



UNIVERSIDAD  
AUTÓNOMA  
METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA  
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
Y DE LA SALUD

Departamento de Biotecnología

EFFECTO INHIBITORIO DEL SULFURO SOBRE LOS PROCESOS AMONIO Y  
NITRITO OXIDANTES DE LA NITRIFICACIÓN

TESIS  
PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

M. en B. DIEGO IVAN BEJARANO ORTIZ

DIRECTORA

Dra. Anne-Claire Texier

México, D.F

Mayo 2015

Esta tesis se llevó a cabo en el Laboratorio de Fisiología Microbiana W-004 del Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa. Se recibió el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca 211547 y el proyecto SEP-Conacyt-CB-2011-01-165174.

“El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad Nivel Internacional del CONACyT”.

Iztapalapa, D.F. a 27 de Mayo de 2015

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

**Efecto inhibitorio del sulfuro sobre los procesos amonio y nitrito oxidantes  
de la nitrificación**

**Que presentó**

M. en B. Diego Ivan Bejarano Ortiz

**Comité tutorial**

Dra. Anne-Claire Texier  
Directora, UAM-Iztapalapa

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

Dr. Frédéric Thalasso  
Asesor, CINVESTAV-IPN

**H. Jurado**

**Presidente:** Dr. Frédéric Thalasso Siret  
CINVESTAV-IPN

\_\_\_\_\_

**Secretario:** Dr. Sergio Huerta Ochoa  
UAM-Iztapalapa

\_\_\_\_\_

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

\_\_\_\_\_

**Vocal:** Dr. Carlos David Silva Luna  
UAM-Lerma

\_\_\_\_\_

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo de Tesis realizado en la Universidad Autónoma Metropolitana es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron distintas personas opinando, corrigiendo, teniéndome paciencia, dándome ánimo, acompañándome en los momentos difíciles y en los momentos de felicidad.

En primer lugar, a mi directora de Tesis, Dra. Anne-Claire Texier, mi más amplio agradecimiento por haberme confiado este trabajo, por su paciencia ante mi inconsistencia, por su valiosa dirección y apoyo. Gracias por compartir conmigo su experiencia, conocimientos, pero sobre todo por su gran dedicación, que gracias a todo esto pude lograr un sueño en mi vida. Siempre estaré agradecido contigo.

Al Dr. Jorge Gómez, un especial agradecimiento, primero por haberme recibido en su grupo de investigación. Segundo, por sus consejos y su experiencia que cada seminario compartió conmigo.

De igual manera mi más sincero agradecimiento a mis Asesores, Dra. Flor Cuervo por su colaboración, paciencia, apoyo brindado desde siempre y sobre todo por escucharme y aconsejarme siempre. Al Dr. Frédéric Thalasso, por brindarme su ayuda cuando la necesite, por estar siempre disponible y por dedicarle tiempo al análisis de los resultados de la tesis, compartir sus conocimientos conmigo. Al Dr. Sergio Huerta por su gran ayuda y estar siempre dispuesto a apoyarme y por su enorme aportación a esta tesis. Siempre estaré muy agradecido con ustedes.

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, Emmanuel, Karina, Alejandro, Jaqueline, Antonio, Gehovana, Ricardo, Felipe, gracias por su amistad y el buen ambiente de trabajo.

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

Y de manera especial a un ser maravilloso que siempre creyó en mí y que está conmigo apoyándome incondicionalmente en todo momento y esa persona es mi querida y amada esposa Consuelo Gómez.

## ***Dedicatorias:***

### ***A Dios.***

*Por permitirme llegar a este momento tan especial en mi vida.  
Por los triunfos y los momentos difíciles que me han  
enseñado a valorarte cada día más.*

### ***A mis padres***

*Por haberme enseñado a nunca rendirme ante nada y  
siempre perseverar a través de sus sabios consejos.*

### ***A mis hermanos***

*Que con sus consejos y su apoyo me han ayudado  
a afrontar los retos que se me han presentado a lo  
largo de mi vida.*

### ***A Chelo***

*Amor de mi vida, que has sido fiel amiga y compañera  
que me has ayudado a continuar, haciéndome vivir  
los mejores momentos de mi vida. Gracias por tu cariño  
y comprensión, porque sé que siempre contaré contigo.*

### ***A mi Familia***

*Gracias a todos, por su apoyo, consejos y poder contar  
siempre con ustedes, gracias por impulsarme a lograr  
mis sueños y metas, pero sobre todo por creer en mí.*

*El experimentador  
que no sabe lo que está buscando,  
no comprenderá lo que encuentra.*  
Claude Bernard (1813-1878)

