



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
METROPOLITANA**

**UNIDAD IZTAPALAPA  
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
Y DE LA SALUD**

**Departamento de Biotecnología**

---

---

# **Efecto inhibitorio del sulfuro sobre un proceso respiratorio nitrificante**

## **TESIS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA**

## **PRESENTA:**

**I.B.I. DIEGO IVAN BEJARANO ORTIZ**

## **COMITÉ TUTORIAL**

**Directora:** Dra. Anne-Claire Texier

**Asesora:** Dra. Flor de María Cuervo López

**Asesora:** Dra. Edna Rosalba Meza Escalante

México, D.F

Enero 2010

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. Además de recibir una beca por el CONACyT para su realización.

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad del CONACyT”.

Iztapalapa, D.F. a 21 de Enero de 2010

El H. Jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la  
Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa aprobó la tesis

**EFFECTO INHIBITORIO DEL SULFURO SOBRE UN PROCESO RESPIRATORIO  
NITRIFICANTE**

**Que presentó**

I.B.I. Diego Ivan Bejarano Ortiz

**Comité tutorial**

Dra. Anne-Claire Texier  
Directora, UAM-Iztapalapa

Dra. Flor de María Cuervo López  
Asesora, UAM-Iztapalapa

Dra. Edna Rosalba Meza Escalante  
Asesora, Instituto Tecnológico de Sonora

**H. Jurado**

**Presidenta:** Dra. Florina Ramírez Vives  
UAM-Iztapalapa

\_\_\_\_\_

**Secretaria:** Dra. Flor de María Cuervo López  
UAM-Iztapalapa

\_\_\_\_\_

**Vocal:** Dra. Edna Rosalba Meza Escalante  
Instituto Tecnológico de Sonora

\_\_\_\_\_

**Vocal:** Dr. Francisco J. Cervantes Carrillo  
IPICyT

\_\_\_\_\_

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco la dirección de la Dra. Anne-Claire Texier durante la escritura y evaluación de esta tesis, gracias por su apoyo y sugerencias, profesionalismo, dedicación y sobre todo las horas extras que me brindo para poder terminar esta meta en mi vida.

Al Dr. Jorge Gómez, la Dra. Flor Cuervo y la Dra. Edna Rosalba Meza por darme de su tiempo para aclarar mis dudas, inquietudes y enseñarme tantas cosas; tanto personales como profesionales, gracias por brindarme la oportunidad de ser parte del laboratorio de fisiología microbiana, y poder cumplir una meta más en mi vida profesional, gracias por las críticas constructivas y su tiempo.

Al jurado que revisó este trabajo por sus comentarios y sugerencias que realimentaron este escrito haciéndolo más completo.

A los compañeros y amigos del laboratorio de fisiología microbiana, Emir, David, Darío, Sergio, Emmanuel, Vicente, Ricardo, Felipe, gracias por su amistad, el buen ambiente de trabajo y por compartir sus ideas, pero sobre todo por apoyarme con su experiencia.

A los compañeros de generación que compartimos una etapa inolvidable de nuestras vidas, gracias por su amistad.

A mis amigos de licenciatura por su compañía, apoyo en los momentos difíciles y en los momentos buenos, gracias.

## **Dedicatorias:**

### **A mis padres**

Por su cariño, enseñanzas y darme lo necesario  
para enfrentarme a la vida.

### **A mis hermanos**

Por su amistad, apoyo, consejos y compañía,  
pero sobre todo por ser mis mejores amigos.

### **A Chelo**

Gracias por ser mi amiga, confidente y amada,  
por tú tiempo y apoyo incondicional, pero  
sobre todo por tú alegría.

*Hay dos maneras de difundir la luz...*

*ser la lámpara que la emite,*

*o el espejo que la refleja.*

**Thomas Alva Edison (1847 – 1931)**

## Índice General

<b>Resumen</b> .....	<b>V</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>VII</b>
<b>I. Introducción</b> .....	<b>1</b>
I.1 Problemática.....	<b>1</b>
I.2 Fuentes industriales de contaminación por compuestos nitrogenados y azufrados.....	<b>3</b>
I.3 Tratamiento de aguas residuales.....	<b>6</b>
I.4 Nitrificación.....	<b>6</b>
I.4.1 Bioquímica de la nitrificación.....	<b>8</b>
I.4.2 Microbiología de la nitrificación.....	<b>9</b>
I.4.3 Factores ambientales que afectan la nitrificación.....	<b>11</b>
I.4.3.a Efecto de la temperatura.....	<b>11</b>
I.4.3.b Efecto del pH.....	<b>12</b>
I.4.3.c Efecto de la concentración de oxígeno.....	<b>12</b>
I.4.3.d Efecto de compuestos inhibidores.....	<b>13</b>
I.5 El sulfuro y su oxidación.....	<b>13</b>
I.5.1 Química del azufre.....	<b>13</b>
I.5.2 Ciclo del azufre.....	<b>15</b>
I.5.3 Efecto del sulfuro sobre procesos microbianos.....	<b>17</b>
<b>II.- Antecedentes</b> .....	<b>19</b>
<b>III.- Justificación</b> .....	<b>22</b>
<b>IV.- Hipótesis</b> .....	<b>22</b>
<b>V.- Objetivos</b> .....	<b>22</b>
V.1 Objetivo General.....	<b>22</b>
V.2 Objetivos Particulares.....	<b>22</b>
<b>VI.- Materiales y Métodos</b> .....	<b>23</b>
VI.1 Reactor nitrificante en continuo.....	<b>23</b>
VI.2 Cultivos en lote con un consorcio nitrificante.....	<b>24</b>
VI.3 Variables de respuesta del proceso nitrificante.....	<b>25</b>
VI.4 Cultivos control.....	<b>27</b>
VI.5 Métodos Analíticos.....	<b>27</b>
VI.5.1 Cuantificación de amonio.....	<b>28</b>
VI.5.2 Medición de nitrito y nitrato.....	<b>29</b>
VI.5.3 Cuantificación de sulfuro.....	<b>30</b>
VI.5.4 Cuantificación de sulfato y tiosulfato.....	<b>31</b>
VI.5.5 Medición de proteína microbiana.....	<b>32</b>

<b>VII. Resultados Y Discusión.....</b>	<b>33</b>
VII.1 Reactor en continuo.....	33
VII.2 Cinéticas de la nitrificación en lote.....	34
VII.2.1 Cinética con biomasa estéril.....	34
VII.2.2 Cultivo control nitrificante.....	36
VII.2.3 Cinética nitrificante con 112 mg S <sup>2-</sup> /L.....	37
VII.2.4 Cinética nitrificante con 58 mg S <sup>2-</sup> /L.....	38
VII.2.5 Cinética nitrificante con 13 mg S <sup>2-</sup> /L.....	39
VII.2.6 Comparación de las variables de respuesta de la nitrificación a diferentes concentraciones de sulfuro.....	41
VII.3 Oxidación del sulfuro en cultivos nitrificantes.....	44
VII.3.1 Cinética abiótica.....	44
VII.3.2 Oxidación del sulfuro en los cultivos nitrificantes.....	46
VII.4 Efecto del sulfato sobre la nitrificación.....	48
VII.5 Efecto del oxígeno sobre la nitrificación.....	49
VII.6 Efecto del pH sobre la nitrificación.....	50
<b>VIII. – Conclusiones.....</b>	<b>51</b>
<b>IX. - Bibliografía.....</b>	<b>52</b>

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1</b>	Niveles de toxicidad del H <sub>2</sub> S y su efecto a la salud (Janssen, 1996).....	<b>3</b>
<b>Tabla 2</b>	Aguas residuales industriales que contienen altas concentraciones de nitrógeno (Tandukar y col., 2009).....	<b>4</b>
<b>Tabla 3</b>	Aguas residuales de industrias que contienen altas concentraciones de sulfuro y sulfato (Tandukar y col., 2009).....	<b>5</b>
<b>Tabla 4</b>	Estados de oxidación de compuestos azufrados modificados de Brüser y col. (2000).....	<b>14</b>
<b>Tabla 5</b>	Estudios sobre el efecto del sulfuro sobre la nitrificación.....	<b>19</b>
<b>Tabla 6</b>	Composición del medio de cultivo alimentado al reactor nitrificante en continuo.....	<b>24</b>
<b>Tabla 7</b>	Concentraciones de los nutrientes del medio de cultivo nitrificante en lote.....	<b>24</b>
<b>Tabla 8</b>	Métodos analíticos utilizados durante el proyecto experimental para el análisis de compuestos en las aguas residuales.....	<b>27</b>
<b>Tabla 9</b>	Valores de R <sup>2</sup> , pendiente y ordenada de la curva estándar de amonio.....	<b>28</b>
<b>Tabla 10</b>	Valores de R <sup>2</sup> , pendiente y ordenada de la curva estándar de nitrito.....	<b>29</b>
<b>Tabla 11</b>	Valores de R <sup>2</sup> , pendiente y ordenada de la curva estándar de nitrato.....	<b>30</b>
<b>Tabla 12</b>	Valores de R <sup>2</sup> , pendiente y ordenada de la curva estándar de sulfuro.....	<b>30</b>
<b>Tabla 13</b>	Valores de R <sup>2</sup> , pendiente y ordenada de la curva estándar tiosulfato.....	<b>31</b>
<b>Tabla 14</b>	Valores de R <sup>2</sup> , pendiente y ordenada de la curva estándar sulfato.....	<b>31</b>
<b>Tabla 15</b>	Valores de R <sup>2</sup> , pendiente y ordenada de la curva estándar de proteína.....	<b>32</b>
<b>Tabla 16</b>	Balance de nitrógeno en el reactor nitrificante en continuo.....	<b>33</b>
<b>Tabla 17</b>	Valores promedio y desviación estándar de las variables de respuesta, durante 106 días de seguimiento del reactor nitrificante en continuo, utilizado como fuente de inóculo .....	<b>34</b>
<b>Tabla 18</b>	Variables de respuesta del proceso respiratorio nitrificante de la cinética control.....	<b>36</b>
<b>Tabla 19</b>	Fases de retardo y velocidades específicas de la nitrificación a las diferentes concentraciones de exposición de sulfuro (13, 58 y 112 mg S-HS/L) comparadas con el control.....	<b>43</b>
<b>Tabla 20</b>	Balance de azufre a diferentes concentraciones iniciales de sulfuro adicionado a los cultivos nitrificantes.....	<b>47</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b>	Ciclo global del nitrógeno (Cuervo-López y col., 2009).....	<b>7</b>
<b>Figura 2</b>	Reacciones del proceso respiratorio nitrificante.....	<b>8</b>
<b>Figura 3</b>	Listado de bacterias que llevan a cabo la amonio-oxidación y nitrito-oxidación, con el respectivo estado de oxidación del nitrógeno durante el proceso (Camilla, 1998).....	<b>9</b>
<b>Figura 4</b>	Ciclo global del azufre (Robertson y Kuenen, 1992).....	<b>16</b>
<b>Figura 5</b>	Reactor nitrificante en continuo.....	<b>23</b>
<b>Figura 6</b>	Curva estándar de amonio.....	<b>28</b>
<b>Figura 7</b>	Curva estándar de nitrito y nitrato.....	<b>29</b>
<b>Figura 8</b>	Curva estándar de sulfuro.....	<b>30</b>
<b>Figura 9</b>	Curva estándar de sulfato y tiosulfato.....	<b>31</b>
<b>Figura 10</b>	Curva estándar de concentración de proteína microbiana.....	<b>32</b>
<b>Figura 11</b>	Perfil del reactor nitrificante en continuo.....	<b>33</b>
<b>Figura 12</b>	Perfiles de concentración de sulfuro y amonio, utilizando biomasa esterilizada en ausencia de oxígeno.....	<b>35</b>
<b>Figura 13</b>	Perfiles de consumo de amonio y formación de nitrito y nitrato en los cultivos en lote control sin sulfuro.....	<b>36</b>
<b>Figura 14</b>	Perfiles de consumo de amonio y formación de nitrito y nitrato en los cultivos nitrificantes expuestos a 112 mg S-HS <sup>-</sup> /L.....	<b>37</b>
<b>Figura 15</b>	Perfiles de consumo de amonio y producción de nitrito y nitrato en cultivos nitrificantes expuestos a 58 mg S-HS <sup>-</sup> /L.....	<b>38</b>
<b>Figura 16</b>	Perfiles de consumo de amonio y producción de nitrito y nitrato en cultivos nitrificantes expuestos a 13 mg S-HS <sup>-</sup> /L.....	<b>40</b>
<b>Figura 17</b>	Eficiencias de consumo de amonio determinadas a diferentes concentraciones de exposición de sulfuro (0, 13, 58 y 112 mg S-HS <sup>-</sup> /L).....	<b>41</b>
<b>Figura 18</b>	Rendimientos de nitrito y nitrato determinados a diferentes concentraciones de exposición de sulfuro (0, 13, 58 y 112 mg S-HS <sup>-</sup> /L).....	<b>42</b>
<b>Figura 19</b>	Velocidades específicas de consumo de amonio y formación de nitrato determinadas a diferentes concentraciones de exposición del inóculo nitrificante al sulfuro (0, 13, 58 y 112 mg S-HS <sup>-</sup> /L).....	<b>43</b>
<b>Figura 20</b>	Perfiles de oxidación de sulfuro y amonio en ensayos abióticos.....	<b>45</b>
<b>Figura 21</b>	Perfiles de oxidación del sulfuro adicionado en los cultivos nitrificantes a las siguientes concentraciones: 112 ± 2.5 (A), 58 ± 2.5 (B) y 13 ± 0.7mg S-HS <sup>-</sup> /L (C).....	<b>46</b>
<b>Figura 22</b>	Velocidades de oxidación de sulfuro a diferentes concentraciones iniciales de exposición al cultivo nitrificante (13, 58 y 112 mg S-HS <sup>-</sup> /L).....	<b>47</b>
<b>Figura 23</b>	Perfil de consumo de amonio y producción de nitrito y nitrato en cultivos nitrificantes expuestos a 83.2 ± 2.6 mg S-SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> /L.....	<b>48</b>
<b>Figura 24</b>	Perfil de pH durante la cinética control sin sulfuro y con sulfuro adicionado a 13 ± 0.7, 58 ± 2.5y 113 ± 2.5mg S-HS <sup>-</sup> /L.....	<b>50</b>

## RESUMEN

La contaminación del agua es un grave problema que aqueja a México y a todo el mundo. Esta contaminación se da por altas concentraciones de compuestos carbonados, nitrogenados y azufrados, entre otros. Las aguas residuales pueden provenir de industrias o de hogares. Estas aguas son desechadas a mantos acuíferos receptores sin ser tratadas, provocando fenómenos contaminantes como la eutrofización así como graves daños a la salud humana y al medio ambiente. El principal contaminante nitrogenado es el amonio así como el sulfuro en el caso del azufre, este compuesto es altamente tóxico y con altas capacidades corrosivas. Se ha encontrado que el amonio y el sulfuro se pueden encontrar en una gran cantidad de efluentes industriales como: la industria petroquímica, agroalimentaria, papelera, sólo por citar algunas, observándose grandes concentraciones de estos dos contaminantes. Una posible forma de tratamiento de aguas contaminadas por amonio es la nitrificación-desnitrificación. La nitrificación es un proceso respiratorio quimiolitotrófico donde el amonio es oxidado a nitrito y posteriormente hasta nitrato. El nitrato puede ser luego reducido a nitrógeno molecular por desnitrificación. Aún no se conoce bien qué efecto tiene el sulfuro sobre el proceso respiratorio nitrificante. Algunos autores mencionan que el sulfuro provoca un efecto inhibitorio sobre la nitrificación, sin embargo en estos estudios no se presentan datos cinéticos ni variables de respuesta que den una afirmación a estas suposiciones, es decir no se conoce bien si el sulfuro provoca una inhibición o es su toxicidad la que afecta el proceso nitrificante.

Por lo anterior el objetivo de este estudio fue ampliar la información del efecto del sulfuro sobre la nitrificación, mediante variables de respuesta como: eficiencia de consumo de amonio y rendimientos de formación de nitrito y nitrato, así como variables cinéticas como: velocidad específica de consumo de amonio y velocidad de formación de nitrato, que determinarán cuál es el efecto del sulfuro sobre la nitrificación.

Este estudio se realizó en cultivos en lote inoculados con el lodo nitrificante de un reactor continuo de tanque agitado en régimen estacionario. En este reactor se obtuvo una eficiencia de consumo de amonio ( $E\text{-NH}_4^+$ ) de  $100\% \pm 3.4$  y un rendimiento de producción de nitrato ( $Y_{\text{NO}_3}$ ) de  $0.96 \pm 0.09$ . En los cultivos en lote sin sulfuro, el proceso nitrificante se llevó a cabo satisfactoriamente bajo las condiciones experimentales utilizadas, obteniendo que después de 24h, la  $E\text{-NH}_4^+$  fue del  $100\% \pm 2.3$  y el  $Y_{\text{NO}_3}$  de  $0.88 \pm 0.04$ . Las velocidades

específicas de consumo de  $\text{N-NH}_4^+$  y producción de  $\text{N-NO}_3^-$  fueron  $0.095 \pm 0.01$  y  $0.088 \pm 0.009$  mg N/mg proteína h, respectivamente. Al añadir sulfuro a los cultivos nitrificantes a una concentración inicial de  $112 \pm 2.5$ ,  $58 \pm 2.5$  y  $13 \pm 0.7$  mg S- $\text{HS}^-/\text{L}$  disminuyeron las velocidades específicas en un 92%, 92% y 73.7%, respectivamente, para el consumo de amonio, y 96.5%, 95% y 88.6%, respectivamente, para la producción de nitrato. Los resultados ponen en evidencia el efecto inhibitorio del sulfuro sobre la nitrificación e indican que el sulfuro inhibió todo el proceso respiratorio nitrificante. Después de 60h, la E- $\text{NH}_4^+$  fue de 11.1%, 29.7% y 100% respectivamente, mientras que el  $Y_{\text{NO}_3^-}$  fue de 0.3, 0.65 y 0.47, determinándose así que el sulfuro afectó mayoritariamente el proceso nitrato oxidante. Por otra parte, se pudo determinar que la eliminación del sulfuro durante los ensayos se dio por oxidación química y no por oxidación bioquímica, ya que en todos los casos la velocidad de eliminación de sulfuro fue cercana a la velocidad obtenida en la cinética abiótica ( $38.0 \pm 2.1$  mg S- $\text{HS}^-/\text{L.h}$ ), teniendo como producto principal sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) y una formación transitoria de tiosulfato ( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ).

También se realizó un ensayo bajo las mismas condiciones experimentales, pero ahora con una concentración inicial de sulfato de  $83.2 \pm 2.6$  mg S- $\text{SO}_4^{2-}/\text{L}$ , observándose que el sulfato no tuvo un efecto significativo sobre la nitrificación, indicando que el sulfuro fue el responsable de la inhibición y no el producto de su oxidación. Durante todos los ensayos realizados se dio seguimiento al pH, obteniendo un valor promedio de  $8.6 \pm 0.3$ , lo cual se ha reportado que a valores como éste la nitrificación se lleva a cabo favorablemente. Otro de los puntos que se analizaron fue la disponibilidad de oxígeno ya que previamente a la realización de las cinéticas se aseguró que la cantidad de oxígeno presente en las botellas serológicas fuera suficiente, haciendo los cálculos con las concentraciones de amonio y sulfuro más altas utilizadas. Por lo cual, ni el sulfato presente durante las cinéticas a diferentes concentraciones de sulfuro (a causa de la oxidación del sulfuro), ni el aumento en el valor de pH, así como tampoco la falta de disponibilidad de oxígeno, fueron las causas del efecto negativo sobre el proceso respiratorio nitrificante.

**ABSTRACT**

Water pollution is a serious problem affecting Mexico and the world. This contamination is given by high concentrations of carbon, nitrogen and sulfur compounds, among others. Sewage can come from industries or households. This water is dropped in receiving aquifers without being treated, causing eutrophication pollution phenomena as well as serious damage to human health and the environment. The main nitrogen pollutant is ammonia and sulfide in the case of sulfur compounds, as this compound is highly toxic and corrosive. Ammonia and sulfide can be found in a large amount of industrial effluents such as petrochemical, food processing, paper, just to name a few, observing high concentrations of these two pollutants. One possible way of treating water contaminated by ammonium is nitrification-denitrification. Nitrification is a chemolithoautotrophic respiratory process where ammonium is oxidized to nitrite and subsequently to nitrate. Nitrate is then reduced to nitrogen gas by denitrification. Little is known about the effect of sulfide on the nitrifying respiratory process. Some authors mention that sulfide causes inhibitory effects on nitrification, but these studies do not show kinetic data or response variables as evidences to these assumptions, so it is not known whether sulfide causes inhibition or its toxicity affects the respiratory nitrifying process.

For these reasons the aim of this study was to extend the information on the effect of sulfide on nitrification by using response variables such as efficiency of ammonium consumption and yields of nitrite and nitrate formation, and kinetic variables such as specific rates for ammonium consumption and nitrate formation, which determine the effect of sulfide on nitrification.

This study was conducted in batch cultures inoculated with the nitrifying sludge from a continuous stirred tank reactor at steady state. In this reactor the efficiency of ammonium consumption ( $E\text{-NH}_4^+$ ) was of  $100\% \pm 3.4$  and the yield of nitrate production ( $Y_{\text{NO}_3^-}$ ) of  $0.96 \pm 0.09$ . In batch cultures without sulfide, the nitrifying process was carried out successfully under the experimental conditions used, obtaining that after 24h, the  $E\text{-NH}_4^+$  was  $100\% \pm 2.3$  and  $Y_{\text{NO}_3^-}$  of  $0.88 \pm 0.04$ . The specific rates of  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  consumption and  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  production were  $0.095 \pm 0.01$  and  $0.088 \pm 0.009$  mg N/mg protein h, respectively. By adding sulfide to nitrifying cultures at initial concentrations of  $112 \pm 2.5$ ,  $58 \pm 2.5$  and  $13 \pm 0.7$  mg  $\text{HS}^-\text{-S/L}$  the

specific speeds decreased by 92%, 92% and 73.7% respectively for the consumption of ammonium and 96.5 %, 95% and 88.6% respectively for the production of nitrate. The results evidence the inhibitory effect of sulfide on nitrification and that sulfide inhibited the whole breathing nitrifying process. After 60h, the E-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> was 11.1%, 29.7% and 100% respectively, while the Y<sub>NO<sub>3</sub>-</sub> was 0.3, 0.65 and 0.47, showing that sulfide affected mainly the nitrite oxidizing process. Moreover, it was found that the removal of sulfide during the tests was due to chemical oxidation and not biochemical oxidation, since in all cases the rate of sulfide removal was close to the velocity obtained in the abiotic control (38.0 ± 2.1 mg HS<sup>-</sup>-S/Lh), with sulfate (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) as the main product and a transient formation of thiosulfate (S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>).

