aumentar hasta en cinco veces la velocidad específica de consumo de diferentes concentraciones de 2-CP (28 - 112 mg C-2-CP/l) (Beristain-Montiel y col. 2011).

4. NITRIFICACIÓN EN REACTORES DE LOTES SECUENCIADOS (SBR)

Para llevar a cabo la nitrificación se han utilizado diferentes geometrías de reactores nitrificantes, como por ejemplo reactores de tanque agitado, filtros percoladores, discos rotatorios, filtros sumergidos y reactores de lecho fluidizado (Martínez, 2003). Cada una de estas configuraciones de reactores tiene sus ventajas y desventajas para tratar ciertos tipos de aguas residuales con amonio como contaminante. No obstante, uno de los reactores nitrificantes más utilizados es el reactor de lotes secuenciados (SBR) (Texier y Gómez., 2004). Este tipo de reactores tiene un sistema de trabajo por etapas, dividido en cuatro fases (Figura 3): llenado, reacción biológica, sedimentación y drenado (Lloyd, 1997). Es fácil de operar y la calidad del efluente se puede regular controlando los tiempos de retención, reacción y de sedimentación (Lee y Jong 1999; Alemayehu y col., 2001). Una de las características principales de este tipo de reactor, es que los procesos biológicos tienden a alcanzar una etapa de adaptación y estabilización, pues se ha observado que los tiempos de reacción disminuyen conforme transcurre el número de ciclos (Texier y Gómez., 2007). Se ha propuesto que en estos reactores, ocurre una selección de cepas microbianas capaces de adaptarse a ambientes diversos, por lo que pueden mantener su actividad aún cuando haya cambios en el efluente (Irvine y col., 1997; Ketchum, 1997). Así, al incrementarse el número de ciclos, las velocidades específicas de consumo y producción aumentan hasta llegar a un punto en el cual no sufren cambios significativos, es decir, se puede llegar a un estado estacionario (Moreno-Andrade y Buitrón, 2004). Entre las principales ventajas de este tipo de reactores se encuentran: altos rendimientos de eliminación de materia orgánica biodegradable y nutrientes, flexibilidad de operación, menores costos de inversión y una mejor operación sobre los sistemas aireados tradicionales (Fernández-Polanco y col., 1993; Schleypen y col., 1997; Torrijos y Moletta, 1997).

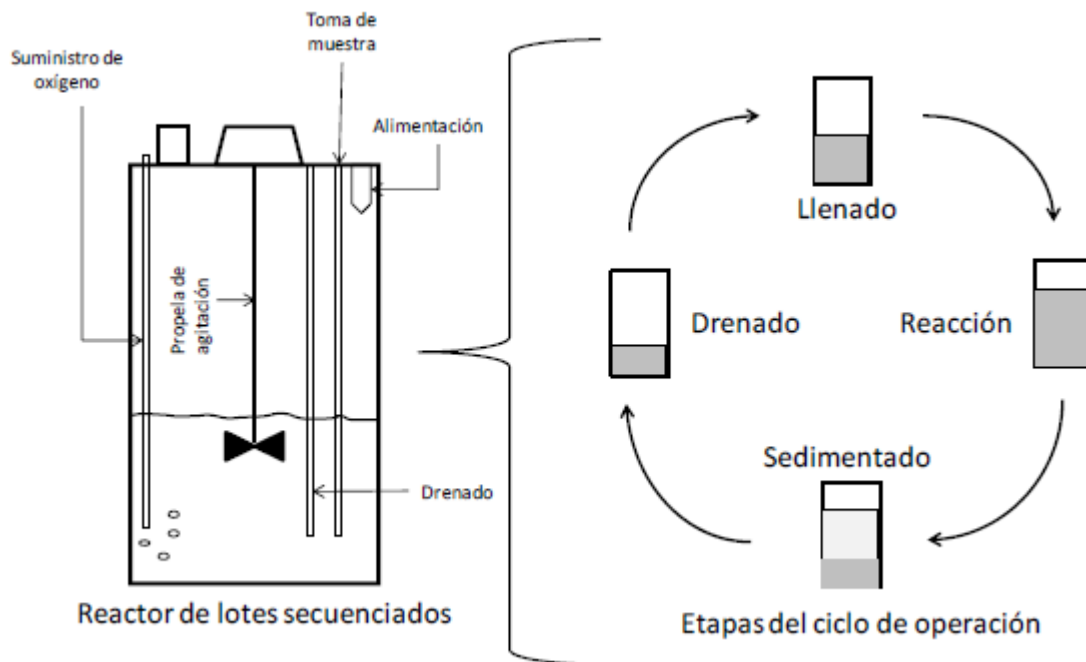


Figura 3. Etapas de un ciclo de operación de un reactor SBR.

Hay diversos trabajos en la literatura que reportan el uso de reactores SBR para tratar aguas sintéticas con amonio y algunos compuestos aromáticos mediante la nitrificación, reportándose algunos efectos de la materia orgánica sobre el proceso respiratorio. Por ejemplo, se ha reportado que la eficiencia de consumo de amonio y el rendimiento de producción de nitrato no se afectan en presencia de hasta 30 mg C-Fenol/l, mientras que al adicionar 100 mg C-Fenol/l, ambos parámetros cayeron en un 13%. Sin embargo, bajo estas condiciones y después de 244 ciclos de operación, se observó un aumento en las velocidades específicas de consumo de amonio, fenol y producción de nitrato, (Pérez, 2007). Asimismo, se ha reportado que el efecto inhibitorio del *p*-cresol (25mg/l) sobre la nitrificación, puede ser disminuido después de 30 ciclos de operación en un reactor de lotes secuenciados, mostrando que la eficiencia de consumo de amonio y el rendimiento de producción de nitrato no son afectadas y las velocidades específicas de consumo de *p*-cresol fueron aumentando (Texier y Gómez, 2007).

5. JUSTIFICACIÓN

Los sistemas de tratamiento de aguas residuales realizados mediante nitrificación, pueden sufrir efectos negativos por la presencia de compuestos orgánicos como el 2-CP. En la literatura se ha reportado que al utilizar lodos previamente expuestos al compuesto, se ha observado una mejora tanto en el proceso respiratorio como en el consumo del 2-CP y sugieren que el uso de un reactor de lote secuenciado en condiciones nitrificantes, podría ser una herramienta atractiva para disminuir el efecto inhibitorio del 2-CP sobre la nitrificación. De esta forma, 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.

6. HIPÓTESIS

El uso de un reactor de tipo SBR y un lodo nitrificante previamente expuesto a compuestos fenólicos, permitirá un periodo más corto para iniciar el consumo de amonio y del 2-CP, permitiendo una recuperación más rápida de la actividad del lodo nitrificante, de manera que sea posible llevar a cabo la oxidación del NH_4^+ hasta NO_3^- de manera estable.

7. OBJETIVOS

7.1. General

*Evaluar en reactores de lotes secuenciados (SBR), el proceso nitrificante en presencia de 2-CP utilizando lodos previamente expuestos a compuestos fenólicos.

7.2. Particulares

*Instalar dos reactores SBR nitrificantes control.

*Determinar en los reactores SBR, en presencia de 2-CP, las velocidades específicas de consumo de amonio y producción de nitrato, así como las velocidades específicas de consumo de 2-CP a lo largo de los ciclos de operación.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. Reactores

Se utilizaron dos reactores de lotes secuenciados: el SBR1 (Applikon, mod. p100) y el SBR2 (Biolab), ambos de 2 l de capacidad, los cuales se alimentaron con bombas Masterflex de flujo reversible de la marca Cole-Parmer Instrument Company, programadas en su encendido y apagado con ayuda de temporizadores de la marca Sper Scientific 810080.

8.2. Medio de Cultivo

El medio de cultivo que se utilizó para alimentar los reactores se dividió en dos soluciones para evitar la posible precipitación de los componentes, y o el crecimiento de organismos no deseados en los tanques de alimentación. En el medio A se incluyó la fuente de nitrógeno y en el B la de carbono. La composición fue la siguiente:

Tabla 2. Composición del medio de cultivo para los reactores de lotes secuenciados.

A	(g/l)	B	(g/l)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	(0.47)	NaHCO_3	(3.5)
NH_4Cl	(0.38)	CaCl_2	(0.02)
KH_2PO_4	(0.56)	FeSO_4	(0.075)
MgSO_4	(0.4)		
NaCl	(0.4)		

8.3. Fuente de inóculo

Se utilizaron dos distintas fuentes de inóculo para los reactores.

El inóculo que se utilizó para el reactor SBR1 estuvo previamente expuesto al 2-CP de acuerdo a la metodología descrita por Pérez-Alfaro y col. (2013). A continuación se describe brevemente. De un reactor en estado estacionario nitrificante (volumen de trabajo de 6L, temperatura de 30 °C, agitación de 200 rpm, relación carbono/nitrógeno de 2.5, tiempo de residencia hidráulica de 2 d, pH de 7.6 ± 0.4 , con una velocidad de carga de nitrógeno de amonio de 150 mg/l/d), se tomó el volumen de lodo nitrificante necesario para inocular con aproximadamente 200 ± 9.8 mg de proteína bacteriana/l (previamente lavada con solución fisiológica) botellas serológicas de 160 ml de capacidad con un volumen de trabajo de 100 ml y 60 ml de espacio de cabeza. Se utilizó una concentración de 100 mg N-NH₄⁺/l, 250 mg C-NaHCO₃/l y diferentes concentraciones de 2-CP (10, 5 y 2.5 mg C- 2-CP/l). Los lodos se incubaron durante 30 y 80 días. Una vez que estos ensayos concluyeron, los lodos con previa exposición al 2-CP se lavaron, se les adicionó nuevamente 100 mg N-NH₄⁺/l y 250 mg C-NaHCO₃/l, y se evaluó la actividad nitrificante (250 h). Finalmente, se recolectaron los lodos, se les adicionó una concentración 10 mg/l C-2-CP y se guardaron en refrigeración (aproximadamente por 2 años).

El inóculo para el reactor SBR2 se obtuvo de un reactor nitrificante de tanque agitado en continuo de 5.0 l (RCTA) operado en continuo durante un período de 2 años a una temperatura de 25 ± 0.2 °C, con un tiempo de residencia hidráulico a de 1.8 días. La concentración de oxígeno disuelto se mantuvo en el interior del reactor a 4.0 ± 0.3 mg/l. El medio basal mineral estaba compuesto de (g/l): K₂HPO₄ (3.0), KH₂PO₄ (4.5), NaHCO₃ (2.0), y una solución de elementos trazas suministrada a 1 mL/l. La solución de elementos traza contenía (g/l): EDTA (0.05), Cu₂SO₄ · 5H₂O (0.015), CaCl₂ · 2H₂O (0.07), MnCl₂ (0.03), (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O (0.015), FeCl₃ (0.015), MgCl₂ (0.02). El RCTA se alimentó con las siguientes velocidades de carga (mg/l d): 216 ± 6 de N-NH₄⁺, 76 ± 3 de sulfuro, y 89 ± 3 de *p*-cresol. En el estado estacionario nitrificante, las

eficiencias de consumo para todos los sustratos fueron cerca de 100%, siendo los productos principales el nitrato, HCO_3^- y SO_4^{2-} (Silva y col. 2011).