# ÍNDICES

---

---

## Índice

<b>Resumen</b> .....	2
<b>Abstract</b> .....	5
<b>I. Introducción</b> .....	8
I.1 Contaminación del agua.....	10
I.1.1 Efectos de los compuestos nitrogenados y azufrados sobre el ambiente.....	14
I.1.2 Efectos de los compuestos nitrogenados y azufrados sobre la salud humana...	15
I.1.3 Efluentes industriales con amonio y sulfuro.....	17
I.2 Eliminación biológica del amonio.....	22
I.2.1 Desnitrificación.....	22
I.2.2 Nitrificación.....	23
I.2.2.1 Microbiología de la nitrificación.....	24
I.2.2.2 Bioquímica de la nitrificación.....	24
I.2.2.2.a Amonio oxidación.....	24
I.2.2.2.b Nitrito oxidación.....	27
I.2.2.3 Condiciones ambientales que afectan a la nitrificación.....	28
I.2.2.3.a Efecto de la temperatura sobre la nitrificación.....	29
I.2.2.3.b Efecto del pH sobre la nitrificación.....	30
I.2.2.3.c Efecto de la concentración de oxígeno sobre la nitrificación....	31
I.2.2.3.d Efecto de la concentración en sustrato sobre la nitrificación....	31
I.2.3 Inhibición de la nitrificación.....	34
I.2.3.1 Inhibición enzimática.....	35
I.2.3.2 Efecto de compuestos inhibidores sobre la nitrificación.....	39
I.2.3.3 Compuestos azufrados inhibidores de la nitrificación.....	41
I.2.3.4 Inhibición de la nitrificación por sulfuro.....	43
I.3 Reactor de lotes secuenciados.....	49
I.3.1 Descripción del sistema SBR.....	50
I.3.2 Reactores SBR nitrificantes.....	52
Bibliografía.....	54
<b>II. Justificación</b> .....	70
<b>III. Hipótesis</b> .....	72
<b>IV. Objetivos</b> .....	74
IV.1 Objetivo general.....	74
IV.2 Objetivos particulares.....	74
<b>V. Materiales y Métodos</b> .....	76
V.1 Variables de respuesta.....	76
V.1.1 Variables de respuesta para evaluar el comportamiento fisiológico de la biomasa nitrificante.....	76
V.1.1.1 Eficiencia de consumo de sustrato.....	76
V.1.1.2 Rendimiento de formación de producto.....	77
V.1.2 Variables de respuesta para evaluar el comportamiento cinético de la biomasa nitrificante.....	77
V.1.2.1 Velocidad volumétrica.....	78
V.1.2.2 Velocidad específica.....	79
V.1.3 Balance de materia de la nitrificación.....	80
V.1.3.1 Balance de materia en el reactor en continuo.....	80
V.1.3.2 Balance de materia en cultivos en lote y reactor SBR.....	81
V.1.4 Evaluación de la oxidación de sulfuro bajo condiciones nitrificantes....	81



V.2	Reactor nitrificante en continuo.....	81
V.3	Cultivos en lote con biomasa nitrificante.....	83
V.3.1	Ensayos para determinar el efecto del sulfuro sobre el lodo nitrificante a diferentes concentraciones iniciales .....	83
V.3.2	Ensayos para determinar el efecto del sulfuro sobre las constantes cinéticas de los procesos amonio y nitrito oxidantes.....	84
V.4	Reactor de lotes secuenciados con biomasa nitrificante.....	87
V.5	Métodos analíticos.....	89
V.5.1	Cuantificación de amonio.....	90
V.5.2	Cuantificación de nitrito y nitrato.....	91
V.5.3	Cuantificación de sulfuro.....	91
V.5.4	Cuantificación de sulfato y tiosulfato.....	92
V.5.5	Medición de proteína microbiana.....	93
	Bibliografía.....	95
<b>VI.</b>	<b>Resultados y Discusión.....</b>	<b>99</b>
VI.1.	Reactor nitrificante en continuo.....	99
VI.2	Efecto del sulfuro sobre el proceso respiratorio nitrificante.....	102
VI.2.1	Ensayo control abiótico.....	102
VI.2.2	Ensayo control con biomasa esterilizada.....	104
VI.2.3	Cinética nitrificante con sulfuro.....	105
VI.2.4	Oxidación del sulfuro en cultivos nitrificantes.....	109
VI.2.5	Efecto del sulfato, pH y oxígeno sobre la nitrificación.....	113
VI.2.6	Constantes cinéticas de los procesos amonio y nitrito oxidantes sin y con sulfuro como inhibidor.....	115
VI.2.6.1	Cultivo control amonio oxidante.....	116
VI.2.6.2	Cultivo control nitrito oxidante.....	117
VI.2.6.3	Constantes cinéticas de la nitrificación sin sulfuro.....	118
VI.2.6.4	Constantes cinéticas de la nitrificación en presencia de sulfuro.....	120
VI.2.7	Simulación del comportamiento de un lodo nitrificante en un reactor en continuo alimentado con amonio y sulfuro.....	127
VI.3	Reactor SBR.....	130
VI.3.1	Pruebas abióticas en el reactor SBR.....	130
VI.3.2	Ensayos cinéticos con biomasa estéril en el SBR.....	132
VI.3.3	Cinética nitrificante en el SBR.....	133
VI.3.4	Efecto del sulfuro sobre el proceso nitrificante en el reactor SBR.....	134
VI.3.5	Oxidación del sulfuro en el reactor SBR nitrificante.....	142
	Bibliografía.....	145
<b>VII.</b>	<b>Conclusiones y perspectivas.....</b>	<b>152</b>
<b>VIII.</b>	<b>Artículos científicos productos de la tesis doctoral.....</b>	<b>155</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Ciclo global del nitrógeno.....	11
<b>Figura 2.</b> Procesos biológicos y antropogénicos involucrados en el ciclo del nitrógeno.....	12
<b>Figura 3.</b> Ciclo global del azufre.....	12
<b>Figura 4.</b> Efectos de actividades humanas sobre el ciclo del azufre.....	14
<b>Figura 5.</b> Posible configuración de un tren de tratamiento de aguas residuales con amonio y sulfato.....	19
<b>Figura 6.</b> Ruta desnitrificante.....	22
<b>Figura 7.</b> Esquema de la oxidación de amonio a nitrito.....	25
<b>Figura 8.</b> Esquema de la oxidación de nitrito a nitrato.....	28
<b>Figura 9.</b> Esquema del reactor de lotes secuenciados.....	50
<b>Figura 10.</b> Esquema del reactor en continuo.....	82
<b>Figura 11.</b> Esquema del reactor de lotes secuenciados.....	87
<b>Figura 12.</b> Curva de calibración para la cuantificación de amonio.....	90
<b>Figura 13.</b> Curva de calibración para la cuantificación de nitrito y nitrato.....	91
<b>Figura 14.</b> Curva de calibración para la cuantificación de sulfuro.....	92
<b>Figura 15.</b> Curva de calibración para la cuantificación de sulfato y tiosulfato.....	93
<b>Figura 16.</b> Curva de calibración para la cuantificación de proteína microbiana.....	94
<b>Figura 17.</b> Perfil del reactor nitrificante en continuo: $Q_{eNH_4^+}$ (◆); $Q_{SNO_3^-}$ (□); $Q_{SNO_2^-}$ (▲) y $Q_{SNH_4^+}$ (○).....	99
<b>Figura 18.</b> Perfiles de oxidación de amonio (◆), sulfuro (○) y formación de sulfato (□) y tiosulfato (▲) en ensayos abióticos.....	102
<b>Figura 19.</b> Perfiles de concentración de sulfuro (○) y amonio (◆) utilizando biomasa esterilizada en ausencia de oxígeno.....	104
<b>Figura 20.</b> Perfil cinético de consumo de amonio (a), acumulación de nitrito (b) y formación de nitrato (c) a diferentes concentraciones iniciales de sulfuro (mg S/L): 0 (◆), 3.1 (□), 6.4 (▲), 13.5 (○), 52.0 (Δ) y 112.0 (●).....	106
<b>Figura 21.</b> Perfil de velocidades específicas de consumo de amonio (◆) y formación de nitrato (□) a diferentes concentraciones iniciales de sulfuro: 0, 3.1, 6.4, 13.5, 52.0 y 112.0 mg S-HS <sup>-</sup> /L.....	108
<b>Figura 22.</b> Perfil cinético de oxidación de sulfuro a diferentes concentraciones iniciales: 3.1 (◆) 6.4 (□) 13.5 (▲) 52.0 (○) y 112.0 (Δ) mg S-HS <sup>-</sup> /L.....	110
<b>Figura 23.</b> Perfil cinético de formación de sulfato a diferentes concentraciones iniciales de sulfuro: 3.1 (◆) 6.4 (□) 13.5 (▲) 52.0 (○) y 112.0 (Δ) mg S-HS <sup>-</sup> /L.....	110
<b>Figura 24.</b> Velocidad de oxidación del sulfuro en cultivos nitrificantes.....	111
<b>Figura 25.</b> Perfil de consumo de amonio (◆), 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 (○).....	113
<b>Figura 26.</b> Valores de pH durante las cinéticas en lote a diferentes concentraciones de sulfuro: 0 (◆), 3.1 (□), 6.4 (▲), 13.5 (○), 52.0 (Δ) y 112.0 (●) mg S-HS <sup>-</sup> /L.....	114
<b>Figura 27.</b> Perfiles de consumo de amonio (◆) y formación de nitrito (▲) y nitrato (□) en los cultivos en lote amonio oxidantes a 25 mg N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /L.....	116
<b>Figura 28.</b> Perfiles de consumo de nitrito (▲) y formación de nitrato (□) en los cultivos en lote nitrito oxidantes a 25 mg N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /L.....	118
<b>Figura 29.</b> Curva de Monod de la amonio oxidación (◆) a diferentes concentraciones iniciales de amonio (0 a 57 mg N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /L). La línea sólida (—) es el mejor ajuste a los datos experimentales mediante la ecuación de Monod.....	119
<b>Figura 30.</b> Curva de Monod de la nitrito oxidación (▲) a diferentes concentraciones iniciales de nitrito (0 a 50 mg N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /L). La línea sólida (—) es el mejor ajuste a los datos experimentales mediante la ecuación de Monod.....	119