Test was also performed under the same experimental conditions, but now with an initial sulfate concentration of 83.2 ± 2.6 mg SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-S/L, observing that sulfate had no significant effect on nitrification, showing that sulfide was the responsible for the nitrification inhibition and not the product of its oxidation. During all tests the pH was monitored, obtaining an average value of 8.6 ± 0.3. It has been previously reported that at such pH value nitrification is performed favorably. Another point discussed was the oxygen availability during the tests. Prior to carrying out the kinetics, it was verified that the amount of oxygen present in the serological bottles was sufficient, calculating with the highest concentrations of ammonium and sulfide used in this study. Therefore, neither the sulfate present during the kinetics at different concentrations of sulfide (from the oxidation of sulfide) or the increase in the pH value, nor the lack of oxygen availability, were the causes of the negative effect observed on the nitrifying respiratory process.

## I.- INTRODUCCIÓN

### I.1 Problemática

En sociedades en desarrollo como la nuestra, el 90% del agua disponible se emplea con propósitos industriales, agrícolas y domésticos, por lo que es necesaria su recuperación mediante procesos de tratamiento de aguas residuales. Entre los contaminantes del agua más importantes, en magnitud y frecuencia, están los compuestos carbonados y nitrogenados en sus diversas formas, siguiéndoles de cerca los compuestos de azufre.

Las formas iónicas de nitrógeno inorgánico más comunes en los ecosistemas acuáticos son el amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), el nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) y el nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ). Estos iones pueden estar presentes de manera natural en el medio acuático como consecuencia de la deposición atmosférica, la escorrentía superficial y subterránea, la disolución de depósitos geológicos ricos en nitrógeno, la descomposición biológica de la materia orgánica, y la fijación de nitrógeno por ciertos procariontes. Sin embargo, las actividades humanas han alterado de manera significativa el ciclo global del nitrógeno, aumentando su disponibilidad en muchas regiones del planeta como consecuencia de fuentes puntuales y difusas de contaminación. Asociados a esta contaminación generalizada aparecen los siguientes problemas medioambientales en los ecosistemas acuáticos: (1) acidificación de ríos y lagos con baja o reducida alcalinidad; (2) eutroficación de las aguas y proliferación de algas tóxicas; (3) toxicidad directa de los compuestos nitrogenados para los animales acuáticos. Además, la contaminación por nitrógeno inorgánico podría inducir efectos perjudiciales sobre la salud humana (Camargo y Alonso, 2007).

Los óxidos de nitrógeno ( $\text{NO}$ ,  $\text{N}_2\text{O}$ ) han sido reconocidos tradicionalmente como los contaminantes principales en el proceso de acidificación de lagos y ríos con baja o reducida alcalinidad. Estos gases, una vez emitidos a la atmósfera, pueden reaccionar con otras moléculas ( $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{OH}$ ,  $\text{O}_3$ ), llegando a formar ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ). La deposición atmosférica de este ácido sobre las aguas superficiales puede incrementar no sólo la concentración de  $\text{NO}_3^-$  sino también la concentración de  $\text{H}^+$  y, en consecuencia, reducir el valor del pH del agua (Baker y col., 1991).

Las aguas residuales industriales sin tratamiento, ocasionan descargas masivas de nitrógeno en las aguas receptoras provocando su contaminación y eutroficación. El nitrógeno es un nutriente limitante para los ecosistemas acuáticos, por lo tanto su presencia estimula el

crecimiento de fitoplancton en lagos. Las características más frecuentemente observadas cuando se alcanza un estado eutrófico son las siguientes (Harper, 1992):

- biomasa abundante,
- cambio de coloración en las aguas,
- transparencia reducida,
- disminución de oxígeno en las capas profundas,
- olores desagradables producidos por descomposición,
- aparición de especies indicadoras del estado eutrófico (principalmente cianobacterias).

Concentraciones elevadas de  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$  pueden, por tanto, promover el desarrollo, mantenimiento y proliferación de los productores primarios (fitoplancton, algas bentónicas, macrófitos), contribuyendo al muy extendido fenómeno de la eutroficación de los ecosistemas acuáticos (Wetzel, 2001; Anderson y col., 2002).

La ingesta de nitrito y nitrato a través del agua puede inducir efectos adversos sobre la salud humana. Los niños pequeños, sobre todo los menores de cuatro meses, son más susceptibles de sufrir metahemoglobinemia, manifestando los síntomas típicos de cianosis, taquicardia, convulsiones, asfixia, y en último término la muerte (Fewtrell, 2004). En el caso de las nitrosaminas, su formación se ve favorecida por el ambiente ácido del estómago y la interacción de aminas secundarias con los iones nitrito (Manahan, 1992). Algunas evidencias científicas sugieren además que la ingesta prolongada de nitrato y nitrito podría contribuir al desarrollo de linfomas y cáncer, enfermedades coronarias, infecciones del tracto respiratorio, y malformaciones en los recién nacidos (Camargo y Alonso, 2007).

El ácido sulfhídrico ( $\text{H}_2\text{S}$ ) es emitido al ambiente por un gran número de industrias como la petrolera, tenerías, producción de viscosa y celofán. Además, este compuesto es el resultado del tratamiento anaerobio de aguas residuales que contienen sulfato, se encuentra presente en la extracción de gas natural y es un intermediario de la oxidación biológica de  $\text{CS}_2$  (Revah y col., 1995). Sus propiedades corrosivas están relacionadas con el daño a paredes de concreto de los reactores, sistemas de drenaje y tuberías de acero. Su emisión al ambiente genera olores desagradables y lluvia ácida (Alcántara, 2000). Además, es un compuesto altamente tóxico (Sublette y col., 1998). En la Tabla 1 se muestran los niveles de toxicidad del ácido sulfhídrico y sus efectos a la salud.

**Tabla 1.** Niveles de toxicidad del H<sub>2</sub>S y su efecto a la salud (Janssen, 1996).

Concentración de H <sub>2</sub> S (ppm)	Efecto a la salud
1.00	Mal olor (a huevo en descomposición)
10.0	Nivel máximo permisible durante una jornada laboral de 8 horas
20.0	Se requiere de equipo de seguridad
100	Puede causar dolor de cabeza y náusea, pérdida del sentido del olfato de 2-15 min
200	Rápida pérdida del sentido del olfato, ardor de ojos y tráquea
500	Pérdida de equilibrio y de razonamiento, insuficiencia respiratoria en 20 min
700	Inconsciencia inmediata, sin un tratamiento adecuado paro respiratorio y muerte

Es común que se establezca como límite para descargas valores menores que 1 mg HS/L. Por diferentes razones: de salud pública (toxicidad), ambientales (control de olor), ecológicas (deficiencia de oxígeno en cuerpos receptores de agua) y económicas (corrosión de equipo), las corrientes de agua residual contaminadas con sulfuro deben ser tratadas antes de ser descargadas a los cuerpos receptores.

## 1.2 Fuentes industriales de contaminación por compuestos nitrogenados y azufrados.

Muchas industrias descargan aguas residuales ricas en nitrógeno y azufre. Aguas residuales de industrias como la textil, tenerías, procesadoras de alimento y papel, producción de látex, manufactureras de explosivos, plaguicidas, entre otras, contienen altas concentraciones de compuestos azufrados y nitrogenados (Lens y col., 1998; Altas y Buyukgungor, 2008; Tait y col., 2009).

Las aguas residuales que se producen en algunos procesos de la refinación del petróleo tales como las aguas amargas, contienen elevadas concentraciones de sulfuro, nitrógeno y derivados fenólicos, entre otros contaminantes, lo que constituye un serio problema de contaminación (Olmos y col., 2004).

El nitrógeno en aguas residuales puede existir en varias formas, tales como nitrógeno orgánico, amonio, nitrito o nitrato. Por ejemplo un gran número de industrias de fertilizantes

producen principalmente amonio y urea. El nitrógeno oxidado en las aguas residuales puede ser una consecuencia directa de varios procesos industriales o del tratamiento aerobio de las aguas residuales (Gupta y Sharma, 1996; Ahn y Kim, 2004). La composición de aguas residuales ricas en nitrógeno se muestra en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Aguas residuales industriales que contienen altas concentraciones de nitrógeno (Tandukar y col., 2009).

Aguas residuales	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg/L)	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	pH	DQO (mg/L)	Referencia
Fertilizantes	38,000– 45,000	-	-	-	3,520– 4,850	Gupta and Sharma (1996)
Condensado						
Desechos (mezclados)	1850–1960	<1	<1	5.8–6.1	13,800– 14,650	Joo y col. (2006)
Desechos (sólidos)	830–1250	<1	<1	8.3–8.5	4,150– 5,300	Joo y col. (2006)
Desechos (purines)	2,150	1,800– 2,500	-	-	25,700	Ahn y Kim (2004)
Farmacéutica	30–50	-	-	-	1,100– 5,500	Ghafari y col. (2008)
Planta de armas nucleares	-	-	~50,000	-	-	Ghafari y col. (2008)
Producción TNT	-	-	30,000- 50,000	-	-	Glass y Silverstein (1999)
Procesamiento de camarón	84	250	31	-	1,593	Lyles y col. (2008)
Fertilizante	183	1.3	100	8.7	-	Mijatovic y col. (2000)
Estiércol de aves de corral	990 (1,830 NKT)	-	-	7.3	12,100	Yetilmezsoy y Sakar (2008)
Procesamiento de alimentos	300–450	-	-	7–8.1	500–2,000	Wang y col. (2005a)
Lixiviados de vertedero	1,100–2,20	-	-	3.8–5.5	~20,000 (COT)	Tait y col. (2009)
Procesamiento de aves de corral	186 (NT)	-	-	6.5–7.0	3,102	Nery y col. (2007)

**DQO, Demanda Química de Oxígeno; NT, Nitrógeno total; NKT, Nitrógeno Kjeldahl Total; COT, Carbono Orgánico Total; TNT, trinitrotolueno.**

Por otro lado, los compuestos de azufre en aguas residuales pueden estar en forma reducida u oxidada. Muchas industrias como fábricas de papel, fábricas de fécula de patata, etc., usan una significativa cantidad de ácido sulfúrico o sulfito como un blanqueador porque es barato y efectivo. Estas industrias producen aguas residuales conteniendo una gran cantidad de sulfato (Silva y col., 2002). Del mismo modo, en refinerías petroquímicas, la presencia de azufre en el producto es muy importante. Actualmente, el petróleo crudo es clasificado basado en el contenido de sulfuro. El petróleo crudo dulce es el que tiene bajo contenido en azufre y el petróleo crudo agrio es el de mayor contenido de azufre. Aguas residuales de refinerías petroquímicas, industrias de acero galvanizado, industrias mineras,

lavado de gases en las plantas de energía, etc., contienen altas concentraciones de compuestos azufrados reducidos. Del mismo modo, aguas residuales de industrias, tales como fábricas de textiles, de plaguicidas, manufactureras de fertilizantes, fabricación de caucho, entre otras, contienen altas concentraciones de compuestos azufrados reducidos, como sulfuro o azufre elemental por la reducción bacteriana de sulfato como se muestra a continuación (Silva y col., 2002; Kanyarat y Chaiprapat, 2008).



En la tabla 3 se presenta una lista de aguas residuales industriales que contienen azufre en varias formas.

**Tabla 3.** Aguas residuales de industrias que contienen altas concentraciones de sulfuro y sulfato (Tandukar y col., 2009).

Agua Residual	Azufre (mg-S/L)	pH	DQO (mg/L)	Referencias
Látex	100–4000 (H <sub>2</sub> S)	8.52	-	Rattanapan y col. (2009)
Procesadoras de petróleo crudo	150 (S <sup>2-</sup> )		1,500	Sekoulov y Brinke-Seiferth (1999)
Refinerías de petróleo	150 (S <sup>2-</sup> )	8–9	216	Altas y Buyukgungor (2008)
Látex de caucho	1819 (SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> )	4.7	5430	Kanyarat y Chaiprapat (2008)
Lixiviados de vertedero	1,100–3,800 (SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> )	3.8–5.5	15,000–20,000 (COT)	Tait y col. (2009)
Industria química	12,000–35,000 (SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> )	2.0–12.0	15,000–40,000	Silva y col. (2002)
Melazas	2,800 (SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> )	7.8	20,000	Percheron y col. (1997)
Tenerías	750–1250 (SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ); 140–280 (S <sup>2-</sup> ); 50–200 (S <sup>2-</sup> );	-	2,990–8,200	Genschow y col. (1996)
Pulpa y papel	1,200–1,500 (SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> )	7–9.7	500–10,400	Lens y col. (1998)
Ribera	500–1,500 (S <sup>2-</sup> )	11.2	2,800–4,500 (DBO)	Lens y col. (1998)
Fotográfica	45,500 (S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> ); 8,000 (SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ); 3,500 (SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> )	-	67,800	Lens y col. (1998)
Producción de TNT	51,400 (SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ); 5,500 (SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> )	7.6	68,500	Lens y col. (1998)

**DQO, Demanda Química de Oxígeno; DBO, Demanda Biológica de Oxígeno; COT, Carbono Orgánico Total; TNT, trinitrotolueno.**

### I.3 Tratamiento de aguas residuales

Conforme se agudiza el problema de la contaminación del agua, se incrementan las investigaciones para desarrollar procesos eficientes y de bajo costo que permitan eliminar los contaminantes de las aguas residuales y cumplir con los requerimientos de descarga permitidos. Para diseñar y operar de manera eficiente una planta de tratamiento de aguas residuales, es necesario entre otros aspectos entender la fisiología de los microorganismos involucrados. En relación con esto las investigaciones a nivel básico son fundamentales para entender y optimizar procesos ya establecidos o desarrollar nuevos sistemas.

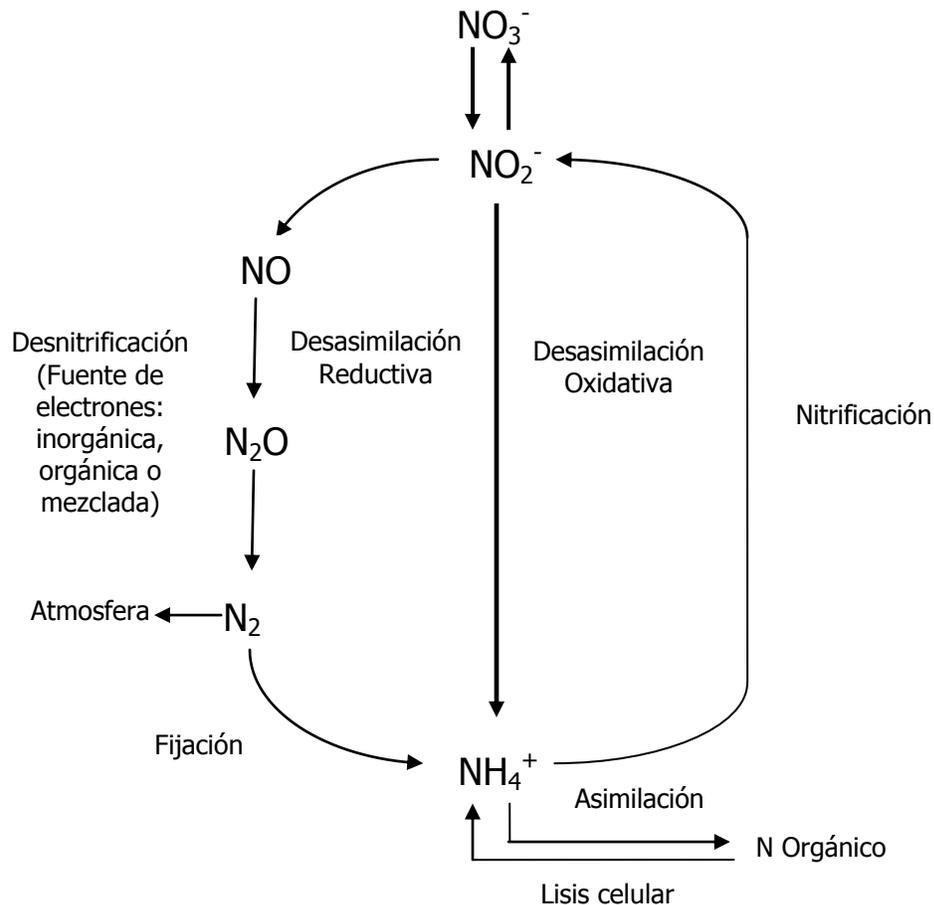
Para la eliminación de los diferentes contaminantes del agua, se ha desarrollado una amplia gama de alternativas, tanto físico-químicas, como biológicas. La eliminación físico-química de nitrógeno amoniacal en el agua puede hacerse por medio de arrastre del gas amoniaco ( $\text{NH}_3$ ). Aunque el procedimiento de arrastre es eficiente, la cantidad de aire requerida es alta, el precio del proceso resulta oneroso por el elevado consumo de energía (Gómez y col., 1995). Para el caso del sulfuro así como para el amonio en aguas, los métodos más utilizados son el uso de resinas iónicas y procesos físicos como precipitación y filtración (Jeworski y Heinzle, 2000). El tratamiento biológico de aguas residuales se lleva a cabo mediante el empleo de consorcios microbianos; con lo cual es posible la depuración eficaz del agua bajo condiciones controladas, sin que se generen nuevos efectos contaminantes, como lo que sucede con los procesos físico-químicos.

La eliminación de nitrógeno por vía biológica puede realizarse por dos procesos, uno anaerobio y otro aerobio, conocidos respectivamente como desnitrificación y nitrificación. Dado que el tratamiento biológico de aguas por nitrificación es ampliamente utilizado y que muchas aguas residuales presentan contaminantes nitrogenados y azufrados, es necesario estudiar más el efecto inhibitorio o tóxico del sulfuro sobre la nitrificación para conocer o determinar los parámetros de operación o control de los procesos nitrificantes en reactores biológicos que tratan este tipo de efluentes.

### I.4 Nitrificación

El ciclo del nitrógeno mantiene una eficiente recirculación del nitrógeno en la naturaleza (Figura 1). Si el amonio no es rápidamente transformado puede alcanzar concentraciones muy altas, teniendo como consecuencia la erosión de los suelos y la muerte de flora y fauna

en ecosistemas acuosos. Por lo tanto, a fin de disminuir el impacto ambiental del amonio en los ecosistemas, es importante identificar algunas de las etapas limitantes del ciclo del nitrógeno, en particular la nitrificación y desnitrificación (Lenntech, 2000).



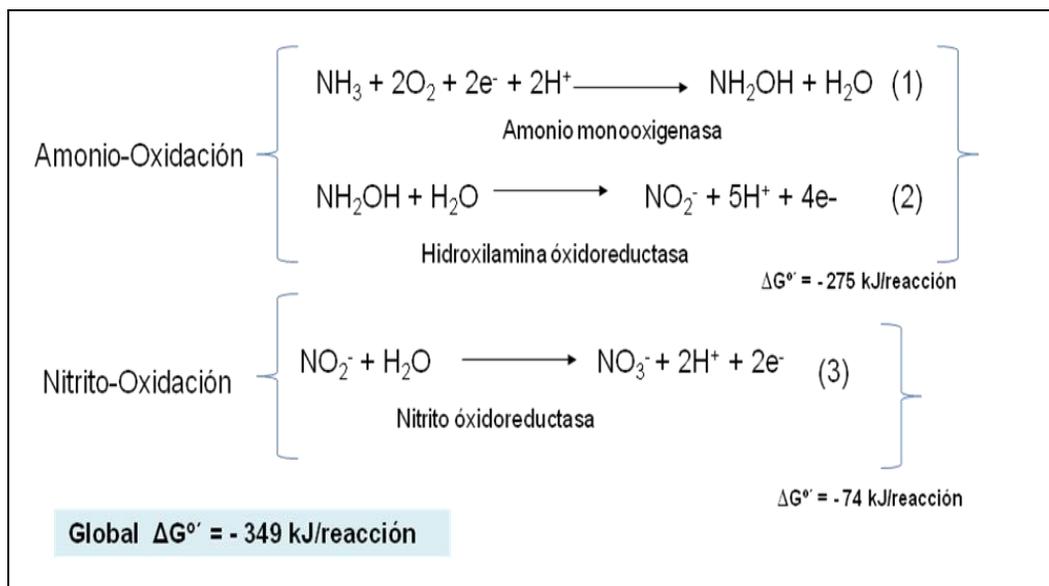
**Figura 1.** Ciclo global del nitrógeno (Cuervo-López y col., 2009).

La principal forma de nitrógeno en la tierra es el  $\text{N}_2$  y las bacterias fijadoras de éste pueden utilizarlo como fuente de nitrógeno. El amonio que se produce por la fijación de nitrógeno o de los compuestos orgánicos nitrogenados, es asimilado en forma de materia orgánica (aminoácidos y proteínas) o bien oxidado a nitrato por las bacterias nitrificantes. En su ambiente natural, las bacterias nitrificantes son el único grupo microbiano que produce cantidades altas de nitrito y nitrato a partir del amoniaco. Las pérdidas de nitrógeno en la biósfera son el resultado de la desnitrificación, en la que el nitrato se reduce nuevamente a  $\text{N}_2$  (Madigan y col., 2003).