8.4. Cultivos en los reactores de lotes secuenciados (SBR)

Para lograr la estabilidad y adaptación de la nitrificación, se utilizaron dos reactores SBR con el medio de cultivo descrito en la tabla 2, (SBR1 y SBR2, alimentados con 100 mg N- NH_4^+ /l y 250 mg C- NaHCO_3 /l). Los reactores se inocularon con uno de los dos lodos nitrificantes descritos previamente (aprox. con 350 ± 9.8 mg de proteína bacteriana/l).

Los reactores se operaron con un volumen de 1.2 ± 0.1 l, una agitación constante de 200 rpm y una aireación de 2 volúmenes de aire por volumen del líquido (vvm). Se utilizaron bombas peristálticas para la alimentación, la descarga de efluentes y toma de muestras del reactor. La duración de los ciclos fue de 48 h, repartida de la siguiente forma: llenado = 30 min; tiempo de reacción = 45 h; sedimentación de lodos = 30 min, y drenado = 2 h. Se tomaron muestras a diferentes tiempos del cultivo. Bajo estas condiciones se realizaron cinéticas a diferentes ciclos de operación a fin de determinar las velocidades específicas de consumo y producción.

8.5. Ensayos abióticos

Una vez estabilizado el proceso nitrificante en los reactores SBR1 y SBR2, los reactores se mantuvieron herméticamente cerrados para evitar pérdidas del 2-CP por volatilización o arrastre, de forma que la aireación se realizó de manera intermitente. Así pues, la fase líquida se burbujeó con O_2 tres veces por día durante dos minutos, se adicionaron 20 mg C-2-CP /l, y se mantuvo una agitación a 200 rpm durante 6 días. Bajo estas condiciones y utilizando el medio de cultivo antes mencionado (Tabla 2), pero en ausencia de biomasa, se llevaron a cabo los ensayos abióticos en

los reactores SBR a fin de determinar la pérdida de 2-CP en los SBR. La concentración de 2-CP se cuantificó a lo largo del tiempo.

8.6. Ensayo nitrificante control

Bajo las condiciones previamente descritas en los ensayos abióticos, pero en presencia de biomasa nitrificante, se realizó un ensayo control en cada reactor. Los resultados obtenidos en estos ensayos sirvieron para verificar la actividad nitrificante de la biomasa en los reactores y como referencia para evaluar el proceso nitrificante en presencia de 2-CP.

8.7. Proceso nitrificante en presencia de 2-Clorofenol

Posteriormente a los ensayos control, se evaluó en cada reactor el proceso nitrificante en presencia de 20 mg/l de C-2-CP. Los ciclos de operación fueron de 30.125 d, repartidos de la siguiente forma: llenado = 0.02 d; tiempo de reacción = 30 d; sedimentación de lodos = 0.02 d, y drenado = 0.083 d.

Se determinaron diferentes variables de respuesta a lo largo de los ciclos de operación.

8.8. Variables de respuesta para evaluar el proceso respiratorio

Las variables de respuesta fueron las siguientes:

Rendimiento de $N-NO_3^-$.

$$Y_{N-NO_3^-} = \frac{mgdeN-NO_3^- \frac{\text{producido}}{l}}{mgdeN-NH_4^+ \frac{\text{consumido}}{l}} \quad (6)$$

Eficiencia de consumo de N- NH_4^+ .

$$EN - \text{NH}_4^+ = \frac{\text{mg de N-NH}_4^+ \frac{\text{entrada}}{l} - \text{mg de N-NH}_4^+ \frac{\text{salida}}{l}}{\text{mg de N-NH}_4^+ \frac{\text{entrada}}{l}} * 100 \quad (7)$$

Eficiencia de consumo del 2-CP

$$EC - 2 - \text{CP} = \frac{\text{mg de C-2-CP} \frac{\text{entrada}}{l} - \text{mg de C-2-CP} \frac{\text{salida}}{l}}{\text{mg de C-2-CP} \frac{\text{entrada}}{l}} * 100 \quad (8)$$

*C-2-CP= Carbono del 2-CP

*N- NO_3^- = Nitrógeno de nitrato y

* N_2 = Nitrógeno molecular.

Balances de materia

$$[\text{N-NH}_4^+ \text{ entrada}] = [\text{N-NH}_4^+ \text{ salida}] + [\text{N-NO}_2^-] + [\text{N-NO}_3^-] + [\text{N-proteína}]. \quad (9)$$

Velocidades específicas de consumo de N- NH_4^+ y producción de N- NO_3^- (q)

$$Q_p X = dP / dt \quad Q_s X = dS / dt$$

$$q_p = 1/x \, dP/dt \quad q_s = 1/x \, dS/dt$$

Donde q es la velocidad específica (mg N/mg proteína h), Q es la velocidad volumétrica (mg N-X / l d) obtenida de la pendiente de la ecuación de la recta. Y [x] es la concentración de biomasa medida como proteína microbiana.

8.9. Métodos analíticos

Para verificar la reproducibilidad y linealidad de los métodos analíticos utilizados en este trabajo, se realizaron al menos tres curvas de calibración para cada técnica analítica. En la Tabla 3 se muestran los coeficientes de correlación (R^2) y de variación (CV) de las pendientes correspondientes a las curvas de calibración de los diferentes métodos analíticos.

Tabla 3. Coeficientes de correlación y de variación de las pendientes correspondientes a las curvas de calibración realizadas por los diferentes métodos analíticos.

Análisis	Coefficiente de variación (CV, %)	Coefficiente de correlación (R^2)
Amonio (electrodo selectivo)	7.6 %	0.999±0.003
Nitrito (CIA)	3.3 %	0.998±0.003
Nitrato (CIA)	1.7 %	0.995±0.004
2-CP (HPLC)	7.7%	0.999±0.002
Proteína microbiana (Lowry)	1.26%	0.997±0.003

Todos los métodos presentaron un CV menor al 10%, lo cual indicó una aceptable reproducibilidad, mientras que los R^2 fueron mayores a 0.992, demostrando una respuesta lineal de los métodos. A continuación se desglosan cada uno de los métodos realizados y se muestran ejemplos de las curvas de calibración obtenidas.

8.9.1. Cuantificación de amonio

Para cuantificar el amonio disuelto en solución acuosa mediante su conversión a amoníaco se utilizó un electrodo de ión selectivo (phoenix electrode Co. Mod. NH331501). El principio del método se basa en desplazar el equilibrio del par

$\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ en solución acuosa mediante la alcalinización de las muestras. El electrodo selectivo cuenta con una membrana permeable al amonio. Por lo cual fue necesario alcalinizar las muestras de 50 mL con NaOH 10 N, bajo agitación constante y temperatura ambiente. El electrodo estuvo acoplado a un potenciómetro portátil (DigiSense, Cole-Parmer) que permitió la lectura del potencial (mV) cuando fue estable (aproximadamente 3 min después de adicionar el NaOH). Siempre que fue analizada una muestra se construyó una curva de calibración de N- NH_4^+ en un intervalo de concentraciones adecuado para cada muestra (entre 0 y 150 mg/l). El valor del potencial es proporcional al logaritmo de la concentración, cuyo valor puede ser calculado directamente de la ecuación de la recta (ecuación 10). La ecuación (11) fue utilizada para calcular la concentración de amonio en las muestras.

$$\text{Potencial} = m \logaritmo ([\text{NH}_4^+]) + b \quad (10)$$

$$[\text{NH}_4^+] = \text{antilog} \left(\frac{\text{Potencial} - b}{m} \right) \quad (11)$$

Donde m es la pendiente y b es la ordenada al origen.

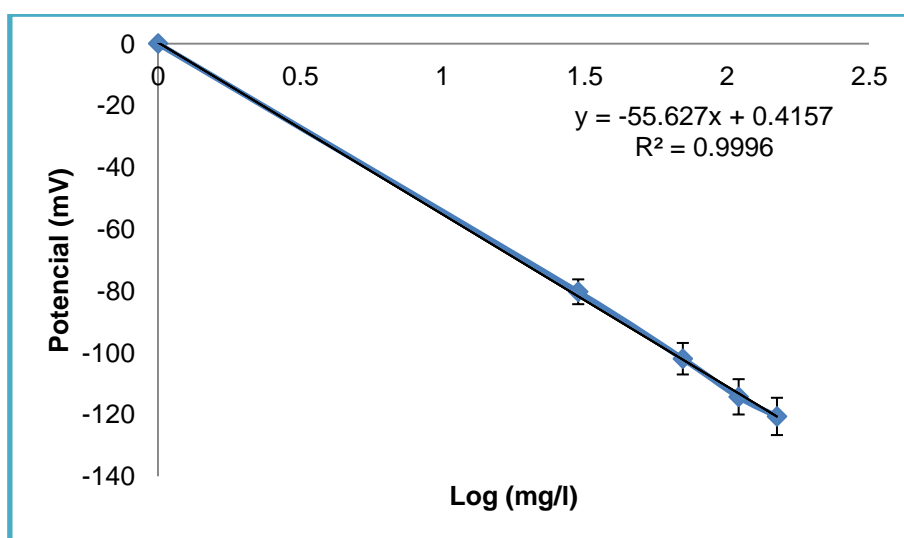


Figura 4. Ejemplo de una curva de calibración para la cuantificación de amonio.

8.9.2. Cuantificación de nitrito y nitrato

La electroforesis capilar se basa en la migración de los iones en solución bajo la influencia de un campo eléctrico, hacia el electrodo con la carga opuesta a ellos. La fuerza conductora de una partícula está relacionada con su carga y la intensidad del campo eléctrico aplicado, así como la composición del electrolito, el cual funciona como el medio de separación que proporciona una resistencia (Weinberger, 1993). El equipo utilizado fue un analizador capilar de iones (CIA) con un detector UV (arreglo de yoduros) y se trabajó a una longitud de onda de 240 nm. Las condiciones de operación fueron: voltaje de 12 KV, tiempo de corrida de 10 min y temperatura de 25°C. El capilar utilizado tiene un recubrimiento de sílica fundida de 60 cm de largo y 75 µm de diámetro interno. El electrolito se preparó tomando 5 mL de las siguientes soluciones: sulfato de sodio anhidro (0.1 M), cloruro de sodio (10 mM) y CIA Pak OFM anion-BT (Waters), finalmente se llevó a un volumen de 50 mL con agua desionizada. Las muestras fueron filtradas por una membrana de nylon (0.45 µm) y se realizaron diluciones para que las muestras no superaran los 50 mg N/l al momento de ser analizadas. Para comprobar la linealidad del método, se construyeron curvas de calibración. La Figura 5 es un ejemplo de éstas.