<b>Figura 31.</b> Curvas de Monod de la amonio oxidación a diferentes concentraciones iniciales de sulfuro: 0 (◆), 2.5 (□), 3.5 (▲) y 5.0 (●) mg S-HS <sup>-</sup> /L. Las líneas sólidas (—) son las curvas del mejor ajuste de los datos experimentales usando la ecuación de Monod en el caso de los ensayos sin sulfuro y para los ensayos con adición de sulfuro.....	120
<b>Figura 32.</b> Curvas de Monod de la nitrito oxidación a diferentes concentraciones iniciales de sulfuro: 0 (◆), 2.5 (□), 3.5 (▲) y 5.0 (●) mg S-HS <sup>-</sup> /L. Las líneas sólidas (—) son las curvas del mejor ajuste de los datos experimentales usando la ecuación de Monod en el caso de los ensayos sin sulfuro y para los ensayos con adición de sulfuro.....	121
<b>Figura 33.</b> Variación de las constantes cinéticas: K <sub>s</sub> (◆) y q <sub>max</sub> (■) de la amonio oxidación (a) y nitrito oxidación (b) a diferentes concentraciones iniciales de sulfuro (0, 2.5, 3.5 y 5.0 mg S-HS <sup>-</sup> /L).....	122
<b>Figura 34.</b> Correlación lineal de los datos experimentales con respecto a los datos ajustados por el modelo para la amonio (a) y nitrito (b) oxidación.....	124
<b>Figura 35.</b> Simulación de la nitrificación en un reactor en continuo alimentado con amonio y sulfuro. Q <sub>e</sub> : velocidad volumétrica de entrada, Q <sub>s</sub> : velocidad volumétrica de salida.....	127
<b>Figura 36.</b> Perfiles de oxidación de sulfuro (●), amonio (◆) y producción de sulfato (□) en ensayos abióticos y perfil de oxígeno disuelto (▲) en el SBR.....	130
<b>Figura 37.</b> Perfiles de concentración de sulfuro (●) y amonio (◆) en ausencia de oxígeno en el SBR con biomasa estéril.....	132
<b>Figura 38.</b> Perfiles de oxidación de amonio (◆), formación de nitrito (▲) y nitrato (□) y consumo de oxígeno disuelto (●) en el SBR nitrificante.....	133
<b>Figura 39.</b> Perfiles de la nitrificación con respecto al número de ciclos de operación del SBR alimentado con sulfuro a 0, 2.5, 5.0, 7.5, 10, 15 y 20 mg S/L (—): amonio entrante (◆), amonio residual (●), nitrito (▲) y nitrato (□).....	135
<b>Figura 40.</b> Perfiles de eficiencia de consumo de amonio (◆) y rendimientos de formación de nitrito (▲) y nitrato (□) a través de los ciclos de operación en las etapas de adición de 15 (a) y 20 (b) mg S-HS <sup>-</sup> /L.....	137
<b>Figura 41.</b> Velocidades específicas de consumo de amonio (◆) y formación de nitrato (□) con respecto al número de ciclos de operación del SBR alimentado con sulfuro a 0, 2.5, 5.0, 7.5, 10, 15 y 20 mg S/L (—).....	138
<b>Figura 42.</b> Promedio de velocidades específicas de consumo de amonio (■) y formación de nitrato (□) a diferentes concentraciones iniciales de sulfuro en el SBR.....	139
<b>Figura 43.</b> Cinéticas de consumo de amonio (◆) y formación de nitrito (▲) y nitrato (□) en las etapas de adición de sulfuro al reactor SBR a concentraciones de 15 mg S-HS <sup>-</sup> /L (a) y 20 mg S-HS <sup>-</sup> /L (b).....	141
<b>Figura 44.</b> Velocidades de oxidación del sulfuro a diferentes concentraciones iniciales de sulfuro en cultivos abióticos (■) y bióticos (□) en el reactor SBR.....	142