El sistema nitrificante-desnitrificante constituye una forma efectiva, sustentable y económicamente factible de eliminar biológicamente el nitrógeno de aguas residuales (Cervantes y col., 2000). Aunque se han logrado avances en la comprensión del proceso nitrificante, faltan estudios fisiológicos que ayuden a caracterizar los lodos activados que se utilizan en las plantas de tratamiento.

### I.4.1 Bioquímica de la nitrificación

Se define la nitrificación como un proceso respiratorio aerobio donde se lleva a cabo la oxidación del amonio hasta nitrato vía nitrito mediante dos grupos de bacterias quimiolitotrofas filogenéticamente no relacionadas, las amonio-oxidantes y nitrito-oxidantes que pertenecen a la familia *Nitrobacteraceae* (Prosser, 1989). Las bacterias nitrificantes utilizan como donador de electrones al amoníaco o nitrito y pueden fijar el  $\text{CO}_2$  vía el ciclo de Calvin para utilizarlo como fuente de carbono para biosíntesis celular. La nitrificación se realiza en dos etapas sucesivas (Figura 2). En una primera etapa de la ruta metabólica nitrificante (amonio-oxidación), el amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) se oxida a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), aeróticamente por acción de las bacterias amonio-oxidantes. En la segunda etapa (nitrito-oxidación), las bacterias nitrito-oxidantes, oxidan el nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) a nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ).



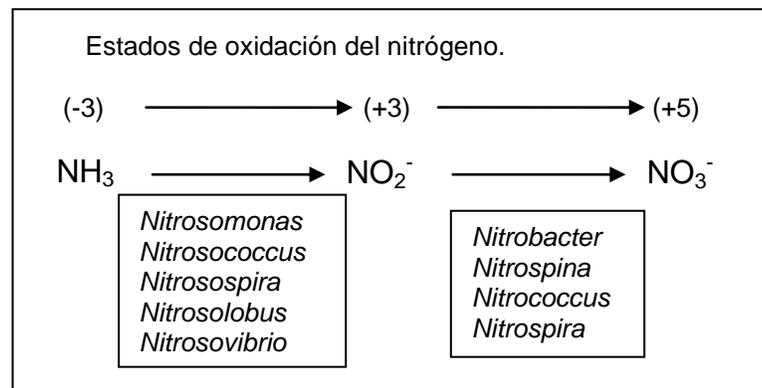
**Figura 2.** Reacciones del proceso respiratorio nitrificante.

La primera reacción (ecuación 1) es catalizada por la enzima amonio monooxigenasa (AMO) y la segunda (ecuación 2) por la enzima hidroxilamina oxidoreductasa (HAO). El amoniaco es utilizado como un donante de electrones por las bacterias amonio-oxidantes y el aceptor final de electrones es el oxígeno. 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, lo que genera una fuerza motriz de protones (Kowalchuk y Stephen, 2001). Esta fuerza motriz se utiliza como fuente de energía para la producción de ATP. El rendimiento de energía libre estándar ( $\Delta G^{\circ}$ ) de la oxidación del amoniaco es  $-275$  kJ/mol. 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 amoniaco, lo que es 3.43 g de oxígeno por g de nitrógeno amoniacal (Bernet y Spérandio, 2006).

El nitrito es oxidado a nitrato por las bacterias nitrito-oxidantes en un solo paso. Esta reacción (ecuación 3) es catalizada por una nitrito oxidoreductasa (NOR). El nitrito es el donante de electrones, mientras que el oxígeno es el aceptor final de electrones. La producción de energía libre de la oxidación de nitrito sólo es de  $-74$  kJ/mol. La consecuencia es un rendimiento bajo de crecimiento (Bernet y Spérandio, 2006).

#### I.4.2 Microbiología de la nitrificación

Las bacterias nitrificantes se dividen en dos grupos (Figura 3).



**Figura 3.** Listado de bacterias que llevan a cabo la amonio-oxidación y nitrito-oxidación, con el respectivo estado de oxidación del nitrógeno durante el proceso (Camilla, 1998).

En el primer grupo se encuentran las bacterias amonio-oxidantes que cuentan con los siguientes géneros: *Nitrosomonas*, *Nitrospira*, *Nitrosolobus*, *Nitrosococcus* y *Nitrosovibrio*. Las bacterias amonio-oxidantes están ampliamente distribuidas en varios ecosistemas. Especies de diferentes géneros se han aislado en suelos, ríos, lagos y océanos. El género más estudiado es *Nitrosomonas*. La pared celular de estos microorganismos es típicamente gram negativa, y presentan diversas morfologías tales como: cocos, bacilos y espirales. Presentan un mayor crecimiento en intervalos de temperatura de 25 a 30°C, y a valores de pH entre 7.5 y 8.0 (Bock y col., 1991).

En el caso de las bacterias nitrito-oxidantes, se han encontrado los siguientes géneros gram negativos: *Nitrobacter*, *Nitrospina*, *Nitrococcus* y *Nitrospira*, que presentan diversas morfologías tales como: cocos y bacilos. Algunos géneros nitrito-oxidantes están restringidos a ambientes marinos, mientras que *Nitrobacter* ha sido aislado de suelos, rocas y ríos (Bock y col., 1991). El género *Nitrobacter* es el más estudiado. Las bacterias nitrito-oxidantes tienen su mejor actividad en la zona de temperatura mesófila y a valores de pH de neutro a alcalino y no presentan actividad ni crecimiento a pH ácido (Prosser, 1989).

No sólo la familia *Nitrobacteraceae* se le reconoce como nitrificante, existen organismos heterótrofos que pueden oxidar el amonio a nitrito y/o nitrato (Papen y col., 1989; Mevel y Prieur, 2000). La nitrificación heterotrófica puede ocurrir también con compuestos orgánicos que contengan nitrógeno como sustrato y por reacciones que no necesariamente son de oxidación, las cuales no son la única fuente de energía de estos organismos (Painter, 1970). Es generalmente aceptado que los microorganismos nitrificantes heterótrofos son menos activos y eficientes en su capacidad nitrificante que los autótrofos. Algunos autores proponen la hipótesis que la baja actividad nitrificante en heterótrofos se ha atribuido en algunas cepas a una capacidad simultánea de formación de nitrito y desnitrificación aerobia (Robertson y col., 1988).

En estudios recientes, Könneke y col. (2005) aislaron una nueva especie marítima del dominio archaea que oxida el amoniaco (Archaea Amonio-Oxidante) *Candidatus "Nitrosopumilus maritimus"*. Esta especie contiene genes que codifican para las tres subunidades (amoA, amoB, y amoC) de la amonio monooxigenasa. *Candidatus "Cenarchaeum symbiosum"* también muestra tener los genes codificantes de la AMO para la oxidación de amoniaco (Hallam y col., 2006a, b). Esta especie de archaea puede contribuir considerablemente a la oxidación de amoniaco en ambientes marítimos y terrestres (Horner-Devine y Martiny, 2008).

### I.4.3 Factores ambientales que afectan la nitrificación

Como todos los procesos microbianos, la nitrificación se ve afectada por factores ambientales tales como: temperatura, pH, concentraciones de sustratos, y compuestos inhibidores. Estos factores pueden afectar la velocidad del proceso respiratorio nitrificante. Se considera que las bacterias nitrito-oxidantes son más sensibles a las variaciones en las condiciones ambientales y la consecuencia de una perturbación del medio ambiente a menudo será la acumulación de nitrito (Bernet y Spérandio, 2006).

#### I.4.3.a Efecto de la temperatura

Al igual que todos los procesos biológicos, la nitrificación se ve influida por la temperatura. La mayoría de las bacterias nitrificantes son: mesófilas y su temperatura óptima de crecimiento está entre 28 y 36°C (Bernet y Spérandio, 2006). Por lo tanto, las velocidades de crecimiento de las bacterias nitrificantes se reducirán con la disminución de las temperaturas. Sin embargo, la nitrificación es posible a temperaturas tan bajas como 5°C. La temperatura también tiene un efecto sobre la velocidad de las reacciones enzimáticas involucradas en el proceso respiratorio. El efecto de la temperatura sobre el crecimiento y la respiración puede ser expresado por la siguiente ecuación de van't Hoff-Arrhenius:

$$\mu = \mu_{20} \cdot \theta^{T-20} \quad (5)$$

$$q_{s,p} = A \cdot e^{(-E/RT)} \quad (6)$$

Donde:  $\mu$  = coeficiente de velocidad ( $d^{-1}$ ),  $\mu_{20}$  = el valor de  $\mu$  a 20°C ( $d^{-1}$ ),  $\theta$  = coeficiente de temperatura (adimensional),  $T$  = temperatura (°C),  $q_s$  = velocidad específica de consumo de sustrato ( $h^{-1}$ ) y  $q_p$  = velocidad específica de formación de producto ( $h^{-1}$ ),  $E$  = Energía de activación,  $R$  = constante de los gases y  $A$  = Constante de Arrhenius.

La relación entre la temperatura y la velocidad máxima de crecimiento es diferente entre bacterias amonio-oxidantes y nitrito-oxidantes. A temperaturas superiores a 15°C, las bacterias amonio-oxidantes tienen una mayor velocidad de crecimiento que las bacterias nitrito-oxidantes.

#### **I.4.3.b Efecto del pH**

La eliminación óptima de amonio en la nitrificación ocurre bajo condiciones neutrales a moderadamente alcalinas (pH 7.5 a 8.0) (Gieseke y col., 2006). Sin embargo, se ha reportado que la nitrificación puede ocurrir en condiciones ácidas (valores de pH entre 5 y 6) así como en suelos ácidos (De Boer and Kowalchuk, 2001) o, más recientemente, en biopelículas y reactores con biomasa suspendida a valores de pH entre 4 y 5 (Tarre y Green, 2004).

El pH tiene también un efecto indirecto sobre la nitrificación influyendo directamente sobre el equilibrio químico entre amonio y amoniaco ( $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ ) y nitrito y ácido nítrico ( $\text{NO}_2^-/\text{HNO}_2$ ).

Anthonisen y col. (1976) fueron los primeros en estudiar el efecto de las concentraciones de amonio libre, es decir, en forma de amoniaco sobre la velocidad de eliminación de amonio de las bacterias amonio-oxidantes y nitrito-oxidantes. Ellos establecieron condiciones límite para la inhibición de amonio libre de ambas bacterias.

#### **I.4.3.c Efecto de la concentración de oxígeno**

La nitrificación es muy sensible a bajas concentraciones de oxígeno. Las bacterias nitrificantes tienen una alta afinidad por el oxígeno (bajos valores de  $K_s$  entre 0.4 y 0.6 mg/L) (Robinson y col., 2004).

Estudios con cultivos puros de bacterias nitrificantes mostraron una diferencia en afinidad por el oxígeno. Por ejemplo entre *Nitrosomonas europaea* y *Nitrobacter winogradskyi*, se determinó un mayor valor en la constante de afinidad ( $K_{O_2}$ ) para *N. winogradskyi* (Laanbroek y Gerards, 1993). Esto se ha podido observar también en cultivos mixtos (Jayamohan y col., 1988). A bajas concentraciones de oxígeno disuelto, alrededor de 0.2 a 0.5 mg/L, es posible limitar el crecimiento de bacterias nitrito-oxidantes (Robinson y

col., 2004). La limitación de oxígeno ha mostrado ser eficiente en sistemas de biopelículas favoreciendo el aumento de nitrito (Bernet y col., 2000).

#### **I.4.3.d Efecto de compuestos inhibidores**

Debido a sus bajas velocidades de crecimiento, la inhibición de las bacterias nitrificantes, incluso parcial, puede causar un paro completo del proceso de nitrificación en sistemas de lodos activados. La nitrificación puede ser inhibida por compuestos orgánicos (especialmente compuestos azufrados, anilina, compuestos fenólicos y cianidas) y metales (Cu, Ni, Cr, Zn, Co) (Henze, 2002).

Los modos de acción para la inhibición específica de la nitrificación han sido reportados por McCarty (1999), quien se enfocó en inhibidores que pueden estar presentes en suelos. Se ha reportado que la AMO puede oxidar una amplia gama de sustratos y se supone que los efectos inhibitorios de muchos compuestos son por competición por el sitio activo de esta enzima. Otros compuestos, tales como: acetilenos, son oxidados por la AMO a productos muy reactivos, los cuales se unen covalentemente a la enzima causando inhibición irreversible. El cobre ha mostrado tener una función importante en la actividad de la AMO. Un gran número de diferentes clases de compuestos que contienen azufre también inhiben la actividad de la AMO, probablemente por la unión con el Cu dentro del sitio activo. Compuestos heterocíclicos de nitrógeno son otra clase importante de inhibidores de la nitrificación poco conocidos (McCarty, 1999).

### **I.5 El sulfuro y su oxidación**

#### **I.5.1 Química del azufre**

La química del azufre es sumamente compleja debido a los diferentes estados de oxidación que presentan los compuestos inorgánicos del azufre en la naturaleza: sulfuro de hidrógeno, azufre elemental, tiosulfato, tetratiónato, sulfito y sulfato (Tabla 4). Algunas de sus transformaciones ocurren químicamente o por procesos biológicos. El sulfuro de hidrógeno es el compuesto más reducido y el sulfato el más oxidado.

**Tabla 4.** Estados de oxidación de compuestos azufrados, modificado de Brüser y col. (2000).

Compuesto		Estado de oxidación del azufre
Grupo sulfhidrilo	R-SH	-2
Sulfuro	H <sub>2</sub> S, HS <sup>-</sup> , S <sup>2-</sup>	-2
Polisulfuros	-S(S <sub>n</sub> )S-	-1 (S terminal) / 0 (S interno)
Tiosulfato	S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	-1 (S sulfano) / +5 (S sulfona)
Politionatos	-O <sub>3</sub> S(S) <sub>n</sub> SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0 (S interno) / +5 (S sulfona)
Azufre elemental	Anillos S <sub>n</sub> (S <sup>0</sup> )	0
Sulfito	SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	+4
Bisulfito	HSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	+4
Sulfato	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	+6

El sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S) es tóxico, inflamable, corrosivo y muy soluble en agua (aproximadamente 0.1 M a 25°C) con un pKa<sub>1</sub> alrededor de 7.2 y un pKa<sub>2</sub> de 11.9 (Suzuki, 1999) (ecuaciones 7 y 8). La forma en que el sulfuro está presente en el ambiente se relaciona con el pH, ya que a pH mayor que 11.9 la forma dominante es el ion sulfuro (S<sup>2-</sup>), a pH neutro existe un equilibrio entre la forma no ionizada de sulfuro (H<sub>2</sub>S) y el ion sulfuro de hidrógeno (HS<sup>-</sup>), y por debajo de un valor de pH de 7 la principal especie es el H<sub>2</sub>S que se volatiliza fácilmente. El HS<sup>-</sup> y el S<sup>2-</sup> son muy hidrosolubles (Madigan y col., 1999). En condiciones óxicas y pH neutro, el HS<sup>-</sup> se oxida de forma espontánea.



El ion sulfato (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) es uno de los oxianiones universales que se encuentra en aguas naturales, se forma bajo condiciones aerobias a partir de los compuestos azufrados que son sensibles al proceso de oxidación y en presencia de microorganismos especializados. El sulfato es químicamente inerte y no volátil. El efecto negativo del sulfato está asociado con la actividad de bacterias que reducen el sulfato en procesos de digestión anaerobia, donde el sulfato es usado como el aceptor de electrones resultando en la producción de sulfuro (Hao y col., 1996).

El azufre elemental ( $S^0$ ) es un sólido amarillo, no tóxico, que forma cristales ortorrómbicos. Contiene más unidades de azufre por masa que cualquier otra forma química. Su molécula más estable es la que presenta un anillo octaédrico ( $S^8$ ). Es poco soluble en agua ( $5 \mu\text{g/L}$  de  $S^8$  a  $25^\circ\text{C}$ ) pero muy soluble en bisulfuro de carbono, tetracloruro de carbono y disolventes no polares análogos (Suzuki, 1999).

El tiosulfato ( $S_2O_3^{2-}$ ) tiene dos átomos de azufre no equivalentes, es decir, es un ion sulfato ( $SO_4^{2-}$ ) en el que uno de los átomos de oxígeno ha sido desplazado por un átomo de azufre. El átomo de azufre central tiene un número de oxidación de +6 y el átomo de azufre unido, tiene un número de oxidación de -2. Esta propiedad sugiere su posible formación a partir de la combinación del azufre elemental con sulfito, o de sulfuro con el trióxido de azufre con el estado de oxidación de 2 por átomo de azufre (Suzuki, 1999).

El sulfito ( $SO_3^{2-}$ ) es un intermediario en la mayoría de las vías de oxido-reducción de los compuestos azufrados, es inestable, pero se puede encontrar permanentemente en las fuentes hidrotermales submarinas (Brüser y col., 2000).

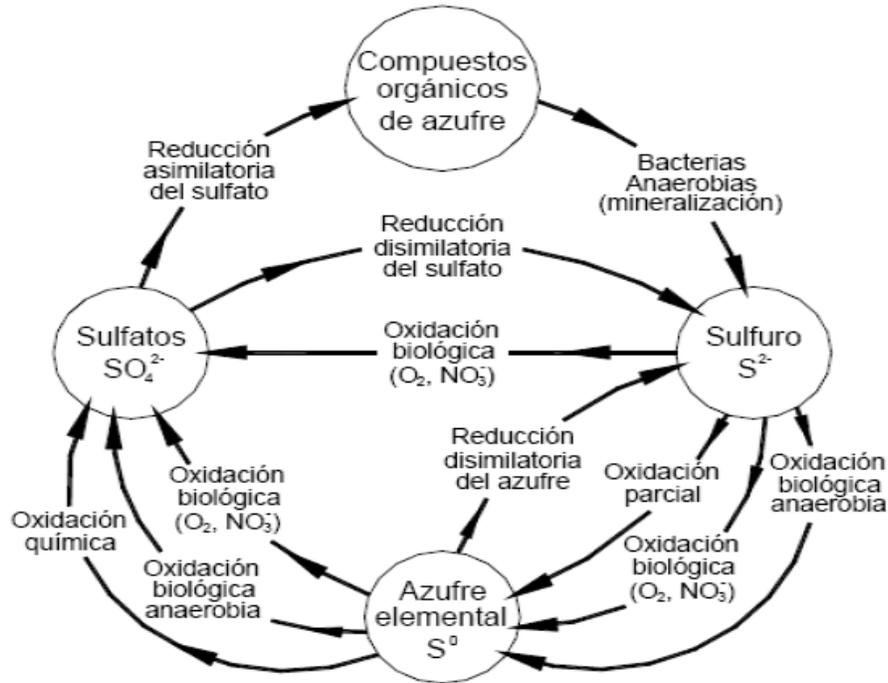
Los polisulfuros son cadenas de aniones de azufre de diferentes longitudes que tienden a oxidarse fácilmente en el ambiente, lo que les confiere su carácter inestable. Pueden ser producidos por la apertura del anillo del azufre elemental con sulfuro o por la oxidación parcial de sulfuro (Steudel, 2000). En el agua se encuentran sólo a pH mayor que 6 y su presencia en una solución acuosa da una coloración de amarillo-verdoso a naranja.

Los politionatos son moléculas que presentan grupos sulfato ( $O_3S-S_n$ ) de cadenas poliméricas de azufre de valencia cero (Steudel, 2000). Se forman cuando el ion tiosulfato se oxida con diferentes compuestos como: el yodo ( $I_2$ ), el bicloruro de azufre ( $SCl_2$ ) y el dióxido de azufre ( $SO_2$ ).

### **1.5.2 Ciclo del azufre**

En la figura 4, se presenta el ciclo global del azufre. La etapa de reducción del sulfato presenta dos vías bioquímicas: la asimilativa y la no asimilativa. La primera es realizada por todos los organismos (eucariotas y procariotas) capaces de reducir el sulfato a sulfuro mediante el catabolismo de compuestos que contienen azufre y que son necesarios para el crecimiento celular. La reducción no asimilativa la realizan principalmente organismos procariotas (eubacterias y archaea) denominados bacterias sulfato reductoras (BSR) que

utilizan sulfato, tiosulfato y azufre elemental como aceptores finales de electrones durante la oxidación de compuestos orgánicos e inorgánicos, en condiciones anaerobias.



**Figura 4.** Ciclo global del azufre (Robertson y Kuenen, 1992).

La segunda etapa del ciclo, la constituyen las reacciones de oxidación de los compuestos reducidos del azufre que pueden ocurrir bajo las siguientes condiciones: (1) anóxicas (ausencia de oxígeno) en presencia de bacterias de los géneros *Thiobacillus*, *Paracoccus* y *Thiosphera* (Barrenstein y col., 1986), (2) facultativas (no necesariamente en ausencia de oxígeno), metabolizadas por bacterias fototróficas de los géneros de la familia *Chlorobioaceae* y *Chromaticeae* (Cork y col., 1986) y (3) aerobias, en presencia de bacterias sulfuro oxidantes de los géneros *Beggiatoa*, *Thiosphera*, *Wollinella*, *Sulfolobus*, entre otras (Holt y col., 1994; Alcántara, 2000). Bajo las tres condiciones el producto principal de la oxidación del sulfuro es el sulfato (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>). Estos procesos biológicos de oxidación compiten exitosamente con las reacciones químicas, ya que pueden llegar a tener velocidades de 100 a 1000 veces mayores (Lens y Kuenen, 2001).

En condiciones aerobias y en función de la estequiometría de la reacción, el oxígeno es el parámetro que determina el producto final de la oxidación (ecuaciones 9 y 10). De acuerdo a la estequiometría se necesita una relación  $O_2/HS^-$  de 0.5 para producir  $S^0$ , por lo que la formación de azufre elemental puede ser regulada dosificando estequiometricamente las cantidades de oxígeno (Janssen y col., 1997, Annachhatre y Suktrakoolvait, 2001). Janssen y col. (1997) encontraron que bajo condiciones limitadas de  $O_2$  (< 0.1 mg/L), el  $S^0$  es el producto final de la oxidación parcial del  $H_2S$ , mientras que la formación de  $SO_4^{2-}$  se ve favorecida por concentraciones limitadas de la especie reducida de azufre.