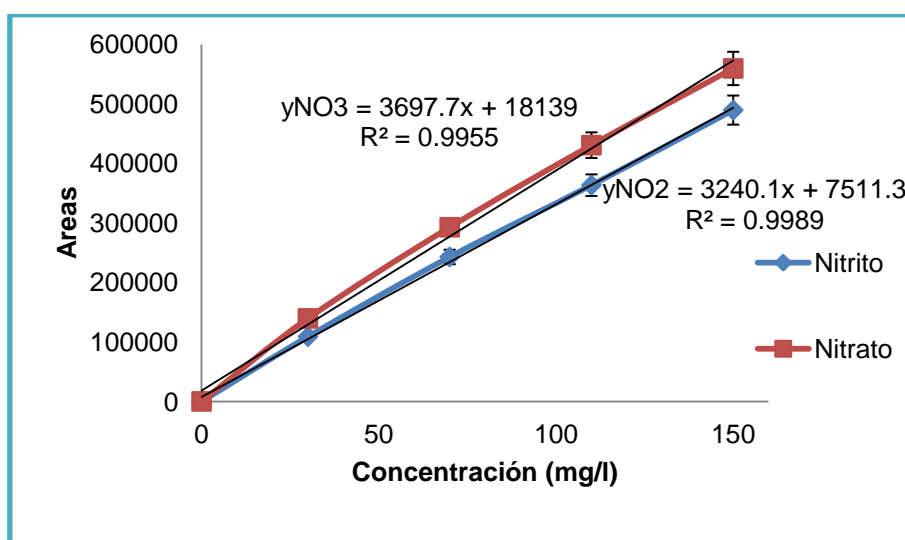


Figura 5. Ejemplos de curvas de calibración para la cuantificación de nitrito y nitrato por electroforesis capilar.

8.9.3. Cuantificación de 2-Clorofenol

Se utilizó un cromatógrafo de líquidos (HPLC) Perkin-Elmer series 200, una columna Bondclone 10u C-18 (Phenomenex, 300 x 3.9 mm). El equipo cuenta con un detector UV/VIS y la longitud de onda para la detección fue 274 nm. La fase móvil fue una mezcla de acetonitrilo y agua (60:40 v/v) y se utilizó un flujo de 1.5 mL/min y un tiempo de corrida de 4 min. La inyección de muestra se hace por un automuestreador fijando el volumen de inyección en 20 µL. A partir de una solución madre se realizaron las soluciones estándar con 0, 5, 10, 20 y 30 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 para finalmente colocar 2 mL de muestra en cada vial. La Figura 6 es un ejemplo de las curvas de calibración construidas para la técnica de cuantificación de 2-clorofenol por HPLC.

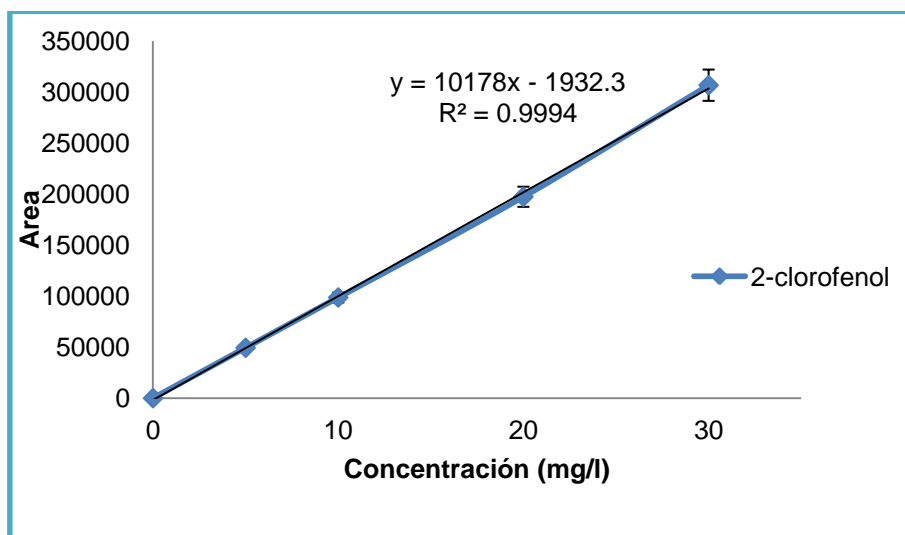


Figura 6. Ejemplo de curva de calibración de 2-clorofenol por HPLC.

8.9.4. Cuantificación de proteína microbiana

El método colorimétrico de Lowry (Lowry y col., 1951) fue utilizado para determinar la concentración de proteína microbiana en el reactor de lotes secuenciados. El método se basa en la reacción para formar un complejo Cu-proteína y la posterior reducción de este complejo por el reactivo de Folin-Ciocalteu, donde se obtiene un color azul en un ambiente alcalino (pH de 10). El reactivo de Folin-Ciocalteu (Hycel) está formado por molibdato, fosfato y tungstato de sodio y produce un máximo de absorción a 750 nm. Esta técnica requiere de proteínas que contengan péptidos con grupos fenólicos que puedan enlazarse con el Cu_2^+ . Para cada serie de muestras analizadas, se preparó una curva de calibración de albúmina (Sigma, 96-99%) de 0 a 300 mg/l. Las muestras y los estándares recibieron el mismo tratamiento. Se tomó 1 mL de muestra y se colocó en tubos de ensaye con tapa de rosca de 10 mL. Se adicionó 0.1 mL de NaOH (10 N). Posterior a la agitación mediante un vortex, se calentaron los tubos por 20 min a 90°C en un baño seco. Se necesitaron tres soluciones: (a) Na_2CO_3 0.19 M en NaOH 0.1N, (b) CuSO_4 al 1% y (c) tartrato de sodio y potasio al 2%. Se preparó una solución con (1 mL solución (b) + 1 mL de solución (c) + 48 mL de solución (a)) que fue posteriormente adicionada a cada tubo (5 mL). Se dejaron reposar los tubos por 30 min en la oscuridad. Posteriormente, se agregó 1 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu, dejando reposar nuevamente en la oscuridad por 1 h, para finalmente medir la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro UV/VIS (Shimadzu, mod. UV-1601). Todos los ensayos se realizaron por triplicado. La Figura 7 muestra un ejemplo de las curvas de calibración utilizadas en esta técnica.

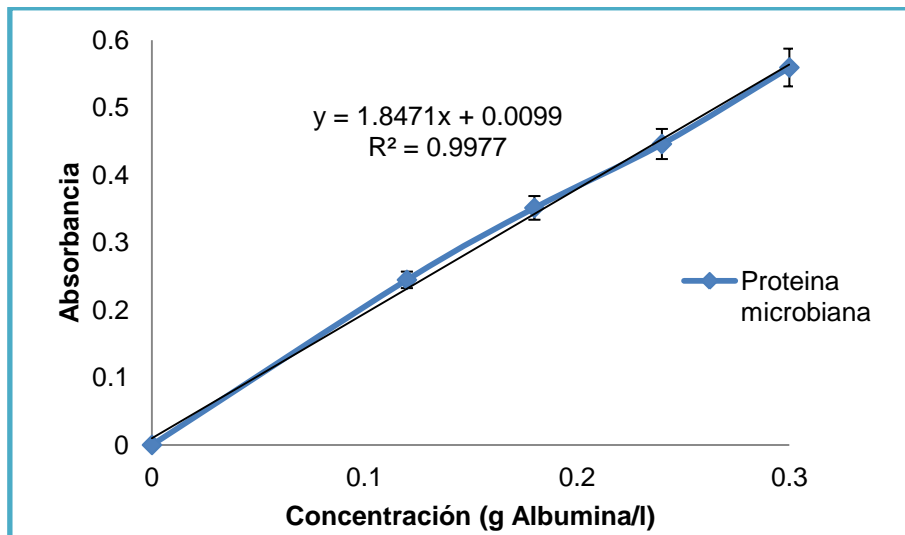


Figura 7. Ejemplo de curva de calibración para la cuantificación de proteína microbiana por el método de Lowry.

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1. Estabilidad y adaptación de la nitrificación

Las figuras 8 y 9 muestran perfiles del consumo y producción de los compuestos nitrogenados en los reactores nitrificantes SBR1 y SBR2 realizadas en el ciclo 45 de operación.

En el ciclo 45 de operación en el reactor SBR1, se muestra que el consumo total de amonio se realizó en un lapso de 10 h, mientras que la formación transitoria de nitrito, su consumo y la máxima concentración de nitrato formado se presentaron a las 48 h.

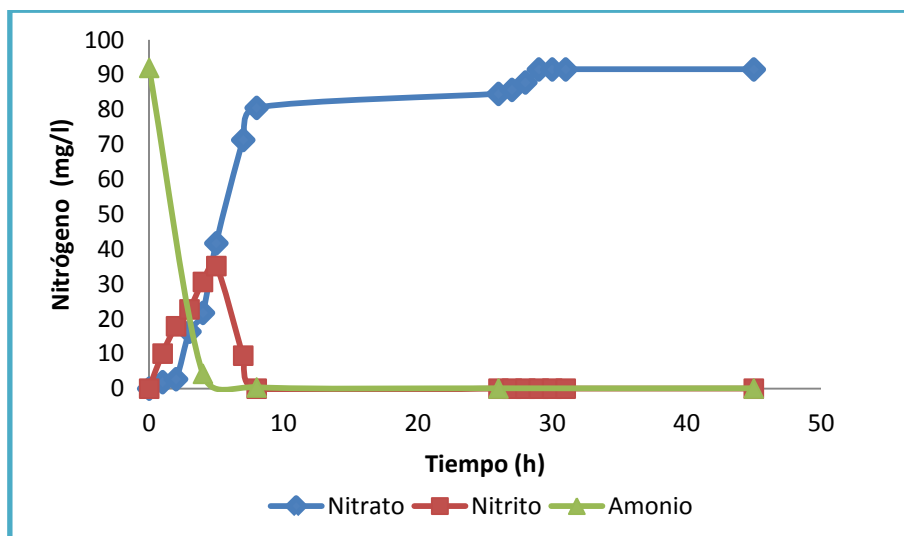


Figura 8. Perfil del consumo y producción de los compuestos nitrogenados en el reactor nitrificante SBR1 en el ciclo 45 de operación.

Al final de las 48 h, la eficiencia de consumo de amonio fue de 99.9% y el rendimiento de producción de nitrato de 0.98 (Tabla 4).