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Efectos ecológicos y toxicológicos de compuestos nitrogenados inorgánicos.....	<b>14</b>
<b>Tabla 2.</b> Niveles de peligrosidad asociados a diferentes concentraciones de H <sub>2</sub> S.....	<b>17</b>
<b>Tabla 3.</b> Caracterización de sosa gastada y aguas amargas de la refinería de Tula, México.....	<b>18</b>
<b>Tabla 4.</b> Caracterización físico-química de aguas residuales de tenerías.....	<b>19</b>
<b>Tabla 5.</b> Constantes cinéticas de consorcios nitrificantes bajo distintas condiciones experimentales.....	<b>33</b>
<b>Tabla 6.</b> Tipos de inhibidores reversibles y sus efectos.....	<b>36</b>
<b>Tabla 7.</b> Compuestos azufrados inhibidores de la nitrificación.....	<b>41</b>
<b>Tabla 8.</b> Oxidación de compuestos azufrados por <i>Nitrosomonas europaea</i> .....	<b>42</b>
<b>Tabla 9.</b> Estudios sobre el efecto del sulfuro sobre la nitrificación.....	<b>44</b>
<b>Tabla 10.</b> Composición del medio de cultivo del reactor nitrificante en continuo.....	<b>83</b>
<b>Tabla 11.</b> Concentraciones de los nutrientes del medio de cultivo nitrificante en lote.....	<b>84</b>
<b>Tabla 12.</b> Concentraciones de los nutrientes del medio de cultivo nitrificante en lote.....	<b>85</b>
<b>Tabla 13.</b> Concentraciones de los nutrientes del medio de cultivo nitrificante en el SBR.....	<b>88</b>
<b>Tabla 14.</b> Concentraciones iniciales del sulfuro adicionado al SBR.....	<b>89</b>
<b>Tabla 15.</b> Métodos analíticos.....	<b>90</b>
<b>Tabla 16.</b> Coeficientes de variación (CV) de los valores promedios de: coeficientes de regresión (R <sup>2</sup> ), pendientes (m) y ordenadas al origen (b) de las diferentes curvas de calibración realizadas por cada método analítico.....	<b>94</b>
<b>Tabla 17.</b> Balance de nitrógeno en el reactor en continuo.....	<b>99</b>
<b>Tabla 18.</b> Valores promedio y desviación estándar de las variables de respuesta del proceso nitrificante en el reactor en continuo.....	<b>100</b>
<b>Tabla 19.</b> Balance de nitrógeno, eficiencia de consumo de amonio (E <sub>NH4+</sub> ) y rendimientos de formación de nitrito (Y <sub>NO2-</sub> ) y nitrato (Y <sub>NO3-</sub> ) del proceso nitrificante a diferentes concentraciones iniciales de sulfuro. Valores obtenidos después de 60 h de cultivo, excepto para el ensayo sin sulfuro donde fue calculado después de 24 h.....	<b>107</b>
<b>Tabla 20.</b> Balance de azufre en los cultivos nitrificantes en lote después de 60h (mg S/L).....	<b>111</b>
<b>Tabla 21.</b> Variables de respuesta del proceso respiratorio amonio oxidante a 25 mg N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /L.....	<b>117</b>
<b>Tabla 22.</b> Variables de respuesta del proceso respiratorio nitrito oxidante control a 25 mg N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /L.....	<b>118</b>
<b>Tabla 23.</b> Constantes cinéticas de Monod de los procesos amonio oxidante y nitrito oxidante. Valores con la misma letra, en la misma columna, significa que no hubo diferencia significativa entre ellos (p<0.021) y valores sin letra significa que existe una diferencia significativa entre ellos (p>0.31).....	<b>122</b>
<b>Tabla 24.</b> Variables de respuesta del proceso respiratorio nitrificante en ausencia de sulfuro en el SBR.....	<b>134</b>
<b>Tabla 25.</b> Eficiencia y rendimientos del proceso nitrificante en el SBR. Los valores indicados corresponden a los promedios de todos los valores obtenidos en cada periodo de evaluación a una concentración de sulfuro ensayada.....	<b>135</b>
<b>Tabla 26.</b> Velocidades específicas de consumo de amonio y formación de nitrato en el SBR a través de los ciclos de operación a diferentes concentraciones iniciales de sulfuro (0, 2.5, 5.0, 7.5, 10, 15 y 20 mg S-HS <sup>-</sup> /L).....	<b>140</b>
<b>Tabla 27.</b> Balance de azufre en el reactor SBR a diferentes concentraciones iniciales de sulfuro.....	<b>143</b>

# RESUMEN



## Resumen

Una gran variedad de aguas residuales industriales pueden contener concentraciones muy altas de compuestos nitrogenados y azufrados. Estos efluentes sin tratamiento previo ocasionan descargas masivas de amonio y sulfuro provocando contaminación y eutroficación. El tratamiento biológico por nitrificación es ampliamente utilizado para eliminar el amonio de aguas residuales, sin embargo la información sobre el efecto inhibitorio del sulfuro sobre el proceso nitrificante es todavía muy escasa. Para entender mejor el efecto del sulfuro sobre la nitrificación, se realizaron estudios fisiológicos y cinéticos en lote y en un reactor de lotes secuenciados (SBR) con biomasa con actividad amonio y nitrito oxidante previamente estabilizada.