### I.5.3 Efecto del sulfuro sobre procesos microbianos

Los diferentes compuestos de azufre también pueden inhibir la actividad de una amplia gama de bacterias como las bacterias nitrificantes y sulfato reductoras, con los aumentos de efecto inhibitorio en el siguiente orden: sulfato<tiosulfato<<sulfito<<< $H_2S$  (Neculita y col., 2007).

El mecanismo exacto de la inhibición por sulfuro aún no se entiende por completo, pero existen diferentes opiniones. En general, el efecto inhibitor del sulfuro se ha atribuido a fenómenos de permeación del  $H_2S$  en las células y la destrucción de las proteínas haciendo que la célula se inactive (Postgate, 1984). Se menciona también la alta capacidad de reacción del  $H_2S$  haciéndolo aún más tóxico, por ejemplo puede reaccionar con los metales divalentes esenciales para la activación de las enzimas (Nagpal y col., 2000).

Sin embargo, la reversibilidad de la inhibición por sulfuro se muestra en el estudio de Okabe y col. (1992). También existe incertidumbre sobre si el sulfuro ionizado ( $HS^-$ ) o sólo el  $H_2S$  no ionizado es el causante de la inhibición. Reis y col. (1992) demostraron que la inhibición de las bacterias se correlacionaba mejor con el nivel de  $H_2S$  no disociado. Esto está de acuerdo con la teoría que establece que sólo puede penetrar  $H_2S$  a través de la

membrana celular bacteriana (Speece, 1983) y las observaciones de O'Flaherty y Colleran (1998) que demostraron que el aumento del pH en un intervalo de 6.8-8.5 podría llevar a la tolerancia de niveles más altos de sulfuro. Los niveles inhibitorios en términos de presencia de  $\text{HS}^-$  están en un intervalo de 2 a 64 mg/L (McCartney y Oleszkiewicz, 1991) y en el caso de  $\text{H}_2\text{S}$  varían desde 0.5 hasta 10 mg/L (Visser y col., 1996).

## II.- ANTECEDENTES

Se han realizado extensas investigaciones sobre el impacto inhibitorio del sulfuro sobre procesos microbianos anaerobios (metanogénesis, desnitrificación y sulfatorreducción), sin embargo, los estudios sobre el efecto del sulfuro soluble sobre el proceso respiratorio nitrificante son aún limitados (Tabla 5).

**Tabla 5.** Estudios sobre el efecto del sulfuro sobre la nitrificación.

Referencia	Concentración de sulfuro	Inóculo y concentración de biomasa	Tipo de reactor	Concentración de oxígeno	Variable Calculada	Efecto
Sears y col. (2004)	0 – 3.5 mg S-HS <sup>-</sup> /L en condiciones aireadas	Lodo nitrificante 1000 mg/L de sólidos suspendidos volátiles (SSV)	Matraces de 500 mL	2 – 6 mg O <sub>2</sub> /L	Velocidad volumétrica de eliminación de NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Inhibición reversible del proceso de amonio-oxidación
	0 – 200 mg S-HS <sup>-</sup> /L en condiciones no aireadas					
Joye y Hollibaugh (1995)	60 μM (1.9 mg S-HS <sup>-</sup> /L)	Sedimentos	Cultivos en lote	150 - 200μM (4.8 - 6.4 mg/L)	Velocidad específica de formación de NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> y NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	50% de inhibición de la nitrificación
	100 μM (3.2 mg S-HS <sup>-</sup> /L)					100% de inhibición de la nitrificación
Erguder y col. (2008)	0 – 80 mg S-HS <sup>-</sup> /L	Lodo nitrificante 2.7 ± 0.06 g SSV/L	SBR*	6.5 – 7.9 mg O <sub>2</sub> /L	Eficiencia de consumo en NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> Relación NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> +NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	El proceso nitrito oxidante fue el más afectado por la presencia de sulfuro provocando acumulación de NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
Æsøy y col. (1998)	0 – 2.5 mg S-HS <sup>-</sup> /L	No se reportó	Reactor de lecho fluidizado con biopelícula nitrificante	5-8 mg O <sub>2</sub> /L	Velocidad volumétrica de eliminación de NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> Eficiencia de eliminación de NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Disminución en la velocidad volumétrica de eliminación de NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
Martienssen y col. (1995)	200-800 mg S-HS <sup>-</sup> /L	Biopelícula nitrificante	Reactor de lecho fluidizado con biopelícula	4-6 mg O <sub>2</sub> /L	Eficiencia de eliminación de NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	El proceso respiratorio nitrificante se disminuyó mas del 60% en el consumo de amonio
Bentzen y col. (1995)	0.24 – 5 mg S-HS <sup>-</sup> /L	No se reportó	Cultivos en lote	6 – 8 mg O <sub>2</sub> /L	Eficiencia de eliminación de NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Disminución en la velocidad volumétrica de eliminación de NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
Becker y col. (1997)	5 – 10 mg S-HS <sup>-</sup> /L	No se reportó	Cultivos en lote	5-6 mg O <sub>2</sub> /L	Eficiencia de eliminación de NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Disminución en la velocidad volumétrica de eliminación de NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>

\*SBR: Sequencing Batch Reactor, según sus siglas en ingles o Reactor de lotes secuenciados.

Se observa que las condiciones experimentales utilizadas en los diferentes estudios son distintas y esto dificulta la comparación de los resultados. Por ejemplo, las unidades en la biomasa utilizada en los diferentes ensayos son diferentes y no hay un factor de conversión para poder compararlos, la concentración de oxígeno varía entre cada experimento y las configuraciones de reactores son distintas. Sin embargo, de manera general se puede destacar que en todos los trabajos, se muestra que el sulfuro tiene un impacto negativo sobre la nitrificación.

Es interesante notar también que muy pocos estudios evalúan el proceso nitrificante de manera completa (oxidación de amonio hasta nitrato) utilizando las variables de respuesta necesarias: eficiencia de consumo en amonio, rendimientos de nitrito y nitrato, y velocidades específicas de consumo de amonio y producción en nitrato. Hacen falta más estudios enfocados a la fisiología de consorcios nitrificantes en presencia de sulfuro para entender mejor cómo se ve afectado el proceso respiratorio nitrificante.

Hay que señalar también que en ninguno de los estudios se evaluó la oxidación del sulfuro y la formación de sus productos.

En el estudio realizado por Sears y col. (2004), el inóculo nitrificante (1 g SSV/L) fue expuesto a diferentes concentraciones de sulfuro (0.5 – 200 mg/L) durante 2 h sin aireación. Posteriormente, se utilizó la misma biomasa previamente expuesta al sulfuro en ensayos nitrificantes en lote aireados y se midió la velocidad de consumo de amonio. Se observó que a una concentración de sulfuro de 5 mg S/L se vio inhibido el proceso nitrificante con una disminución de 72% en la velocidad de consumo de amonio. Cuando se añadió el sulfuro bajo condiciones aireadas, se encontró que a concentraciones mayores que 0.5 mg/L la velocidad de oxidación de amonio disminuyó un 95%. En cuanto se eliminó el sulfuro del cultivo, el lodo recuperó su actividad amonio oxidante pero a velocidades menores. En este estudio, sólo se enfocaron en el primer paso de la nitrificación, donde se ve involucrada la enzima AMO y no se presentaron datos del proceso de nitrito oxidación.

Según Sears y col. (2004), este efecto inhibitorio del sulfuro sobre la amonio-oxidación pudo deberse a varias razones. Una de ellas es que el sulfuro reacciona con el oxígeno presente (disuelto), disminuyendo así su disponibilidad en el medio. Sin embargo como en este experimento se aireó constantemente el cultivo (2 a 6 mg O<sub>2</sub>/L), no permitió comprobar la inhibición por limitación de O<sub>2</sub>. Otra de las propuestas de Sears y col. (2004), es que el sulfuro reacciona con los metales divalentes adicionados en el medio de cultivo como elementos traza, quelándolos y esto podría disminuir su disponibilidad en el medio de

cultivo y así verse inhibido el proceso respiratorio nitrificante. Otra hipótesis mencionada por los autores es que hay una inhibición reversible de la AMO por la presencia de sulfuro. Llegaron a esta suposición porque después de 24 h de que se dejó de exponer con sulfuro el inóculo, éste recuperó su capacidad nitrificante. Se ha reportado que algunos compuestos azufrados pueden ser sustratos de la AMO (McCarty, 1999; Juliette y col., 1993). Sin embargo hace falta mucho más investigación referente a este tema. Joye y Hollibaugh (1995) obtuvieron resultados similares de recuperación de la actividad nitrificante utilizando sedimentos de agua marina y agua dulce expuestos a concentraciones de sulfuro de 60 y 100  $\mu\text{M}$ .

Por otra parte, Erguder y col. (2008) utilizaron un reactor nitrificante de lotes secuenciados ( $2.7 \pm 0.06$  g SSV/L), operando con ciclos de 2 d en condiciones aerobias y anóxicas. El sulfuro fue adicionado al reactor a concentraciones iniciales variando de 1.3 a 80 mg/L. El proceso nitrito oxidante resultó ser más sensible a la presencia de sulfuro que la amonio oxidación ya que la eficiencia de eliminación en amonio se mantuvo alta cuando se acumuló nitrito en el cultivo. La actividad amonio oxidante no fue afectada hasta una concentración de 60 mg/L de sulfuro.

### III.- JUSTIFICACIÓN

En algunos efluentes industriales se pueden encontrar altas concentraciones de amonio y sulfuro. La nitrificación puede ser utilizada como una primera etapa para oxidar el  $\text{NH}_4^+$  a  $\text{NO}_3^-$ , para que posteriormente este último se reduzca hasta  $\text{N}_2$  por desnitrificación. Sin embargo en la literatura aún no se cuenta con suficiente información sobre la fisiología y cinética del proceso nitrificante en presencia de sulfuro. En los pocos trabajos existentes se omiten datos cinéticos (velocidades específicas del consumo de amonio, producción de nitrato, consumo de oxígeno y oxidación del sulfuro) que permitan entender mejor cómo son inhibidos los procesos de amonio y nitrato oxidación. Por tal motivo, es necesario ampliar la información referente al proceso respiratorio nitrificante en presencia de  $\text{HS}^-$  y poder contribuir a proponer alternativas para tratar efluentes que contengan a la vez amonio y sulfuro.

### IV.- HIPOTESIS

- Bajo condiciones experimentales controladas, se puede llevar a cabo el proceso respiratorio nitrificante en presencia de sulfuro, con alta eficiencia de consumo de amonio y alto rendimiento de formación de nitrato.

### V.- OBJETIVOS

#### V.1 Objetivo general

Evaluar y analizar el efecto del sulfuro sobre el proceso respiratorio nitrificante.

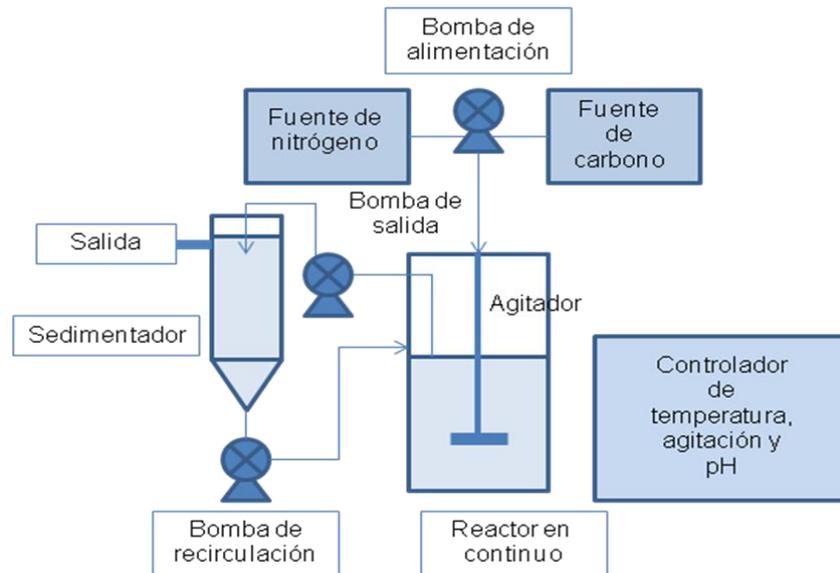
#### V.2 Objetivos particulares

En cultivos en lote con un consorcio nitrificante:

- Evaluar y analizar el efecto inhibitorio del sulfuro a diferentes concentraciones iniciales sobre los procesos de amonio y nitrato oxidación.
- Evaluar y analizar la oxidación del sulfuro bajo las condiciones experimentales utilizadas.

## VI.- MATERIALES Y MÉTODOS

### VI.1 Reactor nitrificante en continuo



**Figura 5.** Reactor nitrificante en continuo.

Se instaló un reactor nitrificante de tanque agitado con un volumen de operación de 6 L (Figura 5). Se inoculó con lodo nitrificante a una concentración de proteína microbiana de  $532 \pm 25$  mg/L. Se operó a una temperatura de  $30 \pm 3^\circ\text{C}$ , un pH de  $7.2 \pm 0.4$ , una agitación de 310 rpm, una aireación continua de aire (concentración de oxígeno disuelto de  $6 \pm 1$  mg  $\text{O}_2/\text{L}$ ) y un tiempo de retención hidráulica de 3.5 d.

El reactor fue alimentado con agua residual sintética compuesta por dos medios que se separaron como fuente de nitrógeno (A) y carbono (B) (Tabla 6). El medio A se diluyó a una concentración total de  $\text{N-NH}_4^+$  de 743 mg/L. El bicarbonato de sodio del medio B además de ser la fuente de carbono tiene la función de amortiguar el pH.

Los medios A y B fueron alimentados a un flujo de 0.86 L/d en ambos casos. La velocidad de carga de  $\text{N-NH}_4^+$  en el reactor fue de  $102.9 \pm 4.7$  mg  $\text{N-NH}_4^+/\text{Ld}$ . La relación C/N fue de 1.8. Además se adicionaron cada tercer día 30 mL de una solución de  $\text{FeSO}_4$  al 0.5% (p/v) como micronutriente para la actividad enzimática de la amonio monooxigenasa.

Se operó el reactor y dio seguimiento durante 143 días, midiéndose las concentraciones de  $\text{N-NH}_4^+$ ,  $\text{N-NO}_2^-$ ,  $\text{N-NO}_3^-$  y biomasa. Se determinaron la eficiencia de consumo de  $\text{N-NH}_4^+$  y los rendimientos de formación de  $\text{N-NO}_2^-$ ,  $\text{N-NO}_3^-$  y biomasa. El consorcio nitrificante

mantenido en el reactor bajo estas condiciones, se utilizó como fuente de inóculo para todos los ensayos en lote.

**Tabla 6.** Composición del medio de cultivo alimentado al reactor nitrificante en continuo.

Medio A	Concentración (g/L)
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.732
(NH <sub>4</sub> )Cl	1.398
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.73
MgSO <sub>4</sub>	0.6
NaCl	1
Medio B	Concentración (g/L)
NaHCO <sub>3</sub>	9.3
CaCl <sub>2</sub>	0.05

## VI.2 Cultivos en lote con un consorcio nitrificante

Se utilizaron botellas serológicas de 160 mL, con un volumen de operación de 100 mL. El inóculo (30 mL) provino del reactor nitrificante en continuo, y se añadió a una concentración inicial de proteína microbiana de  $128.0 \pm 6.4$  mg/L. El lodo fue previamente lavado con solución fisiológica (9 g/L de NaCl). La concentración inicial de amonio fue  $108.0 \pm 4.3$  mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L. Se utilizaron los medios A (25 mL) y B (25 mL) que se describen en la tabla 7. Se adicionó además 0.5 mL de una solución de FeSO<sub>4</sub> (0.5% p/v). El resto fue agua destilada, para alcanzar un volumen final de 100 mL.

**Tabla 7.** Concentraciones de los nutrientes del medio de cultivo nitrificante en lote.

Medio A	Concentración (g/L)
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.95
(NH <sub>4</sub> )Cl	0.77
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.12
MgSO <sub>4</sub>	0.8
NaCl	0.8
Medio B	Concentración (g/L)
NaHCO <sub>3</sub>	7
CaCl <sub>2</sub>	0.04

Se le inyectó oxígeno puro (99% de pureza) durante 2 min al medio de cultivo antes de adicionar el inóculo y el sulfuro. Se selló la botella herméticamente con un tapón de goma y un anillo de aluminio y se saturó el espacio de cabeza con oxígeno durante 2 min. El pH

inicial fue de  $7.8 \pm 0.3$ . Finalmente se colocó cada botella en un agitador orbital a 200 rpm dentro de una incubadora a temperatura controlada de  $30^\circ\text{C}$  por 60 h. Cada ensayo se realizó por duplicado. El sulfuro ( $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ) fue añadido a los cultivos nitrificantes a las siguientes concentraciones:  $13 \pm 0.7$ ,  $58 \pm 2.5$  y  $112 \pm 2.5$  mg  $\text{S}^{2-}/\text{L}$ .

A diferentes tiempos de incubación, se tomaron muestras de los cultivos en lote que fueron centrifugadas y filtradas a través de una membrana de  $0.45 \mu\text{m}$ . Se midieron los siguientes compuestos:  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{S}^{2-}$  así como  $\text{SO}_4^{2-}$  y  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ , para determinar las velocidades, los rendimientos y la eficiencia del proceso respiratorio nitrificante y compararlos con una cinética control sin presencia de sulfuro.

### VI.3 Variables de respuesta del proceso nitrificante

Para valorar fisiológicamente el cultivo, se determinaron las variables de respuesta, las cuales nos proporcionaron información global del proceso. Las variables de respuesta utilizadas tanto en cultivos en lote como en el reactor en continuo fueron: la eficiencia y el rendimiento. La eficiencia de consumo de  $\text{NH}_4^+$  ( $E_{\text{NH}_4^+}$ ) que es la forma de cuantificar el consumo de sustrato, se define como:

$$E_{\text{NH}_4^+} = \left( \frac{\text{N} - \text{NH}_4^+_{\text{inicial}} - \text{N} - \text{NH}_4^+_{\text{final}}}{\text{N} - \text{NH}_4^+_{\text{inicial}}} \right) \cdot 100 \quad \dots\dots\dots (11)$$

Los rendimientos de producción de N- $\text{NO}_3^-$  ( $Y_{\text{NO}_3^-}$ ), N- $\text{NO}_2^-$  ( $Y_{\text{NO}_2^-}$ ) y biomasa microbiana ( $Y_{\text{B.M}}$ ) fueron determinados también. El rendimiento se refiere a la generación de producto (P) a partir del sustrato (S) consumido y se calcula:

$$Y_{\text{NO}_3^-} = \left( \frac{\text{N} - \text{NO}_3^-_{\text{formado}}}{\text{N} - \text{NH}_4^+_{\text{consumido}}} \right) \dots\dots\dots (12)$$

El rendimiento puede proporcionar información relacionada con las vías metabólicas. Es importante mencionar que la eficiencia y los rendimientos deben ser medidos a un tiempo constante.

La cinética del proceso nitrificante se evaluó en los cultivos en lote mediante el cálculo de las velocidades volumétricas (ecuación 13) y específicas (ecuación 14) de consumo de amonio y producción de nitrato, las cuales se expresan como sigue:

$$q_p x = \frac{dP}{dt} \qquad q_s x = \frac{dS}{dt} \dots\dots\dots (13)$$

$$q_p = \frac{1}{x} \frac{dP}{dt} \qquad q_s = \frac{1}{x} \frac{dS}{dt} \dots\dots\dots (14)$$

Donde x es la concentración de proteína microbiana. Asimismo, las velocidades específicas de consumo de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (q-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) y producción de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (q-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) fueron expresadas en mg N/mg proteína h. Cabe mencionar que la velocidad volumétrica aumenta conforme aumenta la concentración celular, por lo que no es útil para evaluar la capacidad exclusiva del cultivo. Mientras que la velocidad específica sí evalúa las capacidades metabólicas propias del cultivo.

Cabe destacar también que se realizó el balance de nitrógeno (mg/Ld) en el cultivo en continuo, utilizando la siguiente ecuación:

$$Q_e \text{ N-NH}_4^+ = Q_s \text{ N-NH}_4^+ + Q_s \text{ N-NO}_3^- + Q_s \text{ N-NO}_2^- + Q_s \text{ N-Biomasa}$$

Q<sub>e</sub> es la velocidad de carga y Q<sub>s</sub>, la velocidad de descarga. Al ser cuantificada la proteína microbiana se asumió que el 16% de la proteína microbiana es nitrógeno (Bailey y Ollis, 1986).

Para los cultivos en lote, el balance de N se realizó de la siguiente manera (mg N/L):

$$[\text{N-NH}_4^+]_{\text{inicial}} = [\text{N-NH}_4^+]_{\text{final}} + [\text{N-NO}_2^-]_{\text{final}} + [\text{N-NO}_3^-]_{\text{final}} + [\text{N-Biomasa}]_{\text{final}}$$

Se estableció igualmente el balance de S (mg S/L):

$$[\text{S-S}^{2-}]_{\text{inicial}} = [\text{S-HS}^-]_{\text{final}} + [\text{S-H}_2\text{S}]_{\text{final}} + [\text{S-SO}_4^{2-}]_{\text{final}} + [\text{S-S}_2\text{O}_3^{2-}]_{\text{final}} + [\text{S}^0]_{\text{final}}$$

## VI.4 Cultivos control

Se realizaron diversas cinéticas control en lote para compararlas con las cinéticas obtenidas a diferentes concentraciones de sulfuro. En estos ensayos control, se utilizó la metodología previamente descrita en VI.2.

Se realizaron cinéticas en lote con biomasa estéril para evaluar la posible pérdida de amonio y sulfuro por fenómenos de adsorción. Se esterilizó la biomasa en una autoclave durante 15 min a una presión de 15 psi.