Tabla 4. Eficiencias de consumo de amonio, rendimientos de nitrato a los largo de los ciclos de operación de los reactores nitrificantes control.

Ciclo	E _{N-NH₄⁺} %		Y _{N-NO₃⁻}	
	SBR1	SBR2	SBR1	SBR2
1	99.9	99.9	0.98	0.91
12	99.9	99.8	0.99	1.00
28	99.9	99.9	0.94	0.98
45	99.9	99.9	0.99	1.00

E N-NH₄⁺ = Eficiencia de consumo de amonio (%).

Y N-NO₃⁻ = Rendimiento de producción de nitrato (mg de N producto/mg de N consumido)

Para esquematizar de manera más clara el destino de los compuestos nitrogenados en las cinéticas nitrificantes, se presenta el balance de materia, donde se observa que efectivamente sólo hay producción de nitrógeno de nitrato y es prácticamente igual al nitrógeno de amonio consumido.

Balance de materia en el reactor nitrificante SBR1 en el ciclo 45 de operación:

$$[89.96 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{l entrada}] = [0 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{l salida}] + [0 \text{ mg N-NO}_2^-/\text{l}] + [89.36 \text{ mg N-NO}_3^-/\text{l}] + [0.36 \text{ mg N-proteína/l}]$$

El proceso nitrificante en el reactor SBR2 tuvo un comportamiento similar al del reactor SBR1, puesto que los lodos consumieron totalmente el amonio aproximadamente en 10 h y se presentó la máxima concentración de nitrato formado a las 48 h. La eficiencia de consumo de amonio fue de 99.9% y el rendimiento de producción de nitrato de 1 (Tabla 4).

Balance de materia en el reactor nitrificante SBR2 en el ciclo 45 de operación:

$$[78.06 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{l entrada}] = [0 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{l salida}] + [0 \text{ mg N-NO}_2^-/\text{l}] + [78.07 \text{ mg N-NO}_3^-/\text{l}] + [0.57 \text{ mg N-proteína/l}]$$

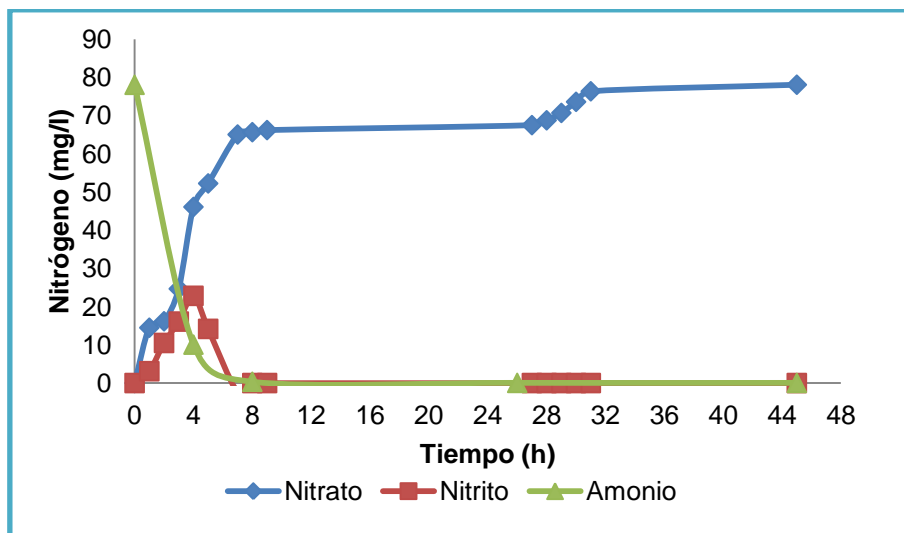


Figura 9. Perfil del consumo y producción de los compuestos nitrogenados en el reactor nitrificante SBR2 en el ciclo 45 de operación.

A lo largo de los ciclos de operación, se obtuvieron resultados similares en el comportamiento nitrificante en ambos reactores, con eficiencias de consumo de amonio cercanas al 100% y rendimientos de nitrato alrededor de 1, indicándonos que en ambos reactores se tiene un proceso nitrificante estable.

En la figura 10 se muestran las diferentes velocidades específicas de producción de nitrato obtenidas a lo largo de los ciclos de operación para el reactor SBR1 y SBR2. Ambos reactores presentaron la máxima $q_{N-NO_3^-}$ de 0.031 y 0.025 (mg N- NO_3^- /mg de proteína d) respectivamente, a partir del ciclo 18 y hasta el ciclo 45 de operación. Considerando que la formación de biomasa durante la experimentación fue muy pequeña (rendimientos de biomasa de 0.004 para el reactor SBR1 y 0.0073 para el reactor SBR2), es decir que el metabolismo fue desasimilativo, el incremento en las velocidades específicas puede ser el resultado de un aumento en la capacidad metabólica de las bacterias amonio y nitrito oxidantes para oxidar amonio y nitrito, indicándonos que el proceso nitrificante alcanzó una adaptabilidad en el sistema. Estos resultados son similares con los previamente señalados por Texier y Gómez

(2004). Los autores mostraron mediante un estudio cinético en un SBR nitrificante, que las velocidades q N-NO_3^- cambiaron con el número de ciclos y sugirieron que fue probablemente debido al incremento en la estabilidad fisiológica de las bacterias nitrificantes, en vez de una modificación en la dinámica de población.

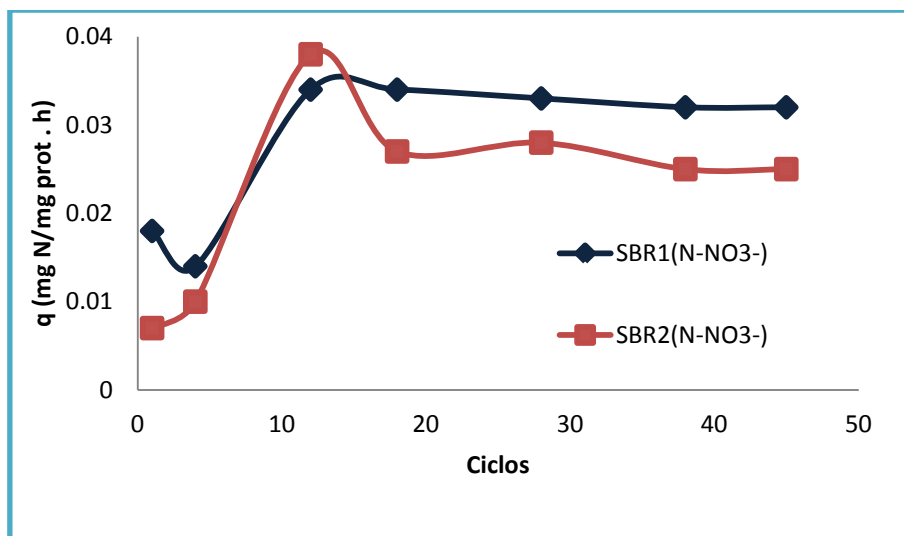


Figura 10. Perfil de las velocidades específicas de producción de nitrato hasta el ciclo 45 de operación en los reactores SBR1 y SBR2.

9.2. Ensayos abióticos

Los ensayos abióticos mostraron que después de 6 d de experimentación, el 96.4% del C-2-CP se mantuvo en el cultivo, por lo tanto, la pérdida de este compuesto fue insignificante (Figura 11).

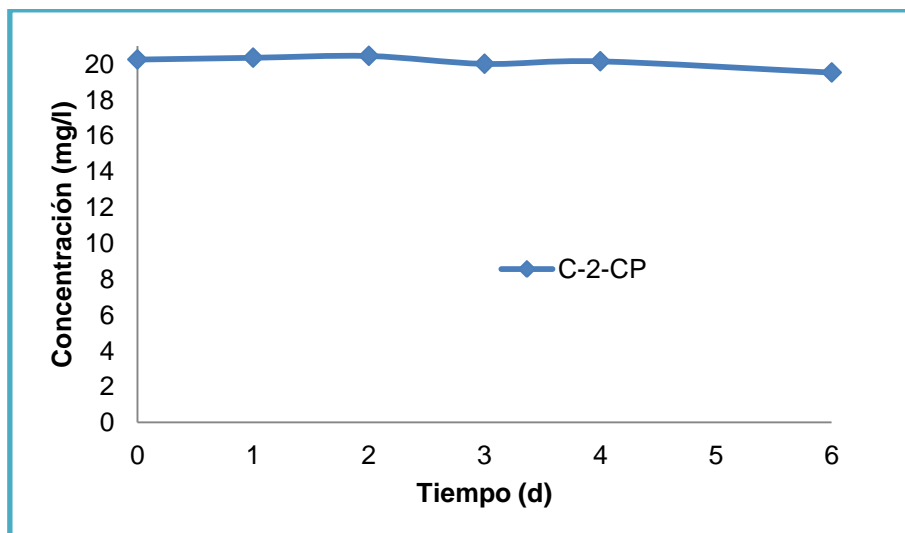


Figura 11. Ensayo abiótico en el reactor SBR1.

9.3. Cinética nitrificante control

Las figuras 12 y 13 muestran perfiles de consumo y producción de los compuestos nitrogenados en los reactores nitrificantes SBR1 y SBR2 control, es decir, cuando se mantuvieron sellados y aireados intermitentemente.

Se muestra que el consumo total de amonio se realizó en un lapso de 40 h, mientras que se presentó una acumulación transitoria de nitrito y una máxima concentración de nitrato formado a las 48 h. Al final de las 72 h, la eficiencia de consumo de amonio fue de 99.6% y el rendimiento de producción de nitrato de 0.93 (Tabla 5). La $q_{N-NO_3^-}$ fue de 0.1859 (mg N/mg de proteína d).