Se realizaron cultivos en lote inoculados con un lodo nitrificante proveniente de un reactor en continuo de tanque agitado en régimen estacionario. En este reactor, se obtuvo una eficiencia de consumo de amonio ( $E_{\text{NH}_4^+}$ ) de  $99.1 \pm 5.1\%$  y un rendimiento de producción de nitrato ( $Y_{\text{NO}_3^-}$ ) de  $0.95 \pm 0.05$  g N- $\text{NO}_3^-$ /g N- $\text{NH}_4^+$  consumido. En los cultivos en lote sin sulfuro, el proceso nitrificante se llevó a cabo satisfactoriamente bajo las condiciones experimentales utilizadas, obteniendo después de 24 h, una  $E_{\text{NH}_4^+}$  del  $100 \pm 2.1\%$  y un  $Y_{\text{NO}_3^-}$  de  $0.90 \pm 0.01$ . Al añadir sulfuro a los cultivos nitrificantes a concentraciones iniciales de  $3.1 \pm 0.2$ ,  $6.4 \pm 0.5$ ,  $13.5 \pm 0.7$ ,  $52.0 \pm 2.6$  y  $112.0 \pm 2.5$  mg S- $\text{HS}^-$ /L, las velocidades específicas disminuyeron entre 51 y 92 % para el consumo de amonio, y entre 77 y 97 % para la producción de nitrato, evidenciando el efecto inhibitorio del sulfuro sobre los procesos amonio y nitrito oxidantes. A concentraciones menores que 13.5 mg S/L, la  $E_{\text{NH}_4^+}$  fue de 100.0 % después de 60 h. A las concentraciones de sulfuro variando de 3.1 a 112.0 mg S/L, el  $Y_{\text{NO}_3^-}$  fue disminuyendo de 0.90 a 0.30 debido a una acumulación de nitrito en el cultivo. Los valores de  $\text{IC}_{50}$  fueron determinados de  $2.6 \pm 0.3$  mg S- $\text{HS}^-$ /L para la amonio oxidación y de  $1.2 \pm 0.2$  mg S- $\text{HS}^-$ /L para la nitrito oxidación, demostrando que el sulfuro afectó mayoritariamente el proceso nitrito oxidante. Posteriormente, en ensayos en lote independientes con amonio y nitrito como sustrato y en ausencia de sulfuro, se determinaron las constantes de afinidad del lodo para sus sustratos:  $K_{\text{S},\text{NH}_4^+} = 2.41 \pm 0.11$  mg N/L y  $K_{\text{S},\text{NO}_2^-} = 0.74 \pm 0.03$  mg N/L, así como las velocidades específicas máximas:  $q_{\text{max},\text{NH}_4} = 0.086 \pm 0.008$  y  $q_{\text{max},\text{NO}_2} = 0.124 \pm 0.001$  mg N/mg proteína microbiana.h. Se mostró que la inhibición de la amonio oxidación por el sulfuro fue del tipo no-competitiva con una constante de inhibición  $K_{i,\text{NH}_4}$  de  $2.54 \pm 0.12$  mg S/L mientras que la inhibición de la nitrito oxidación fue del tipo mixta, con una constante de inhibición competitiva  $K'_{i,\text{NO}_2}$  de  $0.22 \pm 0.03$  mg S/L y

una constante de inhibición no-competitiva  $K_{i,NO_2}$  de  $1.03 \pm 0.06$  mg S/L. Los resultados muestran que el sulfuro es un fuerte inhibidor de los procesos amonio y nitrito oxidantes, siendo la nitrito oxidación más sensible a la presencia de sulfuro. Por lo tanto, su presencia debe de ser controlada en reactores nitrificantes en sistemas de tratamiento de aguas residuales para evitar la acumulación de nitrito. Utilizando las constantes cinéticas determinadas por el modelo de inhibición, se realizó una simulación del efecto de la adición de sulfuro a un reactor nitrificante en continuo y en régimen estacionario. Se determinó que la biomasa nitrificante podría tolerar hasta una concentración máxima de sulfuro de 1 mg S-HS<sup>-</sup>/L sin que se viera afectada la eficiencia de consumo de amonio ni el rendimiento de formación de nitrato.

Posteriormente, se estabilizó un proceso nitrificante en un reactor SBR, obteniéndose una  $E_{NH_4^+}$  de  $100 \pm 3.1\%$  y un  $Y_{NO_3^-}$  de  $0.99 \pm 0.06$ . A través de los ciclos de operación del reactor, se evaluó la capacidad nitrificante del consorcio, así como la oxidación del sulfuro en el SBR alimentado con sulfuro a diferentes concentraciones: 0 (98 ciclos), 2.5 (40 ciclos), 5.0 (102 ciclos), 7.5 (70 ciclos), 10.0 (86 ciclos), 15.0 (64 ciclos) y 20.0 (228 ciclos) mg S-HS<sup>-</sup>/L. Hasta 10 mg S/L (20 mg S/L.d), el proceso nitrificante se encontró estable con valores de  $E_{NH_4^+}$  del 100% y  $Y_{NO_3^-}$  de 0.95. A concentraciones mayores en sulfuro de 15 y 20 mg S/L, la mayoría del amonio entrante fue consumido, sin embargo se observó una acumulación de nitrito, y en consecuencia una disminución en el  $Y_{NO_3^-}$ . Sin embargo, se observó que a través de los ciclos de operación durante los periodos de alimentación con 15 y 20 mg S/L, el rendimiento de nitrito fue disminuyendo y el rendimiento de nitrato aumentando, obteniéndose en el último ciclo alimentado con 20 mg S/L (equivalente a 40 mg S/L.d) una  $E_{NH_4^+}$  del 100%, un  $Y_{NO_2^-}$  de cero y un  $Y_{NO_3^-}$  de 0.80. Las velocidades específicas de consumo de amonio y formación de nitrato al comienzo de cada etapa de adición de una nueva concentración de sulfuro se vieron fuertemente disminuidas pero al paso de los ciclos de operación, estas velocidades aumentaron de nuevo. Esta disminución del efecto inhibitorio del sulfuro sobre la nitrificación bajo un sistema de operación de lotes secuenciados mostró que el lodo presentó una adaptación metabólica en el SBR, lo cual sugiere que el uso de lodos nitrificantes en reactores SBR puede ser una buena alternativa para tratar efluentes con amonio y compuestos inhibitorios como el sulfuro. Al final del periodo de adición de 20 mg S/L, la  $q_{NH_4^+}$  sólo se vio disminuida de 19 % respecto a su valor en el reactor control sin adición de sulfuro mientras que la  $q_{NO_3^-}$  se vio disminuida un 55 %, mostrándose que a pesar de la disminución de la inhibición a través de los ciclos, el sulfuro siguió afectando el proceso