Posteriormente se realizaron cinéticas del proceso respiratorio nitrificante sin sulfuro y se calculó: eficiencia, rendimientos y velocidades específicas de consumo de amonio y formación de nitrato.

En ensayos abióticos aireados, se midió la oxidación del sulfuro a una concentración inicial de  $107.5 \pm 3.5 \text{ mg S-S}^2/\text{L}$ .

## VI.5 Métodos analíticos

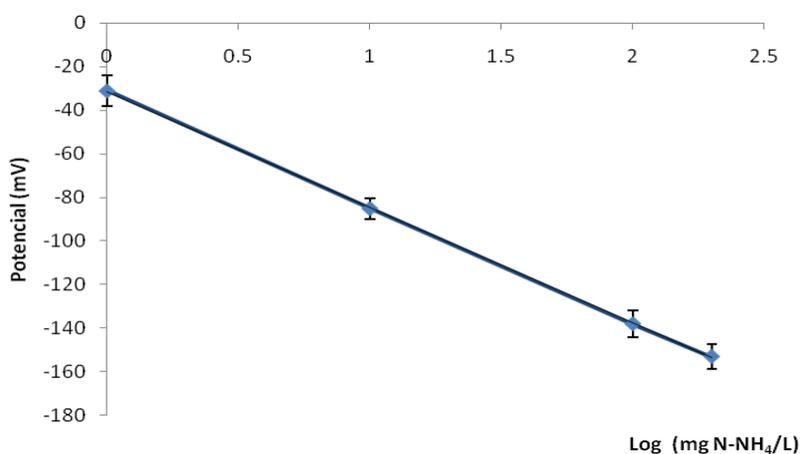
Los métodos analíticos que se utilizaron durante el proyecto experimental se enlistan en la tabla 8. La descripción de cada método se presenta en los siguientes apartados (VI.5.1, VI.5.2, VI.5.3, VI.5.4 y VI.5.5) con su respectiva curva estándar.

**Tabla 8.** Métodos analíticos utilizados durante el proyecto experimental para el análisis de compuestos en las aguas residuales.

Compuesto	Método
$\text{NH}_4^+$	Electrodo selectivo
$\text{NO}_2^-$	HPLC
$\text{NO}_3^-$	HPLC
$\text{HS}^-$	Método iodométrico
$\text{SO}_4^{2-}$	HPLC
$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	HPLC
Proteína microbiana	Método de Lowry
Oxígeno	Electrodo selectivo

### VI.5.1 Cuantificación de amonio

Para cuantificar el amonio, se utilizó un electrodo selectivo de amoniaco (Phoenix electrode Co). Primeramente se construyó una curva estándar con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  a cuatro concentraciones conocidas: 1, 10, 100, y 200  $\text{mg NH}_4^+/\text{L}$ , a partir de la cual se determinó la concentración de amonio en las muestras (Figura 6). La lectura del potencial (mV) generado por el electrodo se registró con un potenciómetro (Cole-Parmer). 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 50 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 cuando fue estable (aproximadamente 3 min. después de agregar el NaOH), (Tabla 9).



**Figura 6.** Curva estándar de amonio.

**Tabla 9.** Valores de  $R^2$ , pendiente y ordenada de la curva estándar de amonio.

Variable	$R^2$	m	b
s			
Promedio	0.9999	-53.035	-31.478
D.E	0.00102	4.06887	5.91
C.V (%)	0.102	7.672	18.764

### VI.5.2 Medición de nitrito y nitrato

Como método de cuantificación de nitrito y nitrato, se utilizó un cromatógrafo de líquidos (HPLC, Perkin Elmer serie 200) con una columna de intercambio iónico (Waters IC-pak HC) y un detector UV-visible. La fase móvil consistió en una mezcla de butanol, acetonitrilo y un concentrado de gluconato (20:120:20, v:v:v) diluidos con agua desionizada a un volumen de 1L. La longitud de onda fue de 214 nm y el flujo de 2 mL/min. Se construyó una curva estándar a partir de una solución madre de 1000 mg/L de cada uno ( $\text{N-NO}_2^-$  y  $\text{N-NO}_3^-$ ) a las concentraciones de 0, 25, 50, 75 y 100 mg N de nitrito y nitrato/L y se encontró que la respuesta del equipo fue lineal (Figura 7 y tablas 10 y 11).

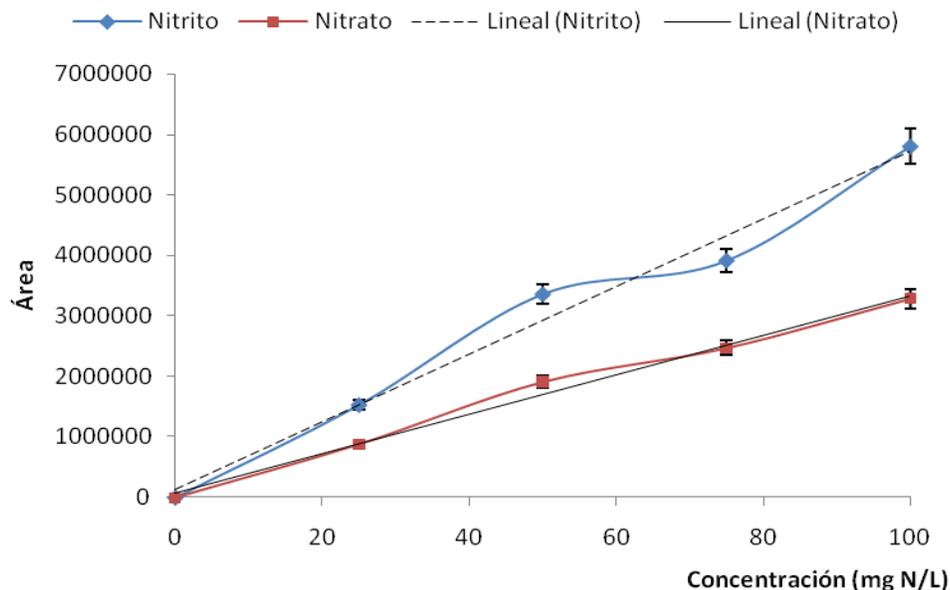


Figura 7. Curva estándar de nitrito y nitrato.

Tabla 10. Valores de  $R^2$ , pendiente y ordenada de la curva estándar de nitrito.

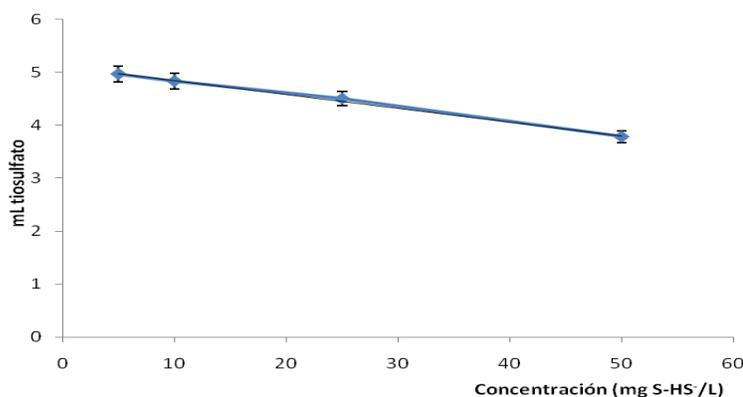
Variables	$R^2$	m	b
Promedio	0.9809	55927	124211.33
D.E	0.00159	126.439	9281.15
C.V (%)	0.162	0.226	7.472

**Tabla 11.** Valores de  $R^2$ , pendiente y ordenada de la curva estándar de nitrato.

Variable	$R^2$	m	b
Promedio	0.9922	32619.7	78132.7
D.E	0.0004	38.03	3445.7
C.V (%)	0.0382	0.117	4.41

### VI.5.3 Cuantificación de sulfuro

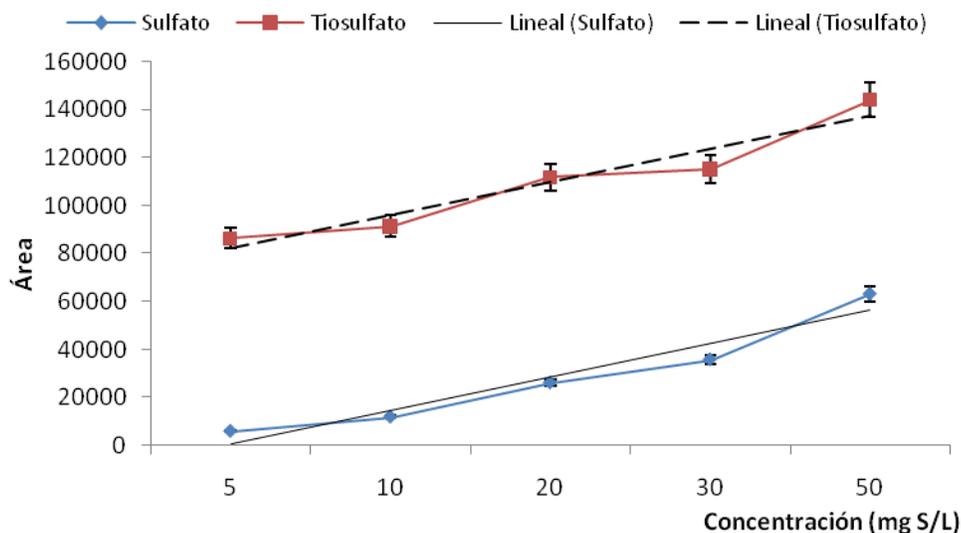
El procedimiento de cuantificación de sulfuro en fase acuosa se realizó inmediatamente después de tomar la muestra. En un matraz Erlenmeyer de 100 mL, se adicionó 5 mL de solución de yodo (0.025N previamente valorada), además se agregó 10 mL de agua destilada y 1 mL de HCL 3N sin agitar. Enseguida se midió un volumen (10 mL) de la muestra problema y se adicionó sin agitar. Posteriormente se dejó en reposo por 10 min y se procedió a titular lentamente con la solución de tiosulfato de sodio (0.025N también previamente valorada). Al alcanzar el contenido en el matraz una coloración amarilla se adicionó 0.5 a 1 mL del indicador de almidón. Adquirió una coloración oscura que al continuar la titulación en el punto final cambió a incoloro o simplemente hasta observar el vire del color violeta-oscuro, debido a la reacción del almidón con el yodo. Se obtuvo una respuesta lineal como se muestra en la figura 8 y tabla 12.

**Figura 8.** Curva estándar de sulfuro.**Tabla 12.** Valores de  $R^2$ , pendiente y ordenada de la curva estándar de sulfuro.

Variable	$R^2$	m	b
Promedio	0.9968	-0.026	5.11
D.E	0.009	0.0007	0.027
C.V (%)	0.898	2.594	0.53

### VI.5.4 Cuantificación de sulfato y tiosulfato

Como método de cuantificación de sulfato y tiosulfato, se utilizó un cromatógrafo de líquidos (HPLC, Waters serie 600) con una columna de intercambio iónico (Varian) y un detector UV-visible. La fase móvil consistió de una solución de ftalato ácido de potasio (0.04 M). La longitud de onda fue de 308 nm y el flujo de 0.8 mL/min. Se construyó una curva estándar a partir de una solución madre de 1000 mg/L de cada uno ( $S-SO_4^{2-}$  y  $S-S_2O_3^{2-}$ ) a las concentraciones de 5, 10, 20, 30 y 50 mg S de sulfato y tiosulfato/L y se encontró que la respuesta del equipo fue lineal (Figura 9 y tablas 13 y 14).



**Figura 9.** Curva estándar de sulfato y tiosulfato.

**Tabla 13.** Valores de  $R^2$ , pendiente y ordenada de la curva estándar de tiosulfato.

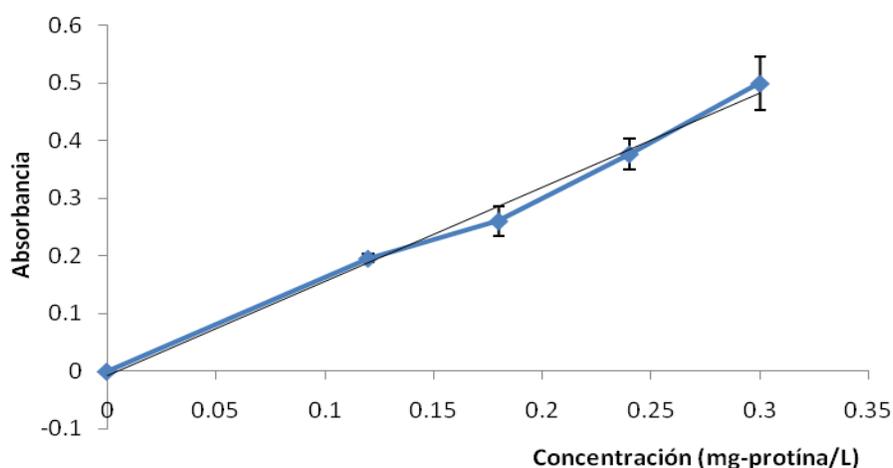
Variable	$R^2$	m	b
Promedio	0.9758	1258.4	80812
D.E	0.0002	0.7	3.54
C.V (%)	0.02	0.06	0.44

**Tabla 14.** Valores de  $R^2$ , pendiente y ordenada de la curva estándar de sulfato.

Variable	$R^2$	m	b
Promedio	0.9976	1265.5	-387
D.E	0.0001	0.7	5.66
C.V (%)	0.01	0.06	1.46

### VI.5.5 Medición de proteína microbiana

La concentración de proteína fue determinada por el método colorimétrico de Lowry (Lowry y col., 1951). Se midió la absorbancia con un espectrofotómetro (Shimadzu TM), a una longitud de onda de 750 nm. Se realizó una curva estándar de albúmina, como se muestra en la figura 10 y tabla 15.



**Figura 10.** Curva estándar de concentración de proteína microbiana.

**Tabla 15.** Valores de  $R^2$ , pendiente y ordenada de la curva estándar de proteína.

Variable	$R^2$	m	b
Promedio	0.9922	1.629	-0.007
D.E	0.0119	0.1516	0.0137
C.V (%)	1.21	9.311	195.34

Para todos los métodos analíticos, se corroboró que cada una de las curvas estándares presentaron valores de  $R^2$  superiores a 0.97 y un coeficiente de variación menor al 2%. Además se verificó que los métodos fueron reproducibles a través de los coeficientes de variación de las pendientes de las curvas estándares, los cuales se mantuvieron por debajo de 10%.

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### VII.1 Reactor en continuo

En la figura 11 y la tabla 16, se presentan las velocidades volumétricas de carga y descarga de amonio ( $Q_e \text{ N-NH}_4^+$  y  $Q_s \text{ N-NH}_4^+$ , respectivamente), así como la velocidad volumétrica de producción de nitrato ( $Q_s \text{ N-NO}_3^-$ ), obtenidas en el reactor nitrificante en continuo, durante un período de 106 días.

El reactor se alimentó con una  $Q_e \text{ N-NH}_4^+$  de  $102.9 \pm 4.7 \text{ mg N/L.d}$ . La velocidad de descarga en  $\text{N-NH}_4^+$  residual fue nula y la velocidad de producción de  $\text{N-NO}_3^-$  fue de  $98.7 \pm 2.5 \text{ mg N/L.d}$ . Durante el tiempo de operación del reactor nitrificante, no se detectó  $\text{N-NO}_2^-$ . Se observó que la  $Q_s \text{ N-NO}_3^-$  se mantuvo constante con una desviación estándar de 2.5, lo que indicó que el cultivo nitrificante alcanzó el régimen estacionario.

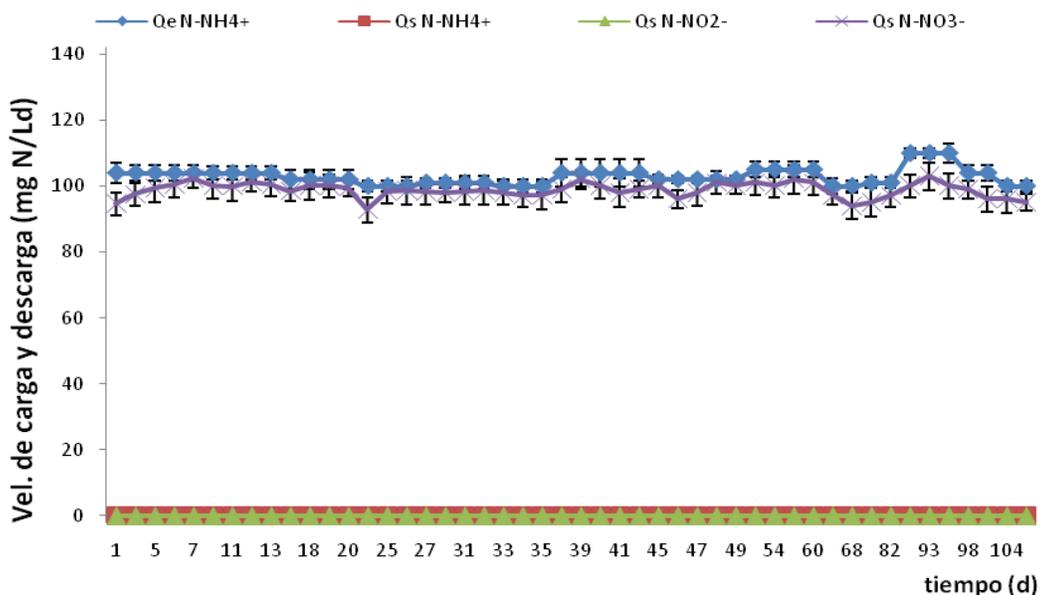


Figura 11. Perfil del reactor nitrificante en continuo.

Tabla 16. Balance de nitrógeno en el reactor nitrificante en continuo.

$Q_e$ amonio (mg N- $\text{NH}_4^+/\text{L.d}$ )	$Q_s$ amonio (mg N- $\text{NH}_4^+/\text{L.d}$ )	$Q_s$ nitrito (mg N- $\text{NO}_2^-$ /L.d)	$Q_s$ nitrato (mg N- $\text{NO}_3^-$ /L.d)	$Q_s$ biomasa (mg N- Prot./L.d)	Porcentaje de recuperación
$102.9 \pm 4.7$	$0 \pm 0.5$	0	$98.7 \pm 2.5$	$3.7 \pm 0.3$	99.5 %

Se determinó una eficiencia en el consumo de amonio de  $100\% \pm 3.4$  y un rendimiento de producción de nitrato de  $0.96 \pm 0.09$  (Tabla 17). Se encontró que el rendimiento de producción de proteína microbiana ( $Y_{P,M}$ ) fue de  $0.04 \pm 0.002$  mg N-proteína/mg  $N-NH_4^+$  consumido. Esto indicó que menos del 4% del  $N-NH_4^+$  consumido se utilizó para biosíntesis celular. Tanto el rendimiento alto de producción de nitrato como el bajo rendimiento de producción de biomasa, indicaron que el proceso nitrificante fue netamente desasimilativo. El valor promedio de pH fue  $7.8 \pm 0.3$ . Cabe mencionar que no fue necesario ajustar el pH en el reactor en continuo, debido a la presencia de bicarbonato de sodio en el medio de cultivo que tuvo la función de amortiguador.

De acuerdo con los resultados obtenidos, el consorcio nitrificante, utilizado como fuente de inóculo para los ensayos en lote, se encontraba fisiológicamente estabilizado.

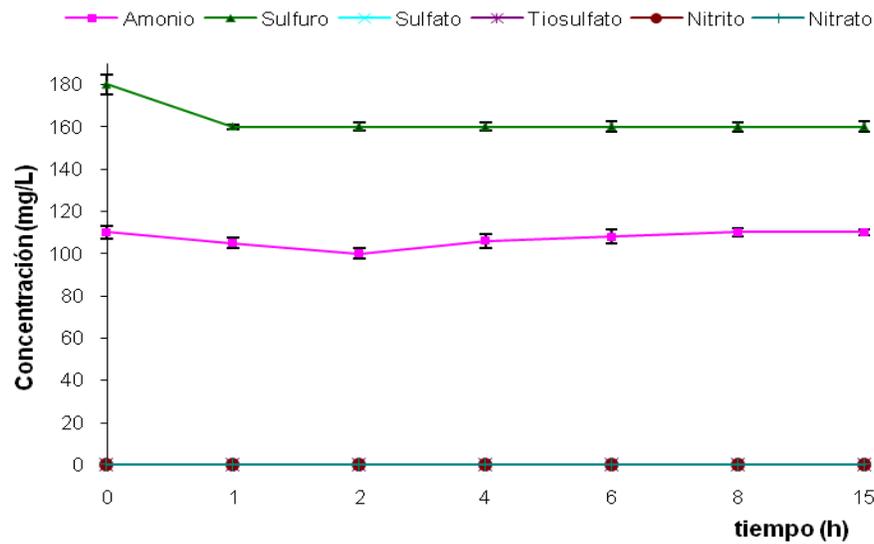
**Tabla 17.** Valores promedio y desviación estándar de las variables de respuesta, durante 106 días de seguimiento del reactor nitrificante en continuo, utilizado como fuente de inóculo.

Variables	Valor
Eficiencia (%)	$100 \pm 3.4$
Y Nitrito	0
Y Nitrato	$0.96 \pm 0.09$
Y Biomasa	$0.04 \pm 0.002$

## VII. 2 Cinéticas de la nitrificación en lote

### VII.2.1 Cinética con biomasa estéril

Se realizó esta prueba en lote con una concentración inicial de  $110.0 \pm 3.2$  mg  $N-NH_4^+$ /L y  $180.0 \pm 4.6$  mg  $HS^-$ /L, utilizando biomasa estéril ( $128.0 \pm 6.4$  mg proteína microbiana/L), en ausencia de oxígeno y a un valor de pH de  $7.8 \pm 0.3$ , para determinar la posible adsorción de sulfuro y amonio sobre el material biológico y la unidad experimental. En la figura 12 se puede apreciar el perfil de las concentraciones de sulfuro y amonio.