Balance de materia del reactor nitrificante SBR1 control:

$$[98.06 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{l entrada}] = [0 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{l salida}] + [2.62 \text{ mg N-NO}_2^-/\text{l}] + [92.07 \text{ mg N-NO}_3^-/\text{l}] + [2.53 \text{ mg N-proteína/l}]$$

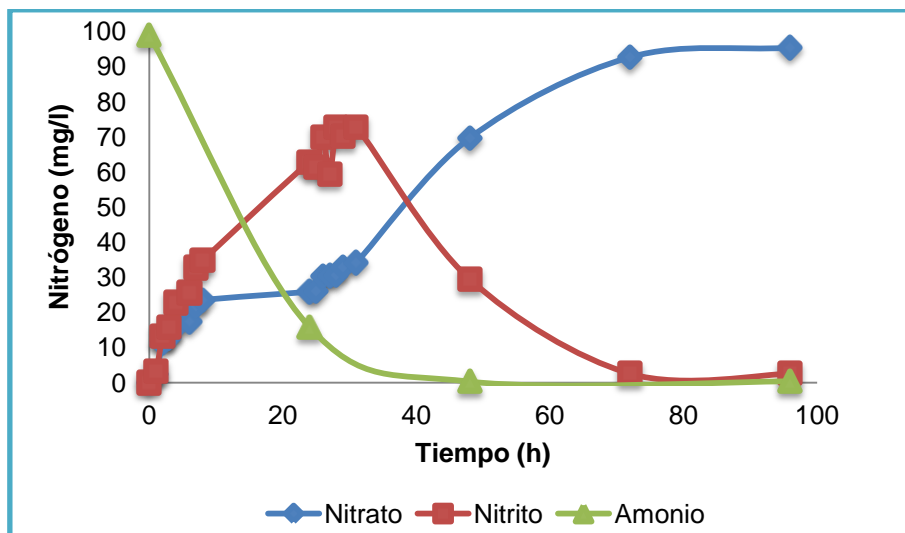


Figura 12. Perfil del consumo y producción de los compuestos nitrogenados en el reactor nitrificante control SBR1.

En el reactor nitrificante SBR2 se presentó un consumo total de amonio aproximadamente en 40 h y la máxima concentración de nitrato formado a las 48 h. La eficiencia de consumo de amonio fue de 99.6% y el rendimiento de producción de nitrato de 0.99. Se calculó la $q_{N-NO_3^-}$ de 0.1800 (mg N/mg de proteína d).

Balance de materia del reactor nitrificante SBR control:

$$[96 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{l entrada}] = [0 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{l salida}] + [0 \text{ mg N-NO}_2^-/\text{l}] + [94 \text{ mg N-NO}_3^-/\text{l}] + [1.17 \text{ mg N-proteína/l}]$$

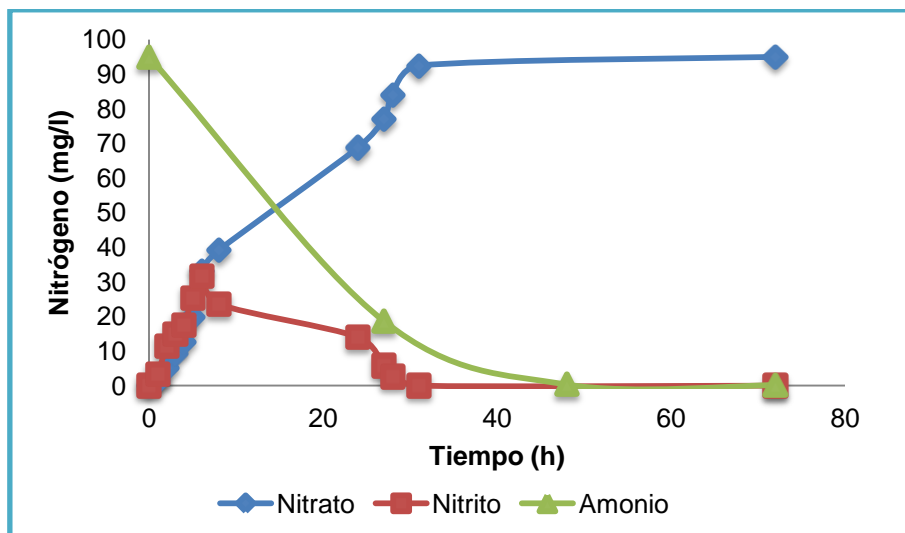


Figura 13. Perfil del consumo y producción de los compuestos nitrogenados en el reactor nitrificante control SBR2.

De acuerdo a la tabla 5, los valores obtenidos en las variables de respuesta, nos muestran comportamientos cinéticos similares entre ambos reactores, indicando asimismo, que bajo las condiciones experimentales, es posible llevar a cabo la nitrificación de manera adecuada. Estas variables de respuesta obtenidas en ambos reactores servirán como referencia para evaluar el proceso nitrificante en presencia de 2-CP.

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

SBR	E N-NH ₄ ⁺	Y N-NO ₃ ⁻	q N-NH ₄ ⁺	qN-NO ₂ ⁻	q N-NO ₃ ⁻
1	99.63	0.94	0.1373	0.1545	0.1859
2	99.61	0.99	0.1279	0.3226	0.1800

E N-NH₄⁺ =Eficiencia de consumo de amonio (%).

Y N-NO₃⁻=Rendimiento de producción de nitrato (mg de N producto/mg de N consumido)

q N-NO₂⁻, q N-NO₃⁻ =Velocidad específica de producción (mg de producto formado / mg proteína d).

q N-NH₄⁺=Velocidad específica de consumo (mg sustrato consumido / mg proteína d).

9.4. Proceso nitrificante en presencia de 2-Clorofenol

Posteriormente a los ensayos control, se adicionaron 20 mg C-2-CP/l a cada reactor.

En el ciclo 1 del SBR1 (Figura 14), el consumo de amonio después de 30 días de operación fue de 12% sin detectar concentraciones de nitrito y una ligera producción de nitrato. Se presentó un rendimiento de producción de nitrato de 0.3 y q N-NH₄⁺ de 0.0027 y q N-NO₃⁻ de 0.00056 (mg N/mg de proteína d). Estos resultados contrastan con los reportados previamente por Pérez-Alfaro y col., 2013, en donde en presencia de 2.5, 5 y 10 mg de C-2-CP/l, en cultivos nitrificantes en lote sin previa exposición a este compuesto, no hubo consumo de amonio ni producción de nitrato. Sin embargo, en comparación con el ensayo control, estas velocidades disminuyeron un 98% y 99%, respectivamente, mostrando que el 2-CP inhibe significativamente el proceso nitrificante. Asimismo, en el SBR1 se determinó un consumo de este compuesto de 83%, mostrando que para consumir 17 mg C-2-CP/l, se requirió de 24 días con una fase de retardo de 6 días. Estos resultados coinciden con los reportados por Martínez-Hernández y col. (2011) y Pérez-Alfaro y col. (2013), en los cuales, aun cuando la actividad nitrificante de los lodos se vio afectada, se observó un consumo total de 2-CP en todos los casos.

Balance de materia en el reactor nitrificante SBR1 en presencia de 2-CP durante el ciclo 1 de operación:

[93.24 mg N-NH₄⁺/l entrada] = [82.04 mg N-NH₄⁺/l salida] + [0 mg N-NO₂⁻/l] + [3.5 mg N-NO₃⁻/l] + [3.6 mg N-proteína/l]

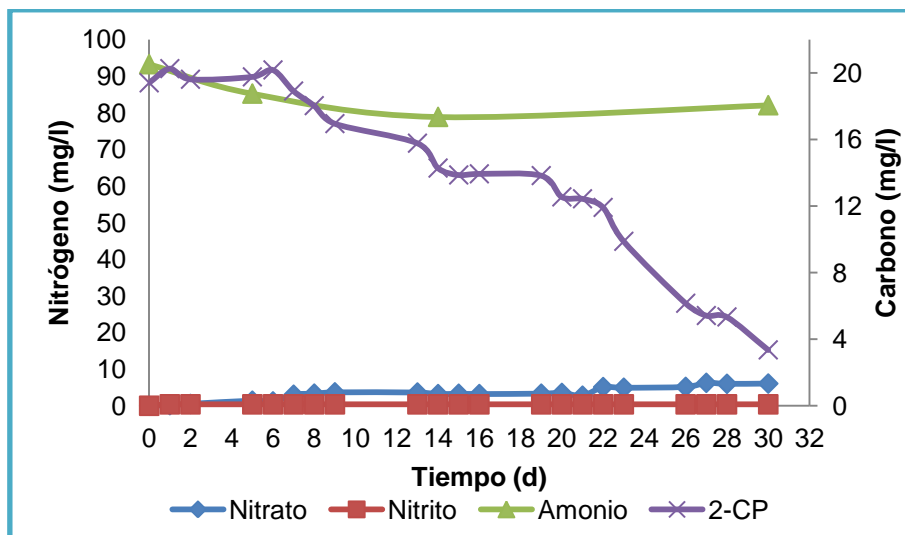


Figura 14. Perfil del reactor nitrificante SBR1 con 2-CP en el ciclo 1 de operación.

La figura 15 muestra el perfil cinético durante el ciclo 3 de operación en el SBR1, donde la eficiencia de consumo de amonio fue de 99.14% con una acumulación de nitrito transitoria. Al término del ciclo se presentó la máxima producción de nitrato, correspondiente a un rendimiento de 0.99.

El balance de materia indicó que gran parte del $N-NH_4^+$ alimentado se consumió y se oxidó a $N-NO_3^-$ junto con una ligera producción $N-NO_2^-$ residual.

Balance de materia en el reactor nitrificante SBR1 en presencia de 2-CP durante el ciclo 3 de operación:

$$[94.51 \text{ mg } N-NH_4^+/\text{l entrada}] = [0 \text{ mg } N-NH_4^+/\text{l salida}] + [1.24 \text{ mg } N-NO_2^-/\text{l}] + [92.84 \text{ mg } N-NO_3^-/\text{l}] + [1.32 \text{ mg } N\text{-proteína}/\text{l}]$$

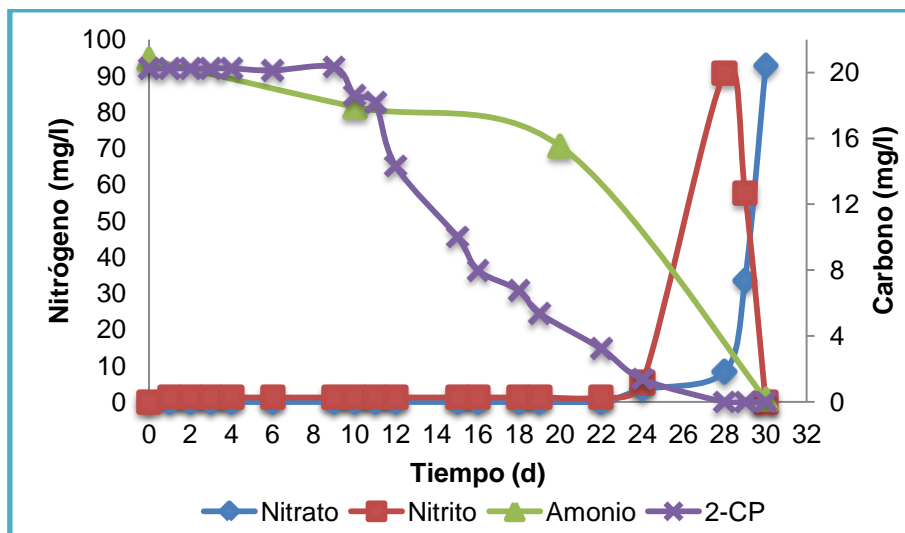


Figura 15. Perfil del reactor nitrificante SBR1 con 2-CP en el ciclo 3 de operación.