nitrificante siendo el proceso nitrito oxidante más afectado. A las concentraciones más altas ensayadas de 15 y 20 mg S/L, se registró una fase de retardo en la formación de nitrito en los perfiles cinéticos aunque el amonio fue consumido en su totalidad, esto podría sugerir que el sulfuro pudo afectar la actividad de la enzima hidroxilamina oxidoreductasa propiciando la acumulación de hidroxilamina en el cultivo. La comparación de las velocidades de oxidación de sulfuro en ensayos abióticos y bióticos mostró que el lodo adquirió una capacidad sulfuro oxidante, la cual fue en aumento a través de los ciclos. Los resultados indican que el uso de consorcios con actividad nitrificante previamente estabilizada en reactores SBR puede constituir una alternativa para eliminar simultáneamente amonio por nitrificación y sulfuro por sulfuro oxidación.



## Abstract

A wide variety of industrial wastewaters may contain very high concentrations of nitrogen and sulfur compounds. These effluents without treatment cause massive discharges of ammonium and sulfide causing pollution and eutrophication. The biological treatment by nitrification is widely used for removing ammonium from wastewaters; however, information on the inhibitory effect of sulfide on the nitrifying process is still very scarce. To understand better the effect of sulfide on nitrification, physiological and kinetic studies were carried out in batch systems and in a sequencing batch reactor (SBR) inoculated with biomass with previous stabilized ammonium and nitrite oxidizing activity.

Batch cultures were performed with a nitrifying sludge coming from a continuous stirred tank reactor at steady state. In this reactor, an ammonium uptake efficiency ( $E_{\text{NH}_4^+}$ ) of  $99.1 \pm 5.1$  % and a nitrate production yield ( $Y_{\text{NO}_3^-}$ ) of  $0.95 \pm 0.05$  g  $\text{NO}_3^-$ -N/g  $\text{NH}_4^+$ -N consumed were obtained. In batch cultures without sulfide, the nitrifying process was carried out successfully under the experimental conditions used, obtaining after 24 h, an  $E_{\text{NH}_4^+}$  of  $100.0 \pm 2.1$  % and a  $Y_{\text{NO}_3^-}$  of  $0.90 \pm 0.01$ . When sulfide was added at initial concentrations of  $3.1 \pm 0.2$ ,  $6.4 \pm 0.5$ ,  $13.5 \pm 0.7$ ,  $52.0 \pm 2.6$  and  $112.0 \pm 2.5$  mg  $\text{HS}^-$ -S/L, specific rates decreased by 51 to 92 % for ammonium consumption and by 77 to 97 % for nitrate production, evidencing the inhibitory effect of sulfide on the ammonium and nitrite oxidation processes. At sulfide concentrations lower than 13.5 mg S/L,  $E_{\text{NH}_4^+}$  was maintained at 100% after 60h. At sulfide concentrations ranging from 3.1 to 112.0 mg S/L, the  $Y_{\text{NO}_3^-}$  decreased from 0.9 to 0.3 due to an accumulation of nitrite. The  $\text{IC}_{50}$  value for ammonium and nitrite oxidation was  $2.6 \pm 0.3$  and  $1.2 \pm 0.2$  mg  $\text{HS}^-$ -S/L, respectively, showing that sulfide affected mainly the nitrite oxidizing process. Then, in independent batch activity assays performed with ammonium and nitrite as substrate and without sulfide, substrate affinity constants:  $K_{\text{S},\text{NH}_4^+} = 2.41 \pm 0.11$  mg N/L and  $K_{\text{S},\text{NO}_2} = 0.74 \pm 0.03$  mg N/L, and maximum specific rates:  $q_{\text{max},\text{NH}_4} = 0.086 \pm 0.008$  and  $q_{\text{max},\text{NO}_2} = 0.124 \pm 0.001$  mg N/mg microbial protein.h were determined. It was shown that inhibition of ammonium oxidation by sulfide was non-competitive with an inhibition constant  $K_{\text{i},\text{NH}_4}$  of  $2.54 \pm 0.12$  mg S/L while inhibition of nitrite oxidation was mixed, with a competitive inhibition constant  $K'_{\text{i},\text{NO}_2}$  of  $0.22 \pm 0.03$  mg S/L and a non-competitive inhibition constant  $K_{\text{i},\text{NO}_2}$  of  $1.03 \pm 0.06$  mg S/L. Results show that sulfide is a strong inhibitor of ammonium and nitrite oxidizing processes, nitrite oxidation being the most sensitive process to the presence of sulfide. Then, its presence in nitrification

systems should be avoided to prevent accumulation of nitrite. By using the kinetic constants and the inhibition model, the effect of sulfide addition was simulated in a continuous nitrifying reactor under steady-state operation. It was shown that the maximum sulfide concentration that the sludge can tolerate without affecting the ammonium consumption efficiency and nitrate yield is 1 mg HS<sup>-</sup>-S/L.