**Figura 12.** Perfiles de concentración de sulfuro y amonio, utilizando biomasa esterilizada en ausencia de oxígeno.

Durante la primera hora de ensayo se observó una disminución del 12% en la concentración inicial de sulfuro durante la primera hora. Esto se puede explicar debido a que una parte del sulfuro disuelto ( $HS^-$ ) pasó a su estado gaseoso ( $H_2S$  no ionizada), cuando se alcanzó el equilibrio químico (ecuaciones 16 y 17). De acuerdo a la ecuación de Henderson-Hasselbalch (ecuación 15) y al valor de pH de  $7.8 \pm 0.3$ , se estima que el 25% del sulfuro se encontraría en forma de  $H_2S$ .

$$pH = pK_a + \log\left(\frac{[A^-]}{[HA]}\right) \quad (15)$$

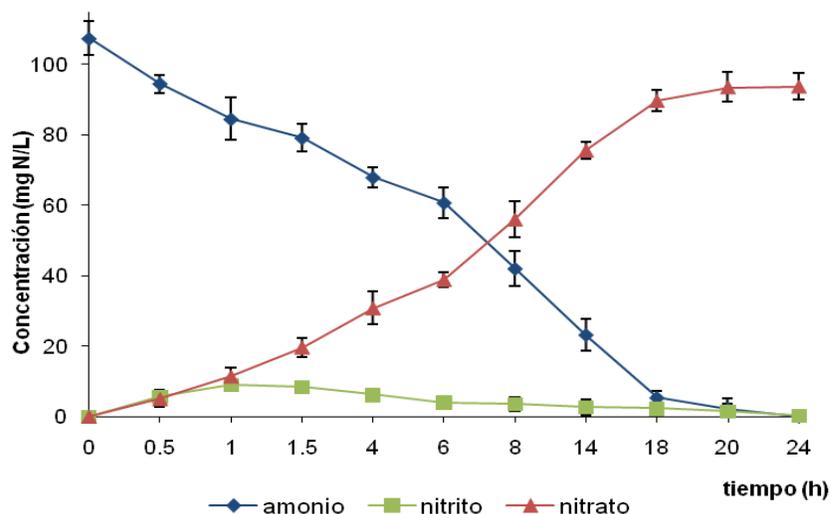


La concentración de amonio se mantuvo prácticamente constante a un valor promedio de  $107.0 \pm 3.4$  mg N- $NH_4^+$ /L. No se presentó la formación de ningún producto azufrado o nitrogenado. Con base en los resultados obtenidos, se considera que la adsorción de sulfuro y amonio por la biomasa no fue significativa.

## VII.2.2 Cultivo control nitrificante

Se llevaron a cabo cultivos nitrificantes control sin sulfuro utilizando biomasa proveniente del reactor en continuo en régimen estacionario. El objetivo fue establecer las cinéticas del proceso respiratorio nitrificante, calcular las variables de respuesta: eficiencia, rendimientos, velocidades volumétricas y específicas de consumo de amonio y producción de nitrato, y utilizarlas como referencia en los ensayos posteriores a diferentes concentraciones de sulfuro.

Como se puede observar en la figura 13, el amonio fue consumido en su totalidad, teniendo como producto principal nitrato. Se presentó la formación transitoria de nitrito, mismo que desapareció al final del ensayo de 24 h. De acuerdo con lo anterior se calcularon las variables de respuesta (Tabla 18).



**Figura 13.** Perfiles de consumo de amonio y formación de nitrito y nitrato en los cultivos en lote control sin sulfuro.

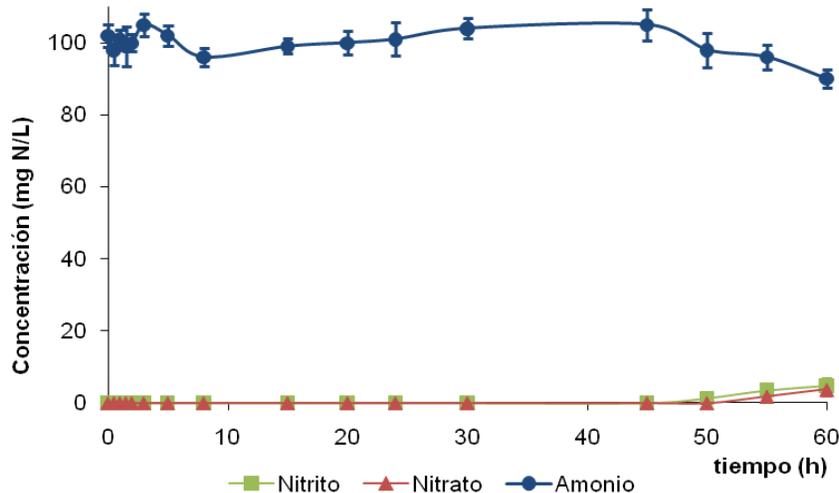
**Tabla 18.** Variables de respuesta del proceso respiratorio nitrificante de la cinética control.

Variables	Promedio
$E_{\text{NH}_4^+}$ (%)	$100 \pm 2.3$
$Y_{\text{NO}_3^-}$ (mg N- $\text{NO}_3^-$ /mg N- $\text{NH}_4^+$ consumido)	$0.88 \pm 0.04$
$Y_{\text{NO}_2^-}$ (mg N- $\text{NO}_2^-$ /mg N- $\text{NH}_4^+$ consumido)	0
$q_{\text{NH}_4^+}$ mg N- $\text{NH}_4^+$ /mg proteína·h	$0.095 \pm 0.01$
$q_{\text{NO}_3^-}$ mg N- $\text{NO}_3^-$ /mg proteína·h	$0.088 \pm 0.009$

Después de 24 h de incubación se obtuvo una eficiencia de consumo de amonio del 100% y un alto rendimiento de nitrato. Los resultados registrados mostraron que las condiciones experimentales utilizadas en los cultivos en lote fueron adecuadas para llevar a cabo el proceso respiratorio nitrificante con altos valores de eficiencia y rendimiento de formación de nitrato.

### VII.2.3 Cinética nitrificante con 112 mg S-HS<sup>-</sup>/L

Se realizó el perfil cinético del proceso nitrificante en presencia de sulfuro a  $112.0 \pm 2.5$  mg S-HS<sup>-</sup>/L (Figura 14).



**Figura 14.** Perfiles de consumo de amonio y formación de nitrito y nitrato en los cultivos nitrificantes expuestos a 112 mg S-HS<sup>-</sup>/L.

Se observó una fase de retardo de aproximadamente 45 h en el consumo de amonio. Después de 60 h, la oxidación de amonio fue baja con una eficiencia de apenas  $11.1 \pm 1.3\%$ . A su vez se observó la formación de nitrito y nitrato a partir de 45 h, con rendimientos de  $0.6 \pm 0.04$  y  $0.3 \pm 0.07$ , respectivamente. Estos primeros resultados muestran que el sulfuro a  $112.0 \pm 2.5$  mg S-HS<sup>-</sup>/L retardó considerablemente la oxidación de amonio por el consorcio nitrificante.

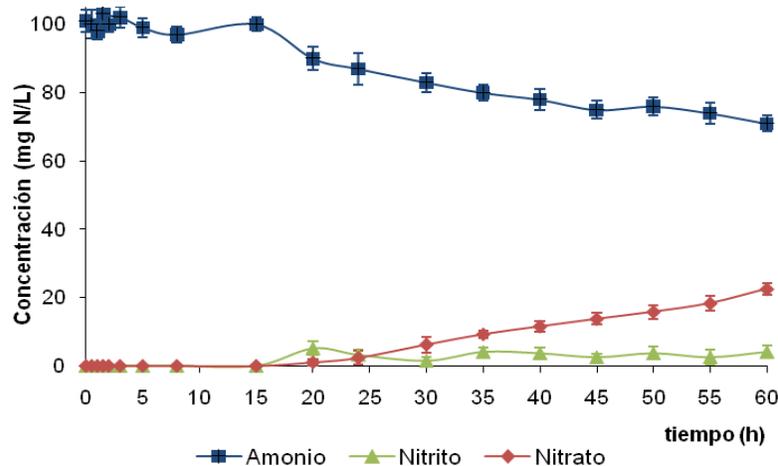
Por otro lado se determinó una velocidad específica de consumo de amonio de  $0.0073 \pm 0.0003$  mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/mg proteína·h, lo que corresponde a una disminución del 92% con

respecto a la cinética control (Tabla 18). La disminución en la velocidad específica de formación de nitrato fue de 96.5% con respecto al control con un valor de  $0.003 \pm 0.0004$  mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/mg proteína·h. La disminución en las velocidades específicas (durante los ensayos de 60 h) evidenció el efecto inhibitorio del sulfuro sobre la velocidad del proceso respiratorio nitrificante.

La diferencia en la disminución de la velocidad específica de producción de nitrato (-96.5%) con respecto a la velocidad específica de consumo de amonio (-92%) no fue significativa y el efecto del sulfuro sobre la nitrito-oxidación pudo ser debida a la inhibición de la primera fase de la nitrificación, la amonio-oxidación. Sin embargo, no se puede descartar una posible alteración de la nitrito-oxidación en sí, ya que una parte del amonio oxidado se acumuló en forma de nitrito. Según Erguder y col. (2008), las bacterias nitrito-oxidantes son más sensibles que las amonio-oxidantes al efecto del sulfuro.

#### VII.2.4 Cinética nitrificante con 58 mg S-HS<sup>-</sup>/L

Posteriormente, se evaluó el efecto de la adición de sulfuro a una concentración de  $58.0 \pm 2.5$  mg S-HS<sup>-</sup>/L (Figura 15).



**Figura 15.** Perfiles de consumo de amonio y producción de nitrito y nitrato en cultivos nitrificantes expuestos a 58 mg S-HS<sup>-</sup>/L.

Tal como se muestra en la figura 15, el consumo de amonio presentó una fase de retardo de 15 h. Posteriormente comenzó la oxidación de amonio con una eficiencia de 29.7

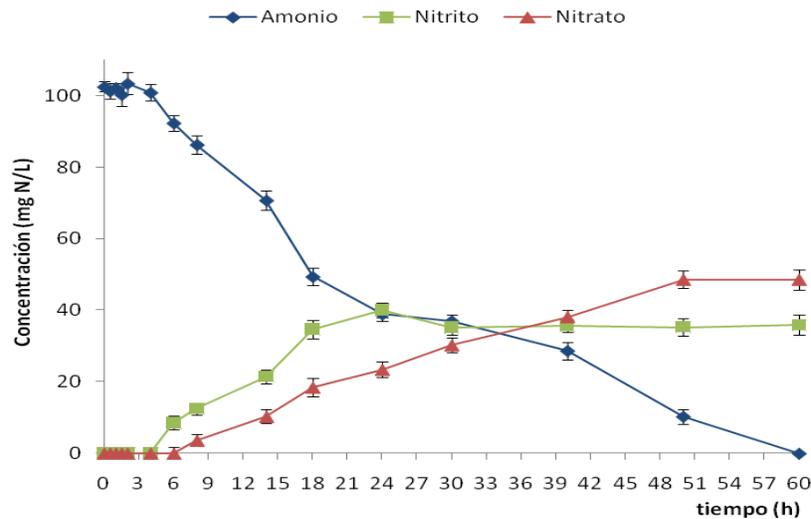
$\pm 2.5\%$  al finalizar el ensayo. A su vez se registró la formación de nitrito y nitrato con rendimientos de  $0.24 \pm 0.04$  y  $0.65 \pm 0.6$ , respectivamente. Con base en los resultados obtenidos se determinó la velocidad específica de consumo de amonio, registrando una disminución del 92% ( $0.0076 \pm 0.001$  mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/mg proteína·h) comparada con la cinética control. La disminución en la velocidad específica de formación de nitrato fue de 95% con respecto al control ( $0.004 \pm 0.0003$  mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/mg proteína·h).

Las velocidades específicas se vieron igualmente disminuidas en comparación con la cinética control, la diferencia reportada entre ellas no fue significativa con respecto al ensayo realizado a una concentración de exposición de 112 mg HS<sup>-</sup>/L. En el caso de los rendimientos y la eficiencia, comparados con el control, siguen siendo significativamente menores. Si se comparan estos resultados con los obtenidos a una concentración de exposición de 112 mg HS<sup>-</sup>/L, se observa un incremento en la eficiencia y el rendimiento de formación de nitrato, mientras que el rendimiento de nitrito disminuyó significativamente.

Todo parece indicar, que entre menor sea la concentración inicial de sulfuro a la que se expone el inóculo, los efectos sobre el consumo de amonio y la formación de nitrato son menores, sin embargo, las velocidades específicas se ven igualmente disminuidas. Aunque la eficiencia de consumo de amonio es baja, el producto predominante es el nitrato, esto quiere decir, que sí se realiza la nitrificación con un rendimiento razonablemente alto de formación de nitrato y que el nitrito va disminuyendo en cantidad conforme disminuye la concentración de sulfuro inicial.

### VII.2.5 Cinética nitrificante con 13 mg S-HS<sup>-</sup>/L

Con la finalidad de tener un panorama más completo del efecto del sulfuro sobre el consorcio nitrificante se probó una tercera concentración inicial de exposición en sulfuro con un valor de  $13.5 \pm 0.7$  mg S-HS<sup>-</sup>/L (Figura 16).



**Figura 16.** Perfil de consumo de amonio y producción de nitrito y nitrato en cultivos nitrificantes expuestos a 13 mg S-HS<sup>-</sup>/L.

Es posible observar que el consumo de amonio presentó una fase de retardo de 4 h, posteriormente empezó el consumo de amonio, teniendo una eficiencia final de  $100 \pm 3.8 \%$ . A su vez se registró la formación de nitrito y nitrato manteniéndose constantes sus concentraciones a las 50 h de haber iniciado la cinética, con rendimientos finales de  $0.35 \pm 0.03$  y  $0.47 \pm 0.4$ , respectivamente. Se determinó la velocidad específica de consumo de amonio, obteniendo una disminución del 73.7% ( $0.025 \pm 0.004$  mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/mg proteína.h) con respecto al control. La disminución en la velocidad específica de formación de nitrato fue de 88.6% comparada con el control ( $0.01 \pm 0.006$  mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/mg proteína.h).

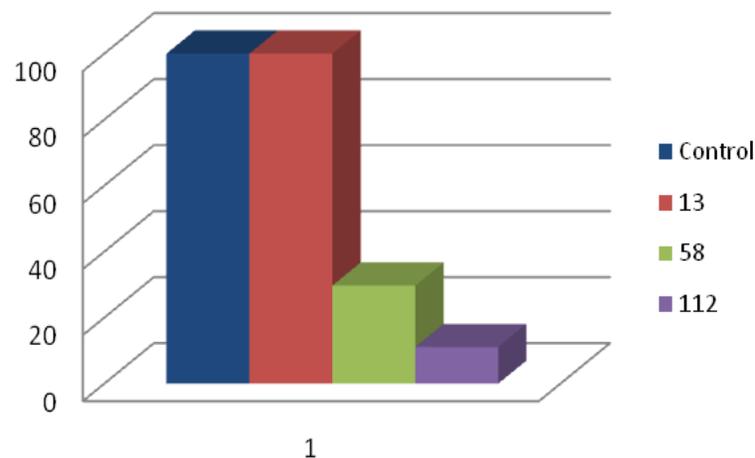
Con los resultados obtenidos a 13 mg S-HS<sup>-</sup>/L, se pudo corroborar que a menor concentración de sulfuro a la que se expuso el inóculo nitrificante, fue menor el efecto sobre el proceso respiratorio. Se determinó una eficiencia de consumo de amonio de 100%, es decir, todo el amonio que se adicionó fue consumido, lo que demuestra que el proceso de amonio-oxidación se llevó a cabo satisfactoriamente aunque fue retardado presentando una fase de retardo de 4 h. Sin embargo, el proceso nitrito-oxidante fue significativamente afectado por la exposición al sulfuro todavía, ya que se presentó acumulación de nitrito en el cultivo. De acuerdo a los resultados obtenidos a 13 mg S-HS<sup>-</sup>/L, se observó que el sulfuro afecta principalmente el proceso nitrito-oxidante. Estos resultados corroboran lo reportado por Erguder y col. (2008), quienes observaron que la adición de sulfuro en un reactor nitrificante de lotes secuenciados alteró principalmente el proceso nitrito-oxidante y

ocasionando la acumulación de nitrito. Esto puede ser utilizado para obtener una nitrificación parcial y detener el proceso hasta la formación de nitrito para que se realice una desnitrificación subsecuente, como una forma más eficiente y rápida de tratamiento de aguas residuales con altas concentraciones de nitrógeno.

### VII.2.6 Comparación de las variables de respuesta de la nitrificación a diferentes concentraciones de sulfuro

Las variables de respuesta que se vieron afectadas por la exposición del inóculo nitrificante a diferentes concentraciones de sulfuro son: la eficiencia, los rendimientos y las velocidades específicas de consumo de amonio y formación de nitrato.

La eficiencia de consumo de amonio fue una de las variables de respuesta más representativa del efecto del sulfuro sobre el proceso respiratorio nitrificante, ya que se observó que conforme mayor fue la concentración inicial de sulfuro a la que se expuso el inóculo, menor fue el consumo de amonio (Figura 17).

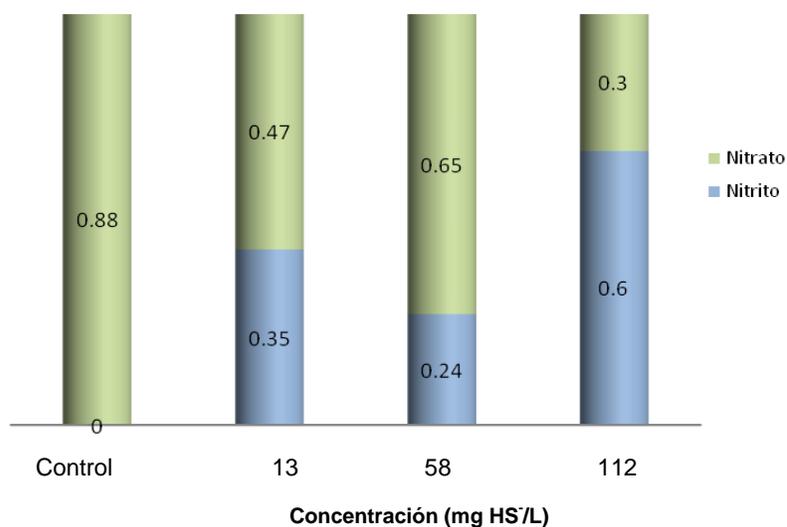


**Figura 17.** Eficiencias de consumo de amonio determinadas a diferentes concentraciones de exposición de sulfuro (0 (control), 13, 58 y 112 mg S-HS<sup>-</sup>/L).

A la concentración de sulfuro de 13 mg S-HS<sup>-</sup>/L, se puede observar que la eficiencia fue del 100%, lo cual indica que la amonio-oxidación no se vio afectada a esa concentración. Sin

embargo, la nitrificación fue alterada en su ruta metabólica ya que no todo el amonio consumido fue oxidado a nitrato, una parte se quedó en forma de nitrito (Figura 18).

A todas las concentraciones de sulfuro ensayadas, hubo acumulación de nitrito (Figura 18). Afectando mayormente el proceso nitrito-oxidante. Se ha reportado previamente que el sulfuro podría alterar la actividad de la AMO pero poco se sabe sobre el efecto del sulfuro sobre la nitrito óxido-reductasa (NOR), enzima involucrada en la oxidación del nitrito (Sears y col., 2004). El efecto negativo sobre el proceso respiratorio nitrificante podría deberse por otra parte a un efecto inhibitorio del nitrito ( $100 - 200\text{mg N-NO}_2^-/\text{L}$ ) sobre la NOR, ya que se acumuló en los ensayos realizados, por lo cual, se observa un mayor efecto en la segunda etapa de la nitrificación (nitrito-oxidación) aunque no está muy bien estudiado aún.



**Figura 18.** Rendimientos de nitrito y nitrato determinados a diferentes concentraciones de exposición de sulfuro (0, 13, 58 y 112 mg S-HS<sup>-</sup>/L).

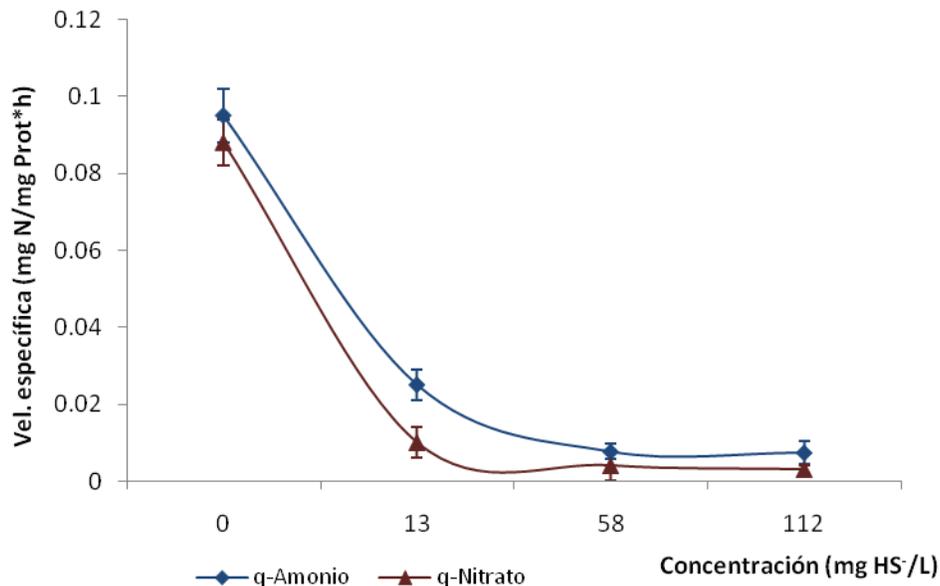
En la nitrificación, cuando las velocidades específicas de consumo de amonio y producción de nitrato están acopladas entre ellas o similares, la acumulación de nitrito es mínima, como fue el caso en el cultivo control (Tabla 19). Pero si la velocidad del proceso nitrito-oxidante es menor que la de la amonio-oxidación, se acumula nitrito, lo que puede interpretarse como posible inhibición de la NOR (Smith y col., 1997).