Bajo estas condiciones se determinaron las velocidades específicas q $N-NH_4^+$ de 0.0086 y q $N-NO_3^-$ de 0.0252 (mg N/mg de proteína d), las cuales aumentaron 3 y 50 veces con respecto al ciclo 1 de operación, respectivamente (Tabla 6), indicando que el efecto inhibitorio del 2-CP sobre el proceso nitrificante disminuyó a lo largo de los ciclos. Para este ciclo la eficiencia de consumo de 2-CP fue prácticamente del 100%.

Tabla 6. Eficiencias, rendimientos y velocidades específicas a los largo de los ciclos de operación en el SBR1 en presencia de 2-CP.

Ciclos	E $N-NH_4^+$	Y $N-NO_3^-$	q $N-NH_4^+$	q $N-NO_2^-$	q $N-NO_3^-$
1	12.02	0.31	0.0027	0	0.0005
2	99.63	1.03	0.0089	0.0806	0.0269
3	99.14	0.99	0.0086	0.0473	0.0252

E $N-NH_4^+$ =Eficiencia de consumo de amonio (%).

Y $N-NO_3^-$ =Rendimiento de producción de nitrato (mg de N producto/mg de N consumido)

$qN-NO_2^-$, q $N-NO_3^-$ =Velocidad específica de producción (mg de producto formado / mg proteína d).

q $N-NH_4^+$ =Velocidad específica de consumo (mg sustrato consumido / mg proteína d).

Durante el ciclo 1 de operación en el SBR2 (Figura 16), se presentó un consumo de amonio de 22.15%, el cual resultó ser 83% mayor en comparación con el obtenido en el SBR1 para el mismo ciclo. No se detectaron concentraciones de nitrito pero sí se detectó una ligera producción de nitrato, puesto que el rendimiento de producción de nitrato obtenido fue de 0.28. Al igual que en el SBR1, la adición de 2-CP provocó una inhibición sobre el proceso nitrificante, dando como resultado una disminución de las q $N-NH_4^+$ y q $N-NO_3^-$ con respecto al control de 98% y 99% respectivamente. Como se mencionó con anterioridad, estos resultados también contrastan con los reportados por Martínez-Hernández y col., (2011) y Pérez-Alfaro y col., (2013), donde en presencia de 2-CP, el proceso respiratorio nitrificante no se lleva a cabo. Bajo estas condiciones, en el SBR2 se presentó un consumo de 2-CP de 42%, es decir, el lodo nitrificante fue capaz de consumir 9 mg C-2-CP/l en 23 días con una fase de retardo de 7 días.

Balance de materia del reactor nitrificante SBR2 con 2-CP en el ciclo 1 de operación:

$$[85.2 \text{ mg } N-NH_4^+/\text{l entrada}] = [68.34 \text{ mg } N-NH_4^+/\text{l salida}] + [0 \text{ mg } N-NO_2^-/\text{l}] + [6.16 \text{ mg } N-NO_3^-/\text{l}] + [8.5 \text{ mg } N\text{-proteína}/\text{l}]$$

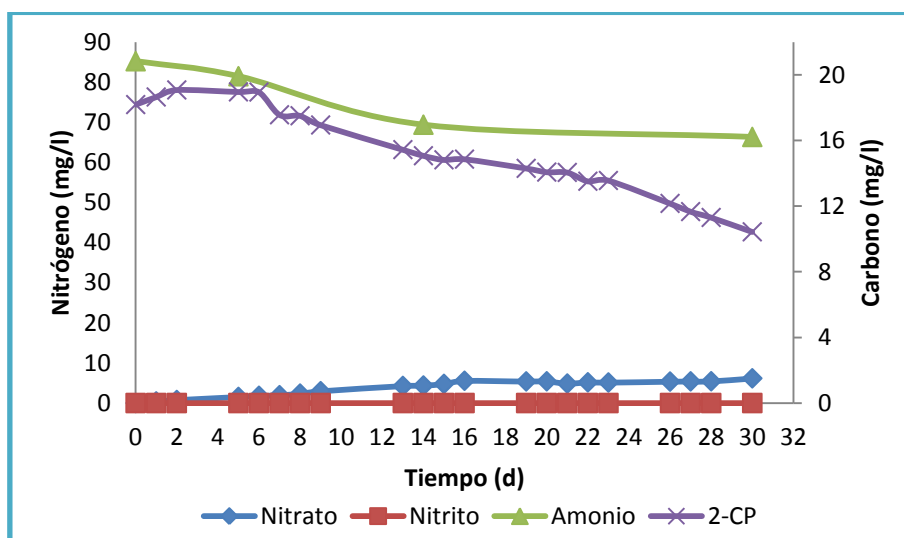


Figura 16. Perfil del reactor nitrificante SBR2 con 2-CP en el ciclo 1 de operación.

La figura 17 muestra el perfil cinético durante la operación del ciclo 3 en el SBR2. Se observa que una parte del amonio se mantuvo al final del ciclo de operación dando como resultado una eficiencia de consumo de amonio de 50.26%. El amonio consumido se oxidó mayoritariamente a nitrito y una ligera producción de nitrato, presentando un rendimiento de 0.22.

El balance de materia nos indicó que una parte del N-NH_4^+ alimentado se mantuvo en el reactor a la salida, sin embargo el SBR2 presentó una ligera producción de nitrato al final del ciclo de operación.

Balance de materia del reactor nitrificante SBR2 con 2-CP en el ciclo 3 de operación:

$$[98.47 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{l entrada}] = [45.97 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{l salida}] + [42.49 \text{ mg N-NO}_2^-/\text{l}] + [10.11 \text{ mg N-NO}_3^-/\text{l}] + [2.0 \text{ mg N-proteína/l}]$$

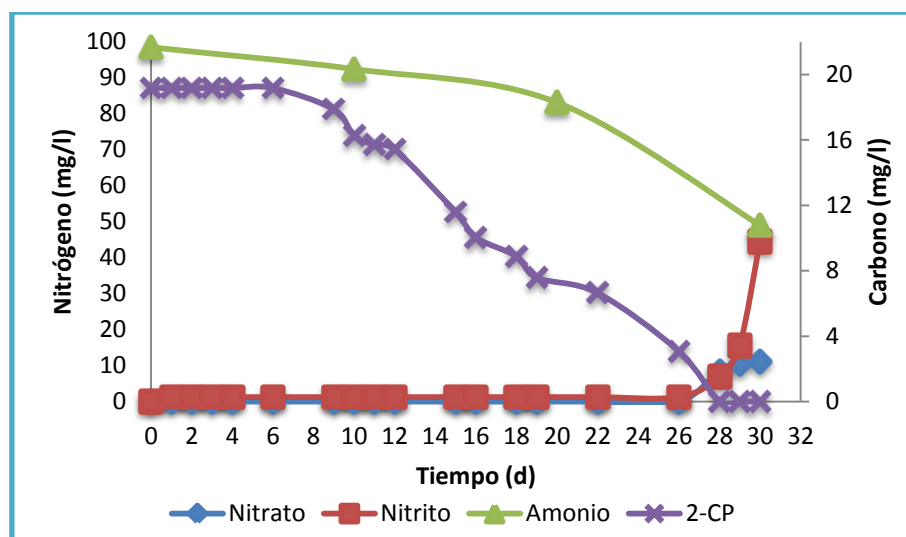


Figura 17. Perfil del reactor nitrificante SBR2 con 2-CP en el ciclo 3 de operación.

De manera similar a los resultados obtenidos en el SBR1, las velocidades específicas $q \text{ N-NH}_4^+$ y $q \text{ N-NO}_3^-$ (0.0044 y 0.0081 mg N/mg de proteína d), aumentaron 2.5 y 4.7 veces respectivamente con relación al ciclo 1 de operación (Tabla 7), indicando que el efecto inhibitorio del 2-CP sobre el proceso nitrificante

disminuyó a lo largo de los ciclos. Para este ciclo la eficiencia de consumo de 2-CP en el SBR2 fue del 100%.

Tabla 7. Eficiencias, rendimientos y velocidades específicas obtenidas a los largo de los ciclos de operación en el SBR2 en presencia de 2-CP.

Ciclos	E N-NH ₄ ⁺	Y N-NO ₃ ⁻	q N-NH ₄ ⁺	q N-NO ₂ ⁻	q N-NO ₃ ⁻
1	22.15	0.28	0.0017	0	0.0017
2	14.04	0.28	0.0012	0	0.0003
3	50.26	0.22	0.0044	0.0275	0.0081

E N-NH₄⁺ =Eficiencia de consumo de amonio (%).

Y N-NO₃⁻=Rendimiento de producción de nitrato (mg de N producto/mg de N consumido)

q N-NO₂⁻, q N-NO₃⁻=Velocidad específica de producción (mg de producto formado / mg proteína d).

q N-NH₄⁺=Velocidad específica de consumo (mg sustrato consumido / mg proteína d).

Beristain-Montiel y col. (2011), pudieron observar un incremento de hasta 5 veces en las velocidades específicas de consumo de 2-CP en un reactor SBR anaerobio (ASBR) y utilizando un lodo metanogénico previamente expuesto al 2-CP. La disminución del efecto inhibitorio del 2-CP sobre el proceso nitrificante en este trabajo puede estar asociada a la previa exposición de los lodos a compuestos fenólicos y a la utilización de los reactores de lotes secuenciados.

Aunque con el lodo utilizado en el SBR2, que había estado previamente expuesto a *p*-cresol, había sido posible en ensayos nitrificantes en lote, consumir hasta 50 mg/l de C-2-CP con eficiencias de consumo de amonio de 16% (Silva y col., 2011), en este trabajo se obtuvieron eficiencias de consumo de amonio del 50% en presencia de 20 mg/l de C-2-CP, por lo cual es posible decir que se logró un mejor desempeño en la nitrificación para el consumo de amonio y producción de nitrato con el lodo previamente expuesto a 2-CP.

9.5. Consumo de 2-Clorofenol

La tabla 8 presenta el consumo de 2-CP en el SBR1 bajo condiciones nitrificantes. Se puede observar que en el ciclo 1 de operación, el lodo nitrificante requirió de 24 días para consumir 17 mg/l C-2-CP y se presentó una fase lag para su consumo de 6 días, con una q_{C-2-CP} de 0.0017 mg C/mg de proteína d. Se han reportado velocidades similares para el consumo de 2.5 hasta 10 mg de C-2-CP en procesos nitrificantes en lote, con eficiencias de consumo de 2-CP del 100%, pero con fases de retardo desde 15 hasta 30 días y tiempos largos para su consumo desde 30 hasta 50 días (Martínez-Hernández y col., 2011; Pérez y col., 2013), mientras que en este trabajo, el lodo nitrificante fue capaz de consumir una mayor concentración de 2-CP en un menor tiempo.