Later, a nitrification process was stabilized in a SBR reactor, reaching a  $E_{\text{NH}_4^+}$  of  $100 \pm 3.1 \%$  and a  $Y_{\text{NO}_3^-}$  of  $0.99 \pm 0.06$ . The nitrifying ability of the consortium and the sulfide oxidation were evaluated throughout the operation cycles of the reactor fed with sulfide at different concentrations: 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 15.0 and 20.0 mg HS<sup>-</sup>-S/L. Up to 10 mg S/L (20 mg S/L.d), the nitrifying process was stable with values of  $E_{\text{NH}_4^+}$  of 100% and  $Y_{\text{NO}_3^-}$  of 0.95. At higher sulfide concentrations of 15 and 20 mg S/L, the majority of ammonium was consumed but an accumulation of nitrite was observed and consequently the nitrate yield decreased. However, during the feeding periods at 15 and 20 mg S/L, the nitrite yield was decreasing throughout the operation cycles and the nitrate yield increasing, obtaining in the last cycle fed with 20 mg S/L (corresponding to 40 mg S/L.d), an  $E_{\text{NH}_4^+}$  of 100 %, a  $Y_{\text{NO}_2^-}$  of zero and a  $Y_{\text{NO}_3^-}$  of 0.8. At the beginning of each feeding step at a new sulfide concentration, specific rates of ammonium consumption and nitrate formation were strongly decreased but these rates newly increased along the cycles. This decrease in the nitrification inhibition by sulfide in a system operated as sequencing batch showed that the sludge acquired a metabolic adaptation, suggesting that the use of nitrifying sludge in SBR reactors can be a good alternative for treating effluents contaminated with ammonium and inhibitory compounds such as sulfide. At the end of the feeding period at 20 mg S/L, the  $q_{\text{NH}_4^+}$  was only decreased by 19% respect to its value obtained in the control reactor without sulfide addition whereas the  $q_{\text{NO}_3^-}$  decreased by 55%, showing that in spite of the decrease in the inhibitory effect along the cycles, sulfide kept exerting inhibition on nitrification, being the nitrite oxidation process the most affected. At the higher sulfide concentrations of 15 and 20 mg S/L, a lag phase for nitrite formation was observed during the kinetic profiles whereas ammonium was totally consumed, suggesting that sulfide might affect the activity of the hydroxylamine oxidoreductase enzyme inducing the accumulation of hydroxylamine in the culture. Velocities of sulfide oxidation in abiotic assays in comparison with biotic assays showed that the sludge acquired a sulfide oxidation capacity, which was increasing throughout the cycles. Results indicated that the use of consortia with a previously stabilized nitrifying activity in SBR

---

## ABSTRACT

---

reactors might constitute an alternative for eliminating simultaneously ammonium by nitrification and sulfide by sulfide oxidation.

# INTRODUCCIÓN



CONTAMINACIÓN  
DEL AGUA

---

---

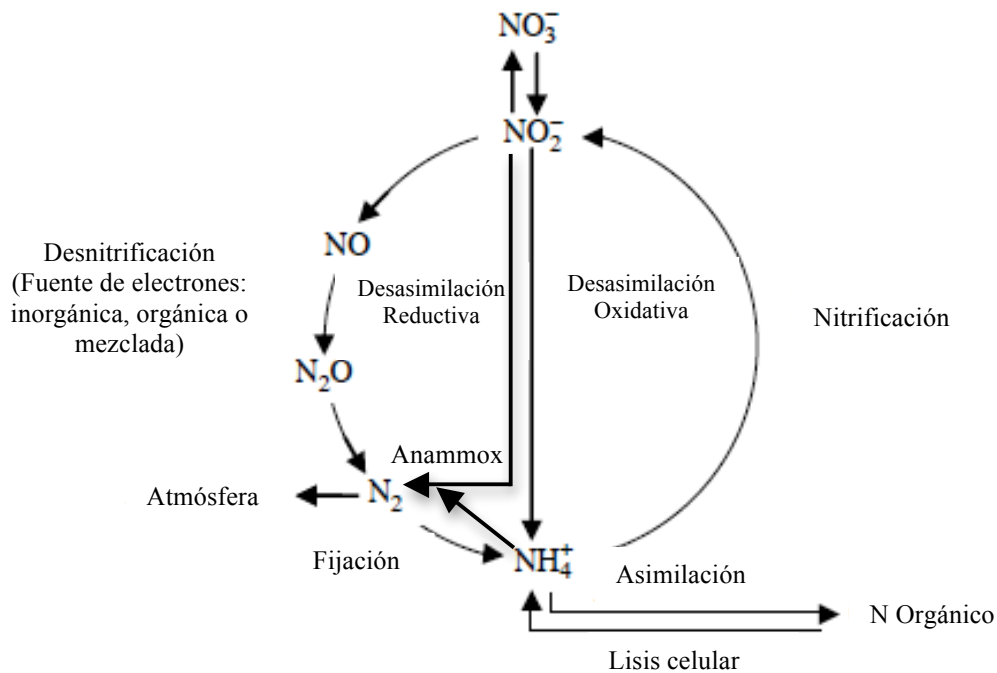
## **I. Introducción**

### **I.1 Contaminación del agua**

El agua es un recurso imprescindible para la vida humana y por ello es necesaria una gestión adecuada de ésta, que permita un suministro en buenas condiciones y proteja los recursos hídricos existentes. El aumento de la población en los núcleos urbanos, el desarrollo industrial y la creciente actividad agropecuaria han aumentado la cantidad de vertidos a medios naturales hasta límites que superan la capacidad de autodepuración de estos medios receptores. Los vertidos están deteriorando la calidad del agua. Se entiende por calidad del agua al conjunto de características físicas, químicas y biológicas que hacen que el agua sea apropiada para determinado uso.

Muchas industrias descargan aguas residuales ricas en nitrógeno y azufre. Aguas residuales de industrias como: la textil, petroquímica, farmacéutica, química, curtiembre, de procesamiento de alimentos, pulpa y papel, látex de caucho, de fabricación de explosivos, pesticidas, etc., pueden contener concentraciones muy altas de compuestos nitrogenados y azufrados (*Leta y col., 2004; Rattanapan y col., 2009; Tait y col., 2009*). Estos efluentes sin tratamiento previo ocasionan descargas masivas de amonio y sulfuro en las aguas receptoras provocando su contaminación y eutroficación.