**Tabla 19.** Fases de retardo y velocidades específicas de la nitrificación a las diferentes concentraciones de exposición de sulfuro (13, 58 y 112 mg S-HS<sup>-</sup>/L) comparadas con el control.

Concentración de sulfuro (mg S-HS <sup>-</sup> /L)	Amonio-oxidación		Nitrito-oxidación
	Fase de retardo (h)	q-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /mg proteína.h)	q-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /mg prot.h)
0	0	0.095 ± 0.001	0.088 ± 0.009
13 ± 0.7	4	0.025 ± 0.004 (-73.7%)*	0.01 ± 0.006 (-88.6%)*
58 ± 2.5	15	0.0076 ± 0.001 (-92%)*	0.004 ± 0.0003 (-95%)*
112 ± 2.5	45	0.0073 ± 0.0003 (-92%)*	0.003 ± 0.0004 (-96.5%)*

\*(Porcentaje de disminución en la velocidad específica de consumo de amonio o formación de nitrato)

Fue posible determinar que la exposición al sulfuro provocó una fase de retardo en la oxidación del sustrato, guardando la siguiente relación: que a mayor concentración de sulfuro, mayor fue esta fase de retardo (Tabla 19).



**Figura 19.** Velocidades específicas de consumo de amonio y formación de nitrato determinadas a diferentes concentraciones de exposición del inóculo nitrificante al sulfuro (0, 13, 58 y 112 mg S-HS<sup>-</sup>/L).

El efecto inhibitorio del sulfuro a 13, 58 y 112 mg S-HS<sup>-</sup>/L se reflejó en los valores de las velocidades específicas disminuyéndolas, siendo en todos los casos menores que las reportadas en la cinética control (Figura 19).

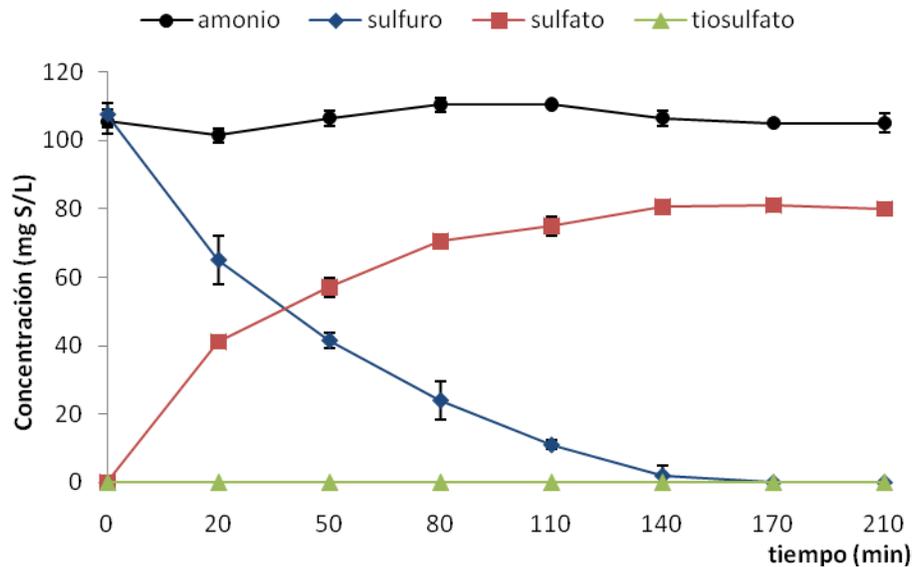
Los resultados muestran que tanto el proceso amonio y nitrito-oxidante se vio fuertemente inhibido en presencia de sulfuro a todas las concentraciones ensayadas, sin embargo, a  $13 \pm 0.7$  mg S-HS<sup>-</sup>/L el amonio se eliminó por completo después de 60 h de cultivo. Esto sugiere que en reactores en continuo es posible llevar a cabo la nitrificación en presencia de sulfuro a bajas concentraciones con alta eficiencia y rendimiento. Para evitar que la inhibición altere totalmente el proceso nitrificante en su eficiencia y rendimiento, se necesitaría controlar adecuadamente las concentraciones adicionadas en sulfuro y el TRH, y tomar en cuenta la concentración en lodo y su actividad metabólica entre otros parámetros.

Aunque se han propuesto diversos mecanismos que podrían ayudar a entender mejor el efecto negativo del sulfuro sobre la nitrificación, como son: el efecto quelante de metales divalentes logrando afectar el centro de cobre de la AMO (Hooper y Terry, 1973) o la inhibición acompetitiva sobre la AMO (McCarty, 1999), es necesario abundar más sobre el tema, ya que los estudios realizados hasta ahora no dan una conclusión satisfactoria de qué efecto tiene el sulfuro sobre el proceso respiratorio nitrificante.

## **VII.3 Oxidación del sulfuro en cultivos nitrificantes**

### **VII.3.1 Cinética abiótica**

Con la finalidad de evaluar la oxidación química del sulfuro bajo las condiciones experimentales utilizadas, se realizó una cinética con amonio y sin biomasa durante casi 4 h (Figura 20).



**Figura 20.** Perfiles de oxidación de sulfuro y amonio en ensayos abióticos.

La concentración de amonio se mantuvo constante a un valor de  $106.4 \pm 2.8$  mg N/L, indicando que el amonio no fue oxidado químicamente (Figura 20). Esto permite evidenciar que la oxidación del amonio obtenida en los ensayos realizados con lodo fue bioquímicamente llevado a cabo por los microorganismos del consorcio nitrificante.

Como se observa en la figura 20, antes de las 3 h, todo el sulfuro fue oxidado, teniendo como producto principal el sulfato. La velocidad de oxidación del sulfuro fue de  $38.0 \pm 2.1$  mg S-HS<sup>-</sup>/L.h. No se registró la formación de tiosulfato durante este periodo de tiempo. Además se observó un precipitado blanquecino, que se asume que corresponde a la formación de azufre elemental (S<sup>0</sup>). Su concentración fue deducida a partir del balance de azufre presentado a continuación:

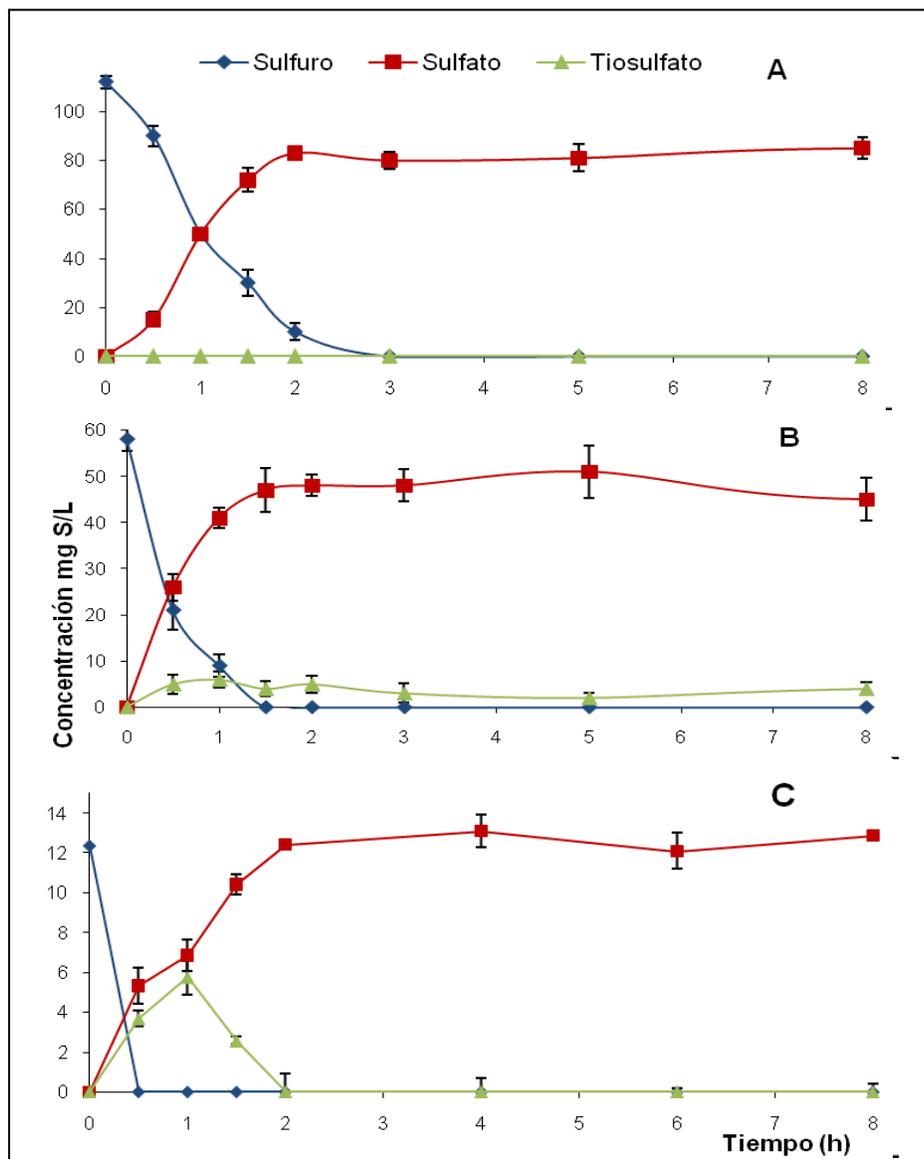
$$[\text{S-HS}^-]_i = [\text{S-HS}^-]_f + [\text{S-H}_2\text{S}]_f + [\text{S-SO}_4^{2-}]_f + [\text{S-S}_2\text{O}_3^{2-}]_f + [\text{S}^0]_f$$

$$[107.5 \pm 3.5 \text{ mg S-HS}^-/\text{L}]_i = [0 \text{ mg S-HS}^-/\text{L}]_f + [12.9 \pm 2.8 \text{ mg S-H}_2\text{S}/\text{L}]_f + [80 \pm 0 \text{ mg S-SO}_4^{2-}/\text{L}]_f + [0 \text{ mg S-S}_2\text{O}_3^{2-}/\text{L}]_f + [14.6 \text{ mg S}^0/\text{L}]_f$$

Los resultados mostraron que el sulfuro fue químicamente oxidado a sulfato ya que no hubo presencia de biomasa en los ensayos.

### VII.3.2 Oxidación del sulfuro en los cultivos nitrificantes

En la figura 21, se presentan los perfiles cinéticos de oxidación del sulfuro cuando fue adicionado a los cultivos nitrificantes a las tres concentraciones iniciales siguientes:  $112 \pm 2.5$  (A),  $58 \pm 2.5$  (B) y  $13 \pm 0.7$  mg S-HS<sup>-</sup>/L (C). En los tres casos, el sulfuro fue rápidamente oxidado en menos de 3 h. El producto principal fue el sulfato (Tabla 20). El azufre elemental y el tiosulfato fueron otros de los productos de la oxidación del sulfuro pero en cantidades menores.

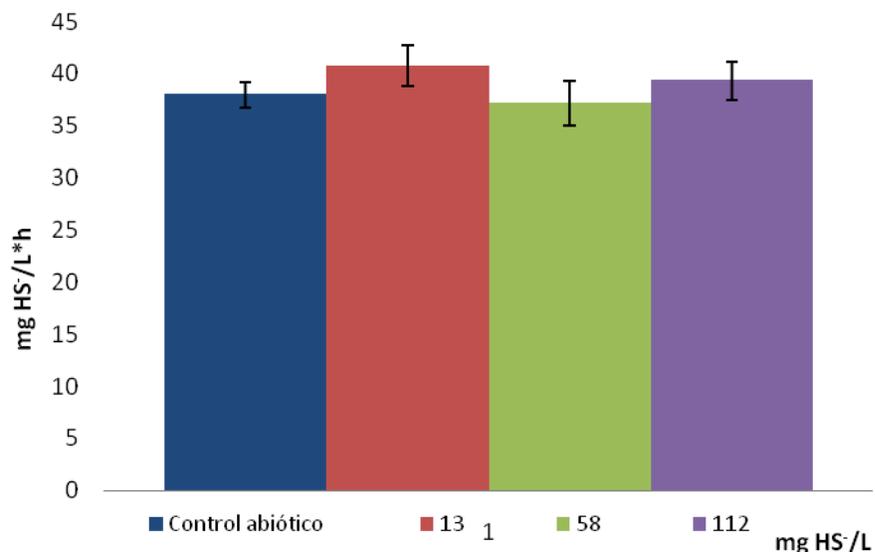


**Figura 21.** Perfiles de oxidación del sulfuro adicionado en los cultivos nitrificantes a las siguientes concentraciones:  $112 \pm 2.5$  (A),  $58 \pm 2.5$  (B) y  $13 \pm 0.7$  mg S-HS<sup>-</sup>/L (C).

**Tabla 20.** Balance de azufre a diferentes concentraciones iniciales de sulfuro adicionado a los cultivos nitrificantes.

$[\text{S-HS}^-]_i$ (mg S-HS <sup>-</sup> /L)	$[\text{S-HS}^-]_f$ (mg S-HS <sup>-</sup> /L)	$[\text{S-H}_2\text{S}]_f$ (mg S-H <sub>2</sub> S)	$[\text{S-SO}_4^{2-}]_f$ (mg S-SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> /L)	$[\text{S-S}_2\text{O}_3^{2-}]_f$ (mg S-S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> /L)	$[\text{S}^0]_f$ (mg S <sup>0</sup> /L)
112 ± 2.5	0	13.5	80 ± 1.8	0	18.5
58 ± 2.5	0	3	50 ± 2.9	5 ± 2.2	0
13.5 ± 0.7	0	0	12.8 ± 0.5	0	0

Los perfiles cinéticos obtenidos en los cultivos microbianos fueron parecidos a los del control abiótico, obteniéndose los mismos productos. En la figura 22, se comparan las velocidades de oxidación del sulfuro registradas a las diferentes concentraciones iniciales con la velocidad obtenida en el ensayo control abiótico.

**Figura 22** Velocidades de oxidación de sulfuro a diferentes concentraciones iniciales de exposición al cultivo nitrificante (13, 58 y 112 mg S-HS<sup>-</sup>/L).

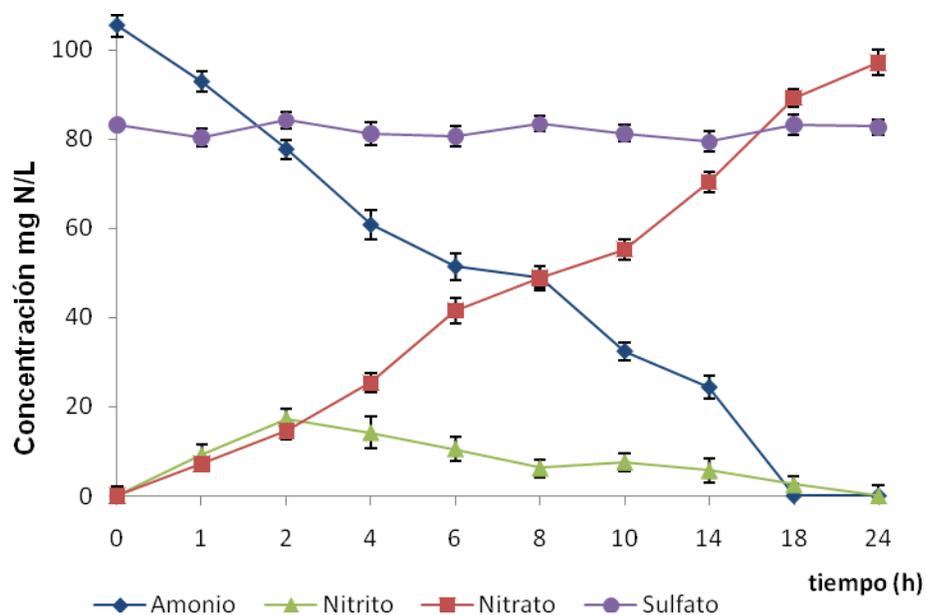
No se encontró una diferencia significativa entre las velocidades obtenidas en los cultivos con biomasa y el cultivo abiótico, indicando que aún en presencia del lodo nitrificante la oxidación del sulfuro se debió a una oxidación química.

Es relevante notar que aunque el sulfuro fue rápidamente eliminado de los cultivos, la actividad nitrificante del lodo siguió siendo altamente inhibida durante más de 60 h. Lo que

podiera sugerir que más que el sulfuro, fue el sulfato quien ocasionó un efecto inhibitorio en los cultivos nitrificantes.

#### VII.4 Efecto del sulfato sobre la nitrificación

Se evaluó el efecto del sulfato sobre la actividad de los cultivos nitrificantes, ya que fue el producto principal de la oxidación del sulfuro. Se realizó este ensayo para probar si el sulfato a una alta concentración fue el responsable de la inhibición del proceso respiratorio nitrificante. La Figura 23 presenta el perfil nitrificante en presencia de una concentración inicial de sulfato de  $83.2 \pm 2.6$  mg S-SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>/L, observando que la concentración de sulfato se mantuvo constante durante las 24 h que duró el ensayo.



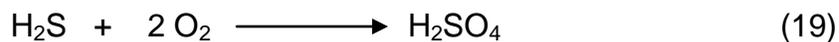
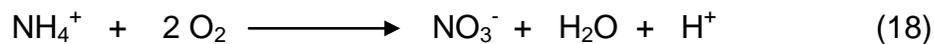
**Figura 23.** Perfil de consumo de amonio y producción de nitrito y nitrato en cultivos nitrificantes expuestos a  $83.2 \pm 2.6$  mg S-SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>/L.

Cabe destacar que el proceso respiratorio nitrificante se llevó a cabo eficientemente ( $E_{\text{NH}_4^+}$  cercana al 100%) y con un alto rendimiento de formación de nitrato ( $0.86 \pm 0.07$ ). La aparición de nitrito fue solamente transitoria. Las velocidades específicas de consumo de amonio y formación de nitrato fueron  $0.090 \pm 0.004$  y  $0.089 \pm 0.01$ , respectivamente. Estos

resultados fueron parecidos a los obtenidos en la cinética control nitrificante sin adición de sulfuro (Figura 13 y Tabla 18). Esto muestra que el sulfato no tuvo un efecto significativo adverso sobre el proceso. En consecuencia, el sulfato acumulado en los cultivos por la oxidación química del sulfuro no fue el responsable de la inhibición de la nitrificación.

### VII.5 Efecto del oxígeno sobre la nitrificación

Se calculó la cantidad teórica de oxígeno necesario para oxidar 100 mg de S-HS/L y 100 mg de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L. Mediante las ecuaciones 18 y 19 previamente balanceadas, se determinó que deberían estar disponibles 0.02 moles de O<sub>2</sub> para evitar la limitación de oxígeno durante los ensayos realizados.



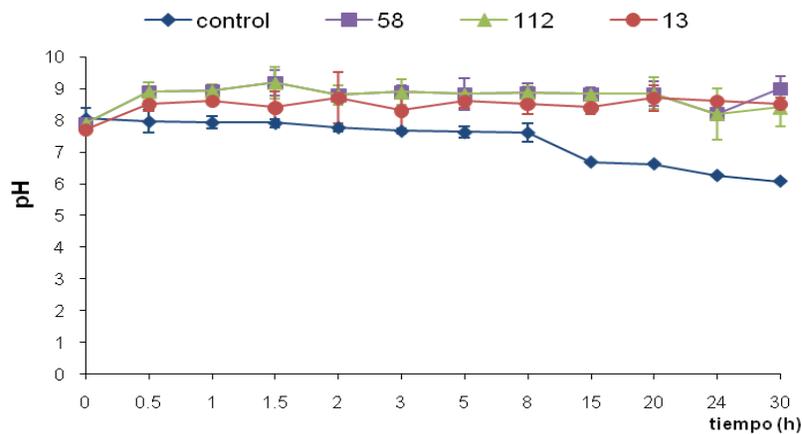
Haciendo uso de la ecuación de los gases (ecuación 20) y utilizando las condiciones experimentales establecidas (30°C, presión atmosférica de la ciudad de México), se calculó el volumen de espacio de cabeza que se debería dejar en las botellas para alcanzar el número de moles de O<sub>2</sub> necesario.

$$P V = n R T \dots\dots\dots (20)$$

Siendo P la presión, V el volumen, n el número de moles, R la constante universal de los gases ideales y T la temperatura en Kelvin, se determinó que dejando un volumen de 60 mL de espacio de cabeza en las botellas serológicas, el proceso nitrificante con 100 mg S-HS/L no debería de ser limitado en oxígeno. Ese fue el volumen de espacio de cabeza que se empleó en los frascos. Por lo que se puede decir que el efecto inhibitorio por la adición de sulfuro en los cultivos nitrificantes no fue debido a una limitación de oxígeno. Autores como Joye y col. (1995), Sears y col. (2004) y Erguder y col. (2008) mantuvieron constante la inyección de oxígeno en sus experimentos con sulfuro para evitar igualmente la limitación de O<sub>2</sub> y observaron de igual manera una disminución en las velocidades de la nitrificación.

### VII.5 Efecto del pH sobre la nitrificación

Durante los cultivos control nitrificantes y a diferentes concentraciones de sulfuro (13, 58 y 112 mg S-HS<sup>-</sup>/L), se dio seguimiento al valor del pH (Figura 24). El resultado fue que la adición de sulfuro en el medio provocó un aumento en el valor del pH a un valor promedio de  $8.6 \pm 0.3$ . Se ha reportado previamente que a ese valor de pH, se puede llevar a cabo el proceso respiratorio nitrificante satisfactoriamente (Tang y col., 2009). En consecuencia, parece claro que el cambio en el valor del pH por la adición del sulfuro tampoco fue la causa por la que se vio afectado el proceso.