Al transcurso de los ciclos, la fase lag se mantuvo entre 6 y 9 días, los tiempos de consumo disminuyeron hasta 18 días y la eficiencia de consumo de 2-CP aumentó hasta el 100%. En cuanto a la q_{C-2-CP} , hasta el ciclo 3 de operación tuvo un aumento de 2.2 veces 0.0038 mg C/mg de proteína d, indicando una mejora en la capacidad metabólica del lodo nitrificante para consumir el 2-CP.

Tabla 8. Consumo de 2-CP en el SBR1 a lo largo de los ciclos de operación.

Ciclos	[2-CP]	FL	Tc	EC-2-CP	q_{C-2-CP}
1	20	6	24	82.68	0.0017
2	20	5	19	100	0.0025
3	20	9	18	100	0.0038

[2-CP] = Concentración de 2-CP consumido (mg/l).

FL=Fase lag (días).

Tc=Tiempo de consumo (días).

EC-2-CP =Eficiencia de consumo de 2-CP (%).

q_{C-2-CP} = Velocidad específica de consumo (mg sustrato consumido / mg proteína d).

El consumo de 2-CP en el ciclo 1 de operación y en condiciones nitrificantes en el SBR2 fue de 8.4 mg/l C-2-CP, en el cual se requirieron de 23 días, una fase lag de 7 días y se alcanzó una q_{C-2-CP} de 0.0008 mg C/mg de proteína d.

Al transcurso de los ciclos, la fase lag se mantuvo entre 7 y 8 días, los tiempos de consumo disminuyeron hasta 19 días y la eficiencia de consumo de 2-CP aumentó hasta el 100%. En cuanto a la q_{C-2-CP} , aumentó hasta 3 veces en el ciclo 3 de operación (0.0024 mg C/mg de proteína d).

Tabla 9. Consumo de 2-CP en el SBR2 a lo largo de los ciclos de operación.

Ciclos	[2-CP]	FL	Tc	E_{C-2-CP}	q_{C-2-CP}
1	20	7	23	42.62	0.0008
2	20	7	21	100	0.0021
3	20	8	19	100	0.0024

[2-CP] = Concentración de 2-CP (mg/l).

FL=Fase lag (días).

Tc=Tiempo de consumo (días).

E_{C-2-CP} =Eficiencia de consumo de 2-CP (%).

q_{C-2-CP} = Velocidad específica de consumo (mg sustrato consumido / mg proteína d).

Al final del ciclo 3, en ambos reactores se observó una disminución en el efecto inhibitorio del 2-CP sobre el proceso nitrificante. Estos resultados pueden estar asociados a la utilización de un lodo previamente expuesto a compuestos fenólicos y a la utilización de un reactor de tipo SBR. Sin embargo, con los lodos nitrificantes que estuvieron en contacto previo con el 2-CP, fue posible obtener un mejor desempeño en la nitrificación y en el consumo del compuesto aromático, en comparación con los lodos que estuvieron expuestos al *p*-cresol, puesto que el consumo de 2-CP, de amonio y su oxidación a nitrato, así como sus respectivas velocidades específicas, fueron mayores. Estos resultados sugieren que además del uso de un reactor SBR, la historia del lodo juega un papel determinante en los procesos respiratorios.

10. CONCLUSIONES

- * Se logró el estado estacionario del proceso nitrificante en el SBR1 y SBR2.
- * El proceso nitrificante en los ensayos control, mostró rendimientos de formación de nitrato y eficiencias de consumo de amonio cercanos a 1 y a 100% respectivamente, en ambos reactores.
- * La adición de 20 mg C-2-CP/l a los reactores SBR provocó un efecto inhibitorio sobre el proceso nitrificante, el cual disminuyó a lo largo de los ciclos.
- * Después de 3 ciclos de operación, se obtuvo una eficiencia de consumo de amonio de 99.14% en el SBR1 y de 50.26% en el SBR2. Los Y fueron 0.99 y 0.22 para el SBR1 y SBR2 respectivamente.
- * La E del 2-CP fue de 100% en el SBR1 y en el SBR2.
- * El uso de lodos previamente expuestos a compuestos fenólicos y la utilización de un SBR resultó en una disminución del efecto inhibitorio del 2-CP sobre el proceso nitrificante, consiguiendo un mejor desempeño con los lodos previamente expuestos al 2-CP.

11. REFERENCIAS

- Ahn J.H., Kwan T. and Chandran K. (2011). Comparison of partial and full nitrification process applied for treating high-strength nitrogen wastewaters: Microbial ecology through nitrous oxide production. *Environmental Science and Technology*. 45(7): 2734-2740
- Andersson K. K., Kent T. A., Lipscom J. D., Hooper, A. B. and Muck E. (1984). J. *Biol. Chem.* 259: 6833-6840.
- Anthonisen A. C., Loehr R. C., Prakasom T. B. S. and y Srinath E. G. (1976). Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *Journal of Water Pollution Control Federation*. 48(5): 835-851.
- Alemayehu M., Kumar P. and Kumar A. (2001). Use of sequencing batch reactor for biological denitrification of high nitrate-containing water. *Journal of environmental engineering*. 127(3): 273-278.
- Armenante P. M., Kafkewitz D., Lewandowski G. A. and Jou C. J. (1999). Anaerobic-aerobic treatment of halogenated phenolic compounds. *Water Res.* 33: 681-692.
- Bernet N. and Spérandio M. (2006). Application of biological treatment systems for nitrogen-rich wastewaters. In *Advanced Biological Treatment Processes for Industrial Wastewaters*, F. Cervantes, S. Pavlostathis, and A. van Haandel (ed.), IWA Publishing, London. 186-208.
- Bernet N. and Spérandio M. (2009). Principles of nitrifying processes. En: *Environmental technologies to treat nitrogen pollution*. 1ra edición. Editorial: IWA Publishing, London. pp. 23-39.
- Beristain-Montiel L., Gómez-Hernández J., Monroy-Hermosillo O., Cuervo-López F. and Ramírez-Vives F. (2010). Methanization and mineralization of 2-chlorophenol by anaerobic digestion. *Water Science and technology*. 62(8): 1791-1798.

- Beristain-Montiel L., Gómez J., Monroy O., Cuervo-López F., Ramírez-Vives F., (2011). Biodegradation of 2-chlorophenol (2CP) in an anaerobic sequencing batch reactor (ASBR). *Water Science and technology*. 65(10): 1721–1728
- Bock E; Koops HP, Harms H and Ahlers B, (1986) In nitrification. (L.I: Prosser ed.). *Especial publications of the society for general microbiology*. 20: 17-38
- Bock E., Koops H.P., Harms H. and Ahlers B. (1991). The biochemistry of nitrifying microorganism, in variations in Autotrophic life, Bock E (Ed)(*academic Press London*). 171-200.
- Breemen N.V. (2002). Nitrogen cycle: Natural organic tendency. *Nature*. 415: 381-382
- Buitrón G., Soto G., Vite G. and Moreno J. (2001). Strategies to enhance the biodegradation of toxic compounds using discontinuous processes. *Water Science and technology*. 43(3): 283-290.
- Camargo J.A. and Alonso A. (2006). Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. *Environment international*. 32: 831-849.
- Camargo J.A and 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 (2): 98-110.
- Cuervo López F M. (2003). Estudio biológico-fisicoquímico de un lodo desnitrificante alimentado con diferentes fuentes de electrones. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México.
- Castingnetti D. and Hollocher T.C. (1985). Heterotrophic nitrification among Denitrifiers. *Curr Microbiol*. 6: 229-231.

- Dangcong P., Bernet N., Delgenes J-P and Moletta R. (1999). Aerobic granular sludge-a case report. *Wat. Res.* 3: 890-893.
- Digger G.T., Robbins M.H. and Marshall B.R. (1985). The design of selector to control low F/M filamentous bulking. *J. Pollut. Control Fed.* 57: 2220-2226
- Ehrich S., Behrens D., Lebedeva E., Ludwig W. and Bock E. (1995). A new obligately chemolithoautotrophic, nitrite-oxidizing bacterium, *Nitrospira moscoviensis* sp nov and its phylogenetic relationship. *Archives of Microbiology.* 164: 16-23.
- EPA (Environmental Protection Agency). (1987). Design manual: phosphorus removal. EPA/625/1-87/001. Cincinnati, OH.U.S.A.
- Fernández-Polanco, F., García, P.A., Rodríguez, P., Bueno, J.M., Real, J.F., Acitores, M. (1993). "Sistemas combinados aerobios anaerobios: aplicación a aguas urbanas", en Depuración Anaerobia de Aguas Residuales, Valladolid, 26-28 de mayo.
- Gallego A., Molina Tirado L.B., Fortunato M.S., Bevilacqua S., Camardella H., Kabbas S., Cenzano M.L., Gómez C.E., D'Aquino M., Korol S. Higa L.E. (1998). Biodegradación de 2-clorofenol en reactores aeróbicos empleando microorganismos autóctonos. Asociación Peruana de Ingeniería Sanitaria y Ambiental; AIDIS. Gestión ambiental en el siglo XXI. Lima, APIS. pp.1-8.
- Gerardi M.H. (2002). Nitrification and Denitrification in the Activated Sludge Process. Editorial: Wiley-Interscience, John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Gieseke A., Tarre S., Green M., de Beer D. (2006). Nitrification in a biofilm at low pH values: Role of in situ microenvironments and acid tolerance. *Applied and Environmental Microbiology.* 72(6): 4283-4292.
- Gijs J. and Robertson L. (1994). Combined nitrification-denitrification processes. *FEMS Microbiology Reviews.* 15(2-3): 109-117.

- Gómez J., Mendez J.R. and Lema J.M. (2000). Kinetic study of addition of volatile organic compounds to a nitrifying sludge. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 88: 1-12.
- Harris D.C. (2003). Análisis Químico Cuantitativo. 3ra edición. Editorial:Reverté. Apéndice G pp. AP-13.
- Hernández L. (2005). Estudio del proceso respiratorio y estructura de un lodo desnitrificante en presencia de acetato y tolueno en un SBR. Tesis de maestría UAM-Iztapalapa.
- Hernández L., Buitron G., Gomez J. and Cuervo-Lopez F.M. (2008). Denitrification of toluen and slugde settleability. Proceedings of 4th IWA Specialized Conference on Sequencing Batch Reactor Technology SBR. S. Michele a Ripa, Rome, Italy. 69-72.
- Head I.A., Hoirns W.D., Emblet T.M., McCarthy A.J. and Saunders J.R. (1993). The phylogeny of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria as determined by analysis of 16S ribosomal RNA gene sequences. *Journal of General Microbiology*.139: 1147-1153.
- Hollocher T.C., Tate M.E. and Nicholas D.J.D. (1981). Oxidation of ammonia by *Nitrosomonas europaea*: definitive 18O-tracer evidence that hydroxylamine formation involves a monooxygenase. *Journal of Biological chemistry*, 256(21): 10834-10836
- Inui T., Tanaka Y., Okayasu Y. and Tanaka H. (2002). Application of toxicity monitor using nitrifying bacteria biosensor to sewerage systems. *Water Science and technology*. 45: 271-278.
- Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.A., Stanley J.T. y Williams S.T. (1994). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9na Edición. Editorial: Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia. pp 447-450.
- Irvine, R., Wilderer, P., Flemming, H. (1997). Controlled unsteady state processes and technologies – an overview. *Water Science and technology*. 35(1): pp 1-10.