**Figura 24.** Perfil de pH durante la cinética control sin sulfuro y con sulfuro adicionado a  $13 \pm 0.7$ ,  $58 \pm 2.5$  y  $113 \pm 2.5$  mg S-HS<sup>-</sup>/L.

## VIII. – CONCLUSIONES

- La adición de sulfuro ( $13 \pm 0.7$ ,  $58 \pm 2.5$  y  $112 \pm 2.5$  mg S-SH/L) provocó un efecto inhibitorio sobre el proceso respiratorio nitrificante, ya que se observó una disminución en las velocidades específicas de consumo de amonio y formación de nitrato entre 70 y 97%.
- La adición de sulfuro afectó la ruta metabólica nitrificante ya que se acumuló nitrito y disminuyó el rendimiento de nitrato.
- A  $13 \pm 0.7$  mg S/L, la eficiencia se mantuvo de 100%, mostrando que es posible eliminar totalmente el amonio por nitrificación en cultivos alimentados a bajas concentraciones de sulfuro, aunque se acumula nitrito.
- En los cultivos nitrificantes, el sulfuro se oxidó a sulfato por oxidación química.
- El efecto negativo sobre el proceso respiratorio nitrificante no se debió a la acumulación de sulfato en el medio, a una limitación de oxígeno, ni al aumento en el valor de pH.

**IX. – BIBLIOGRAFÍA**

1. Alcántara, S. (2000). Estudio de la oxidación biológica de los compuestos reducidos de azufre utilizando un consorcio de microorganismos sulfooxidantes. Evaluación de los parámetros que determinan la oxidación parcial del tiosulfato en azufre elemental. Tesis Doctoral. *Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa*, México.
2. Altas, L. and Buyukgungor, H. (2008). Sulfide removal in petroleum refinery wastewater by chemical precipitation. *J. Hazard. Mater.* 153: 462–469.
3. Ahn, Y.H. and Kim, H.C. (2004). Nutrient removal and microbial granulation in an anaerobic process treating inorganic and organic nitrogenous wastewater *Water Sci. Technol.* 50(6): 207–215.
4. Anderson, D.M., Glibert, P.M. and Burkholder, J.M. (2002). Harmful algal blooms and eutrophication: nutrient sources, composition, and consequences. *Estuaries* 25: 704-726.
5. Annachhatre, A.P. and Suktrakoolvait, S. (2001). Biological Sulfate Reduction Using Molasses as a Carbon Source. *Water Environment Research.* 73: 118-126.
6. Anthonisen, A.C., Loehr, R.C., Prakasam, T.B.S. and Srinath, E.G. (1976). Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *J. Water Pollut. Control Fed.* 48(5): 835–852.
7. Bailey, J.E. and Ollis, D.F. (1986). *Biochemical Engineering Fundamentals*. Second Edition. McGraw-Hill Internationals Editions. Singapore. 55.
8. Baker, L.A., Herlihy, A.T., Kaufmann, P.R. and Eilers, J.M. (1991). Acidic lakes and streams in the role of acidic deposition. *Science* 252: 1151-1154.
9. Barrenstein, A., Kramer, U. and Obermann, P. (1986). Underground treatment of nitrate rich groundwater by infiltration with treated wastewater or methane rich natural gas. DVGWSchriftreihe, *Wasser. Frankfurt, Germany.* 116: 99-116.
10. Becker, M.; Martienssen, M.; Fuhrmann, B. and Spohn, U. (1997). Analyzing nitrogen and sulphide elimination from leachate by coulometric continuous flow titration. *ACTA Biotechnol.* 17(1): 39–50.
11. Bentzen, G.; Smith, A. T.; Bennett, D.; Webster, N. J.; Reinholt, F.; Sletholt, E. and Hobson, J. (1995). Controlled dosing of nitrate for prevention of H<sub>2</sub>S in a sewer network and the effects on the subsequent treatment processes. *Water Sci. Technol.* 31(7): 293–302.

12. Bernet, N., Peng, D., Delgene`s, J.P. and Moletta, R. (2000). Nitrification at low oxygen concentration in biofilm reactor. *J. Environ. Eng.-ASCE* 127(3): 266–271.
13. 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.
14. Bock, E., Koops, H.P., Harms, H. and Ahlers, B. (1991). The biochemistry of nitrifying microorganisms. *Variations in Autotrophic Life*. Editorial Academic press. Londres. 171-200.
15. Brüser, T., Lens P., Trüper, H.G. (2000). The biological sulfur cycle. En: *Environmental Technologies to Treat Sulfur Pollution-Principles and Engineering*. Lens, P.N.L. y Hulshoff Pol, L. (Ed.). *International Water Association Publishing Company. Londres*. 47-85.
16. Camargo, J.A y A. Alonso. (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.
17. Camilla, G.; Lena, G. and Gunnel, D. (1998). Comparison of inhibition assays using nitrogen removing bacteria: application to industrial wastewater. *Wat. Res.* 32(10): 2995-3000.
18. Cervantes-Carrillo, F., Pérez, J. y Gómez, J. (2000). Avances en la eliminación biológica de nitrógeno de las aguas residuales. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 42: 73-82.
19. Cork, J., Jerger, D. and Maka, A. (1986). Biocatalytic production of sulfur from process waste streams. *Biotechnol. Bioenerg. Symp. Ser.* 16: 149-162.
20. Cuervo-López, F., Martínez Hernández, S., Texier, A.-C. and Gómez, J. (2009). Principles of denitrifying processes. In: *Environmental Technologies to Treat Nitrogen Pollution*, Ed. F. J. Cervantes, IWA Publishing, London, UK, Chapter 3, pp. 41-65.
21. De Boer, W. and Kowalchuk, G.A. (2001). Nitrification in acid soils: micro-organisms and mechanisms. *Soil Biol. Biochem.* 33: 853–866.
22. Erguder, T., Nicoboorn, Siegfriede E., Vlaeminck and Willy Verstrate. (2008). Partial Nitrification Achieved by Pulse Sulfide Doses in a Sequential Batch Reactor. *Environ. Sci. Technol.* 42: 8715–8720.

23. Æsøy, A., Odegaard, H. and Bentzen, G. (1998). The effect of sulphide and organic matter on the nitrification activity in a biofilm process. *Water Sci. Technol.* 37(1): 115–122.
24. Fwetrell, L. (2004). Drinking-water nitrate, methemoglobinemia, and gobal burden of disease: a discussion. *Environ. Health Perspect.* 112: 1371-1374.
25. Genschow, E., Hegemann, W. and Maschke, C. (1996). Biological sulfate removal from tannery wastewater in a two-stage anaerobic treatment. *Water Res.* 30: 2072–2078.
26. Ghafari, S., Hasan, M. and Aroua, M.K. (2008). Bio-electrochemical removal of nitrate from water and wastewater-A review. *Biores. Technol.* 99: 3965–3974.
27. Gieseke, A., Tarre, S., Green, M. and de Beer, D. (2006). Nitrification in a biofilm at low pH values: Role of in situ microenvironments and acid tolerance. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 4283–4292.
28. Glass, C. and Silverstein, J. (1999). Denitrification of high-nitrate, high-salinity wastewater. *Water Res.* 33: 223–229.
29. Gómez, J., Lema, J.M. y Méndez, J.R. (1995). La nitrificación biológica con cultivos axénicos o lodos activados. *CIENCIA* 46: 507-523.
30. Gupta, S.K. and Sharma, R. (1996). Biological oxidation of high strength nitrogenous wastewater. *Water Res.* 30: 593–600.
31. Hallam, S.J., Konstantinidis, K.T., Putnam, N., Schleper, C., Watanabe, Y.-I., Sugahara, J., Preston, C., De La Torre, J., Richardson, P.M. and DeLong, E.F. (2006a). Genomic analysis of the uncultivated marine crenarchaeote *Cenarchaeum symbiosum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 18296–18301.
32. Hallam, S.J., Mincer, T.J., Schleper, C., Preston, C.M., Roberts, K., Richardson, P.M. and DeLong, E.F. (2006b). Pathways of carbón assimilation and ammonia oxidation suggested by environmental genomic analyses of marine Crenarchaeota. *PLoS Biol.* 4: 520–536.
33. Hao, J., Chen, M., Huang, L. and Buglass, L. (1996). Sulfate-reducing bacteria. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 26: 155-187.
34. Harper, D. (1992). Eutrophication of freshwaters: principles, problems and restoration. First edition. Ed: CHAPMAN & HALL. 5-16,31 London.
35. Henze, M. (2002). Basic biological processes. In *Wastewater treatment – Biological and Chemical Processes*. Springer. 65–129.

36. Holt, J., Krieg, N., Sneath, P., Staley, J. and Williams, S. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Novena edición. William & Hensyl. 436, 451.
37. Hooper, A.B. and Terry, K.R. (1977). Hydroxylamine oxidoreductase from *Nitrosomonas*: Inactivation by hydrogen peroxide. *Biochemistry* 16(3): 455-459.
38. Horner-Devine, M.C. and Martiny, A.C., (2008). Biogeochemistry: news about nitrogen. *Science* 320: 757–758.
39. Janssen, A (1996). Formation and colloidal behavior of elemental sulphur produced from biological oxidation of hydrogenosulfide. PhD thesis, Wageningen, The Netherlands.
40. Janssen, A., Ma, C., Lens, P. and Lettinga, G. (1997). Performance of a sulphide oxidizing expanded bed reactor with a spatially separated aeration unit. *Biotechnol. Bioeng.* 53: 32-40.
41. Jayamohan, S., Ohgaki, S. and Hanaki, K. (1988). Effect of DO on kinetics of nitrification. *Water Supply.* 6: 141–150.
42. Jensen, A.B. and Webb, C. (1995). Treatment of H<sub>2</sub>S-containing gases: A review of microbiological alternatives. Review. *Enzyme and Microbial Technology* 17: 2-10.
43. Jeworski, M. and E Heinzle. (2000). Combined chemical-biological treatment of wastewater containing refractory pollutants. *Biotechnology annual review* 6: 163-96.
44. Joo, H-S, Jirai, M. and Shoda, M. (2006). Piggery wastewater treatment using *Alcaligenes feacalis* strain No. 4 with heterotrophic nitrification and aerobic denitrification. *Water Res.* 40: 3029–3036.
45. Joye, S. B. and Hollibaugh, J. T. (1995). Influence of sulfide inhibition of nitrification on nitrogen regeneration in sediments. *Science* 270(5236): 623–625.
46. Juliette, L., Hyman, M. and Arp, D. (1993). Inhibition of Ammonia Oxidation in *Nitrosomonas europaea* by Sulfur Compounds: Thioethers are Oxidized to Sulfoxides by Ammonia Monooxygenase. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 3718 - 3727.
47. Kanyarat, S. and Chaiprapat, S. (2008). Effects of pH adjustment by parawood ash and effluent recycle ratio on the performance of anaerobic baffled reactors treating high sulfate wastewater. *Biores. Technol.* 99: 8987–8994.
48. Könneke, M., Bernhard, A.E., de la Torre, J.R., Walker, C.B., Waterbury, J.B., Stahl, D.A. (2005). Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* 437: 543–546.

49. Kowalchuk, G.A. and Stephen, J.R. (2001). Ammonia-oxidizing bacteria: A model for molecular microbial ecology. *Ann. Rev. Microbiol.* 55: 485–529.
50. Laanbroek, H.J. and Gerards, S. (1993). Competition for limiting amounts of oxygen between *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter winogradskyi* grown in mixed continuous cultures. *Arch. Microbiol.* 159: 453–459.
51. Lenntech. Agua residual & purificación del aire Holding BV. (2000). Holanda. <http://www.lenntech.com/espanol/Por-que-es-importante-el-oxigeno-disuelto-en-el-agua.htm>.
52. Lens, P. and Kuenen, J. (2001). The biological sulfur cycle: novel opportunities for environmental biotechnology. *Wat. Sci. Technol.* 44(8): 57-66.
53. Lens, P.N.L., Visser, A., Janssen, A.J.H., Hulshoff Pol, L.W. and Lettinga, G. (1998). Biotechnological treatment of sulfate-rich wastewaters. *Crit. Rev. Env. Sci. Tech.* 28: 41–88.
54. Lowry, O.H., Rosen Brough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
55. Lyles, C. Boopathy, R., Fontenot, Q. and Kilgen, M. (2008). Biological treatment of shrimp aquaculture wastewater using SBR. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 151: 474–479.
56. Madigan, M., Martinko, J., y Parker, J. (1999). Cap. 13. Diversidad metabólica de los microorganismos y Cap. 16. Diversidad procariótica: Dominio bacteria. En: *Brock Biología de los microorganismos*. Décima edición. Prentice Hall, Iberia. 473-531, 636-664.
57. Madigan, M., Martinko, J. y Parker, J. (2003). Brock Microbiología de los Microorganismos. 20ª edición. Editorial Pearson Prentice Hall. Madrid. 359-360.
58. Manahan, SE. (1992). Toxicological chemistry, 2nd edition. Lewis Publishers, Boca Raton (FL).
59. Martienssen, M., Schulze, R. and Simon, J. (1995). Capacities and limits of three different technologies for the biological treatment of leachate from solid waste landfill sites. *ACTA Biotechnol.* 15(3): 269–276.
60. McCartney, D.M. and J.A. Oleszkiewicz. (1991). Sulfide inhibition of anaerobic degradation of lactate and acetate. *Water Res.* 25: 203–209.
61. McCarty, G.W. (1999). Modes of action of nitrification inhibitors. *Biol. Fertil. Soils* 29: 1–9.

62. Mével, G. and Prieur, D. (2000). Heterotrophic nitrification by a thermophilic *Bacillus* species as influenced by different cultures conditions. *Can. J. Microbiol.* 46: 465- 473.
63. Mijatovic, S.L.I., Cerjan-Stefanovic, S. and Hodzic, E. (2000). Nitrogen removal from fertilizer wastewater by ion exchange. *Water Res.* 34: 185–190.
64. Nagpal, S., Chuichulcherm, S., Livingston, A. and Peeva, L. (2000). Ethanol utilization by sulfate-reducing bacteria: an experimental and modeling study. *Biotechnol. Bioeng.* 70: 533–543.
65. Neculita, C.M., Zagury, G.J. and Bussiere, B. (2007). Passive treatment of acid mine drainage in bioreactors using sulfate-reducing bacteria: critical review and research needs. *J. Environ. Qual.* 36: 1–16.
66. Nery, V.D., de Nardi, I.R., Damianovic, M.H.R.Z., Pozzi, E., Amorim, A.K.B. and Zaiat, M. (2007). Long-term operating performance of a poultry slaughter house wastewater treatment plant. *Res. Con. Recycl.* 50: 102–114.
67. O’Flaherty, V. and Colleran, E. (1998). Effect of sulphate addition on volatile fatty acid and ethanol degradation in an anaerobic hybrid reactor. I: Process disturbance and remediation. *Bioresour. Technol.* 68: 101–107.
68. Okabe, S., Nielsen, P.H. and Characklis, W.G. (1992). Factors affecting microbial sulfate reduction by *Desulfovibrio desulfuricans* in continuous culture: limiting nutrients and sulfide concentration, *Biotechnol. Bioeng.* 40: 725–734.
69. Olmos, A, Olguin, P., Fajardo, C., Razo E. and Monroy, O. (2004). Physicochemical Characterization of Spent Caustic from the OXIMER Process and Sour Waters from Mexican Oil Refineries. *Energy & Fuels* 18: 302 – 304.
70. Painter, H.A. (1970). A review of literature on inorganic nitrogen metabolism in microorganisms. *Wat. Res.* 4: 393-450.
71. Papen, H., von Berg, R., Hinkel, I., Thoene, B. and Rennenberg, H. (1989). Heterotrophic nitrification by *Alcaligenes faecalis*:  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{N}_2\text{O}$  and  $\text{NO}$  production in exponentially growing cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 55(8): 2068-2072.
72. Percheron, G., Bernet, N. and Moletta, R. (1997). Start-up of anaerobic digestion of sulfate wastewater. *Biores. Technol.* 61: 21–27.
73. Postgate, J.R, (1984). The Sulphate Reducing Bacteria, 2nd ed., *University Press, Cambridge*.
74. Prosser, J.I. (1989). *Adv. Microbial Physiology* 30: 125-181.

75. Rattanapan, C., Boonsawang, P. and Kantachote, D. (2009). Removal of H<sub>2</sub>S in down-flow GAC biofiltration using sulfide oxidizing bacteria from concentrated latex wastewater. *Biores. Technol.* 100: 125–130.
76. Reis, M.A.M., Almeida, J.S., Lemos, P.C. and Carrondo, M.J.T. (1992). Effect of hydrogen sulphide on growth of sulphate reducing bacteria. *Biotechnol. Bioeng.* 40(5): 593–600.
77. Revah, S., Acosta, M., Hugler, W., Trinidad, R., Avila, C., Estrada, I. and Hinojosa, A. (1995). Air Biodesulfuration from Viscose Plants: Carbon Disulfide Elimination, Conference on Biofiltración (an Air pollution Control Technology), Los Angeles, California. 5-6.
78. Robertson, L., VAN, Niel E., Torremans, R. and Kuenen. J.G. (1988). Simultaneous nitrification and desnitrification in aerobic chemostat cultures pf *Thiosphaera pantrotropha*. *Appl. Environ. Microbio.* 54(11): 2812-2818.
79. Robertson, L. and Kuenen, J. (1992). The colorless sulfur bacteria. In: *The prokariotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications.* (Barlows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Schliefer, H.K., eds.) Segunda edición. *Springer Verlag, New York.* 1: 385-413.
80. 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.
81. Sears, K., Alleman, J.E., Barnard, J.L. And Oleszkiewicz, J.A. (2004). Impacts of reduced Sulfur components on active and resting ammonia oxidizers. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 31: 369 – 378.
82. Sekoulov, I. and Brinke-Seiferth, S. (1999). Application of biofiltration in the crude oil processing industry. *Water Sci. Technol.* 39: 71–76.
83. Silva, A.J., Varesche, M.B., Foresti, E. and Zaiat, M. (2002). Sulphate removal from industrial wastewater using a packed-bed anaerobic reactor. *Process Biochem.* 37: 927–935.
84. Smith, R.V., Doyle, R.M., Burns, L.C. and Stevens, R.J. (1997). A model for nitrite accumulation in soils. *Soil Biol. Chem.* 8(29): 1241-1247.
85. Speece, R.E. (1983). Anaerobic biotechnology of industrial wastewaters, *Environ. Sci. Technol.* 17: 416A–427A.

86. Steudel, R. (2000). The chemical sulfur cycle. In: *Environmental Technologies to Treat Sulfur Pollution-Principles and Engineering*. Lens, P.N.L. y Hulshoff Pol, L. (Ed.). *International Water Association. Londres*. 1-31
87. Sublette, K., Kolhatkar, R. and Raterman, K. (1998). Technological aspects of the microbial treatment of sulfide-rich wastewaters: A case study. *Biodegradation* 9: 259-271.
88. Suzuki, I. (1999). Oxidation of inorganic sulfur compounds: Chemical and enzymatic reactions. *Can. J. Microbiol.* 45: 97-105.
89. Tait, S., Clarke, W.P., Keller, J. and Batstone, D.J. (2009). Removal of sulfate from high-strength wastewater by crystallization. *Water Res.* 43(3):762-72
90. Tandukar, M., Pavlostathis S.G., and Cervantes, F.J. (2009). Autotrophic denitrification for the removal of nitrogenous and sulphurous contaminants from wastewaters. In: *Environmental Technologies to Treat Nitrogen Pollution*, Ed. F. J. Cervantes, IWA Publishing, London, UK, Chapter 12, pp. 319-371.
91. Tang, B., Liu Ye, Peng C., Wang, S., Zhao, K. and Peng, Y. (2009). Determination effect of influent salinity and inhibition time on partial nitrification in a sequencing batch reactor treating saline sewage. *Water Environment.* 246: 556 – 566.
92. Tarre, S. and Green, M. (2004). High-rate nitrification at low pH in suspended- and attached-biomass reactors. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 6481–6487.
93. Visser, A., Hulshoff, L.W. and Lettinga, P. G. (1996). Competition of methanogenic and sulfidogenic bacteria. *Water Sci. Technol.* 33: 99–110.
94. Wang, A.-J., Du, D.-Z., Ren, N.-Q. and Van Groenestijn, J.W. (2005a). An innovative process of simultaneous desulfurization and denitrification by *Thiobacillus denitrificans*. *J. Environ. Sci. Health* 40: 1939–1949.
95. Wetzel, R.G. (2001). *Limnology*, 3rd edition. Academic Press, New York, WHO. 1996. Guidelines for drinking-water quality: health criteria and other supporting information. World Health Organization Geneva.
96. Yetilmezsoy, K. and Sakar, S. (2008). Improvement of COD and color removal from UASB treated poultry manure wastewater using Fenton's oxidation. *J. Hazard. Mater.* 151: 547–558.

Iztapalapa, D.F. a 21 de Enero de 2010

El H. Jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa aprobó la tesis

**EFFECTO INHIBITORIO DEL SULFURO SOBRE UN PROCESO RESPIRATORIO  
NITRIFICANTE**

**Que presentó**

I.B.I. Diego Ivan Bejarano Ortiz

**Comité tutorial**

Dra. Anne-Claire Texier  
Directora, UAM-Iztapalapa

*Texier.*

Dra. Flor de María Cuervo López  
Asesora, UAM-Iztapalapa

Dra. Edna Rosalba Meza Escalante  
Asesora, Instituto Tecnológico de Sonora

**H. Jurado**

**Presidenta:** Dra. Florina Ramírez Vives  
UAM-Iztapalapa

  
\_\_\_\_\_

**Secretaria:** Dra. Flor de María Cuervo López  
UAM-Iztapalapa

  
\_\_\_\_\_

**Vocal:** Dra. Edna Rosalba Meza Escalante  
Instituto Tecnológico de Sonora

*Edna R. Meza E.*  
\_\_\_\_\_

**Vocal:** Dr. Francisco J. Cervantes Carrillo  
IPICyT

  
\_\_\_\_\_