- Juliette L.Y., Hyman M.R. and Arp D.J. (1993). Inhibition of ammonia oxidation in *Nitrosomonas europaea* by sulfur compounds: thioethers are oxidized to sulfoxides by ammonia monooxygenase. *Applied and Environmental Microbiology*. 59(11): 3718-3727
- Kenner W., Arp D. J. (1994) Transformation of aromatics compounds by *Nitrosomonas europaea*. *Appl. Microbiol.* 60: 1914-1920.
- Ketchum J. (1997). Design and Physical Features of Sequencing Batch Reactors. *Water Science and technology*. 35(1): 11-18.
- Kowalchuk G.A. and Stephen J.R. (2001). Ammonia-oxidizing bacteria: A model for molecular microbial ecology. *Annual Review of Microbiology*. 55: 485–529
- Kostyal E., Nurmiaho-Lassila L. E., Puhakka J. A., Salkinoja-Salonen M. Nitrification, denitrification, and dechlorination in bleached kraft pulp mill wastewater, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47 (1997): 734–741.
- Laanbroek H.J. and Gerards S. (1993). Competition for limiting amounts of oxygen between *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter winogradskyi* grown in mixed continuous cultures. *Archives of Microbiology*. 159: 453-459.
- Lee D., Jong M.P.(1999) Neural network modeling for on-line estimation of nutrient dynamics in a sequentially-operated batch reactor. *Journal of biotechnology*. 75: 29-239.
- Lens, P. and Kuenen, J. (2001). The biological sulfur cycle: novel opportunities for environmental biotechnology. *Water Science and technology*. 44(8): 57-66.
- Lin Y.M., Tay J-H., Liu Y. and Hung Y-T. (2009). Biological nitrification and denitrification processes. En: Biological treatment processes, volumen 8. Editorial: Humana Press. pp 539-580.
- Lloyd H. Ketchum Jr. (1997). Design and physical features of sequencing batch reactors. *Water Science and technology*. 35(1): pp11-18

- Majumder P.S. and Gupta S. K. (2007). Removal of chlorophenols in sequential anaerobic-aerobic reactors, *Bioresour. Technol.* 98:118–129.
- McCarty G.W. (1999). Modes of action of nitrification inhibitors. *Biology and Fertility of Soils.* 29(1): 1–9
- Martinez-Hernandez S., Texier A-C., Cuervo-López F., Gomez J. (2011). 2-Chlorophenol and its effect on the nitrifying sludge, *J. Hazard.Mater.* 185: 1592–1595.
- Martínez F. (2003). Sedimentabilidad de un lodo nitrificante en dos tipos de reactores y en presencia de material orgánica. Tesis doctoral. Laboratorio de Fisiología Microbiana, CBS Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México.
- Michael G.R., Shimitzu G.P. and Jenkins, D. (1985) The growth physiology of the filamentous organism type 021 N and its significance activated sludge bulking. *J. Water Pollut. Control Fed.* 57: 1152-1162
- Monroy O.; Fama G.; Meraz M.; Montoya L. and Macarie H. (2000). Anaerobic digestion for wastewater treatment in México: State of the technology. *Water Research.* 36(4):1803-1816
- Monroy O.; Galván A., Gómez E. y González A. (2006) Manejo sustentable del agua en el Distrito Federal, México En el SXXI, Editorial UAM-I, pp
- Moore T.A.; Xing Y.; Lazaenby B.; Lynch M.D.J.; Schiff S.; Robertson W.D.; Timlin R.; Lanza S.; Ryan M.C.; Aravena R.; Fortin D.; Clark I.D. and Neufeld J.D. (2011). Prevalence of anaerobic ammonium-oxidation bacteria in contaminated groundwater. *Environmental Science and Technology.* 45(17): 7217-7225
- Moreno-Andrade I., and Buitrón G. (2004). Evolución de la actividad de los microorganismos en los procesos de aclimatación y des aclimatación al 4-clorofenol. XIV Congreso Nacional de la Federacion Mexicana de Ingenieria Sanitaria y Ciencias Ambientales AC, Mazatlán, Sinaloa.

- Peng Y. and Zhu G. (2006). Biological nitrogen removal with nitrification and denitrification via nitrite pathway. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 75: 15-26.
- Pérez A. (2007). Evaluación del efecto del fenol en la nitrificación y sedimentabilidad de un lodo utilizando un reactor de lote secuenciado (SBR). Tesis de especialidad. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.
- Pérez A. (2010). Efecto del 2-clorofenol sobre la nitrificación. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.
- Pérez-Alfaro J. E., Buitrón G., Gomez J., Texier A-C. and Cuervo-López F. M. (2013). Kinetic and Physiological Evaluation of Ammonium and Nitrite Oxidation Processes in Presence of 2-Chlorophenol. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 169(3):990-1000.
- Prosser, J.I. (1989) autrophic nitrification in bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* 30.pp 125-181
- Puhakka JA, Melin ES, Jarvinen KT (1995) Fluidized-bed biofilms for chlorophenol mineralization. *Water Science and technology*. 31:227–235
- Purkhold U., Pommerening-Röser A., Juretschko S., Schmid M.C., Koops H.P. and Wagner M. (2000). Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and *amoA* sequence analysis: Implications for molecular diversity surveys. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(12): 5368-5382.
- Robertson L.A. and Kuenen J.G. (1988). Heterotrophic nitrification in *Thiosphaera pantotropha*: Oxygen uptake and enzyme studies. *Journal of General Microbiology*. 134: 857-862.
- Robinson, K.G., Sayler G.S. and Janalyn, J.R. (2004). Used of Novel Techniques to Quantify Phenotypes in Biological Treatment Process, IWA Publishing, Orlando, USA 2.11- 2.12.

- Sato H., Sasaki, Y., Nakamura Y., Okabe S., Suzuki T. (2005). Use of microelectrodes to investigate the effects of 2-chlorophenol on microbial activities in biofilms. *Wiley Interscience*. 91: 133-137.
- Schramm A. (2003). In situ analysis of structure and activity of the nitrifying community in biofilms, aggregates, and sediments. *Geomicrobiology Journal*. 20: 313-333.
- Schweighofer P., Nowak O., Svardal K. and Kroiss H. (1996). Steps towards the upgrading of a municipal WWTP affected by nitrification inhibiting compounds-A case study. *Water Science and Technology*. 33(12): 39-46.
- Shammas N.K. (1986). Interactions of temperature, pH and biomass on the nitrification process. *Journal. Water Pollution Control Federation*. 58(1): 52-59.
- Silva C.D., Gómez J., Beristain-Cardoso R. (2011). Simultaneous removal of 2-chlorophenol, phenol, p-cresol and p-hydroxybenzaldehyde under nitrifying conditions: Kinetic study. *Bioresource Technology*. 102: 6464–6468
- Smith A.J. and Hoare D.S. (1968). Acetate assimilation by *Nitrobacter agilis* in relation to its "Obligate Autotrophy". *Journal of Bacteriology*. 95(3), 844-855.
- Schramm A. (2003). In situ analysis of structure and activity of the nitrifying community in biofilms, aggregates and sediments. *Geomicrobiology Journal*. 20, 313-333.
- Solomons T. W. Graham. (2000) Química orgánica. Ed. Limusa-Wiley, México, Pág.1124.
- Stein L.Y., Arp D.J. and Hyman M.R. (1997). Regulation of the synthesis and activity of ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea* by altering pH to affect NH₃ availability. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(11): 4588-4592.

- Steinmüller W. and Bock E. (1977). Enzymatic studies of autotrophically, mixotrophically and heterotrophically grown of *Nitrobacter agilis* with special reference to nitrite oxidase. *Archives of Microbiology*. 115: 51-54.
- Tchobanoglous G. and Burton F.L. (1991). Metcalf & Eddy Wastewater engineering: Treatment, disposal and reuse. 3ra ed. McGraw-Hill, New York. pp. 735-740.
- Teske A., Alm E., Reagan J.M., Toze S., Rittmann B.E. and Stahl D.A. (1994). Evolutionary relationships among ammonia and nitrite oxidizing bacteria. *Journal of Bacteriology*. 176(21): 6623-6630.
- Texier A-C. and Gomez J. (2002) Tolerante of nitrifying sludge to p-cresol. *Biotechnology Letters*. 24: 321-324.
- Texier A.-C. and Gómez J. (2004). Settleability and kinetics of a nitrifying sludge in a sequencing batch reactor. *Canadian Journal of Microbiology*. 50: 943–949.
- Texier A-C. and Gomez J. (2007). Simultaneous nitrification and p-cresol oxidation in anitrifying sequencing batch reactor. *Water research*. 41: 315-322.
- Texier Anne-Claire, Zepeda Alejandro, Gómez Jorge and Cuervo-López Flor (2012). Simultaneous Elimination of Carbon and Nitrogen Compounds of Petrochemical Effluents by Nitrification and Denitrification, Petrochemicals, DrVivek Patel (Ed.)
- Torrijos M., Moletta R.; (1997) Winery Wastewater Depollution by Sequencing Batch Reactor. *Water Science and technology*. 35(1):249-250.
- Watson S.W., Bock E., Koops H.P. and Hooper A. (1989). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volumen 3. Editorial: The Williams and Wilkins, Baltimore. pp 1808-1834.
- Whittaker, M.; Bergmann, D.; Arciero, M. and Hooper, A.B. (2000). Electron transfer during the oxidation of ammonia by the chemolithotrophic bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1459(2-3): 346-355.

-Wiesmann U. (1994). Biological nitrogen removal from wastewater. In: Advances in biochemical engineering/biotechnology, A. Fiechter, (Ed.), 113-154, Springer, Verlag, Berlin

-Winogradsky S. (1890). Recherches sur les organismes de la nitrification. Annales de l'Institut Pasteur. 5: 257-275.

-Zepeda A., Texier A-C., Razo-Flores E. and Gómez J. (2006). Kinetic and metabolic study of benzene, toluene and m-xylene in nitrifying batch cultures. *Water Research*. 40: 1643-1649.