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 acuáticos. 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 (*Cuervo-López y col., 2009*).



**Figura 1.** Ciclo global del nitrógeno (modificado de *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 producen 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*).

Los seres humanos han alterado los ciclos biogeoquímicos en particular el ciclo del nitrógeno por medio de la combustión de combustibles fósiles, producción de fertilizantes con alto contenido en nitrógeno y otras acciones sin restricciones (Figura 2). La gran aceleración del ciclo del nitrógeno, causada por estas actividades antropogénicas sin duda ha cumplido con los requisitos esenciales para sostener una población mundial cada vez mayor, como el suministro de alimentos suficientes, sin embargo, el ciclo del nitrógeno se ha desbalanceado aumentando las emisiones de  $\text{NH}_3$ ,  $\text{N}_2$  y  $\text{N}_2\text{O}$ , siendo este último un importante gas de efecto invernadero (*Singh y Verma, 2007; Cervantes, 2009*).

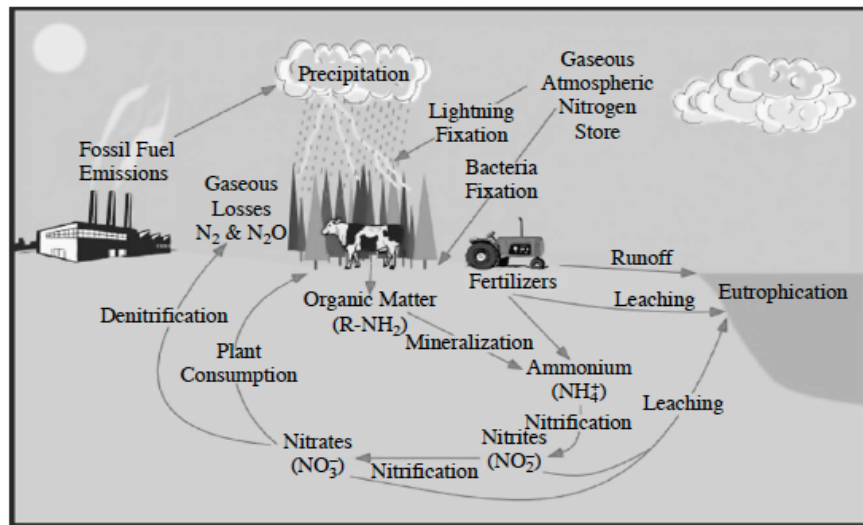


Figura 2. Procesos biológicos y antropogénicos involucrados en el ciclo del nitrógeno (Pidwirny, 2006).

En la Figura 3, 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) como las 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.

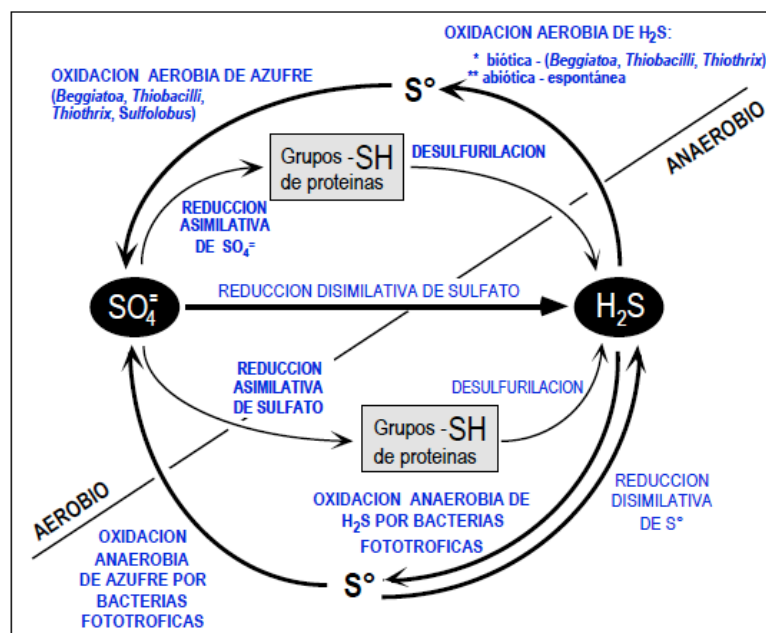
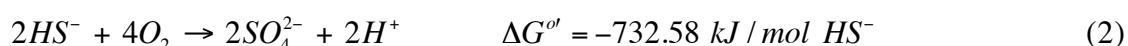
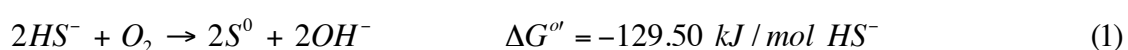


Figura 3. Ciclo global del azufre (Hill y Petrucci, 1996).



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 *Thiosphaera* (Vidyalakshmi y col., 2009), (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*, *Thiosphaera*, *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. 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, la concentración de oxígeno es el parámetro que determina el producto final de la oxidación (Ecuación 1 y 2). De acuerdo a la estequiometría se necesita una relación  $O_2/HS^-$  molar de 0.5 para producir  $S^0$  y de 2 para producir  $SO_4^{2-}$  por lo que la formación de azufre elemental puede ser regulada dosificando estequiométricamente 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.



El ciclo del azufre también ha sido alterado por las actividades del hombre. Estas actividades, principalmente relacionadas con la combustión del carbón, han duplicado las emisiones a la atmósfera de compuestos azufrados (Figura 4). El 95% del dióxido de azufre ( $SO_2$ ) es emitido por el uso de combustibles fósiles. El azufre se presenta de forma natural en varios estados de oxidación:  $H_2S$  (-2),  $S^0$  (0), etc. El sulfato es el segundo anión más abundante en el agua dulce después del bicarbonato y en el agua salada después del cloruro, y es el principal causante de la acidez de la lluvia. El flujo de sulfato aportado por las lluvias en regiones industriales es de mínimo 1 g de  $S/m^2$  (Vásquez y Guadalupe., 2001). Este valor es 10 veces más grande que el flujo marino (Vásquez y Guadalupe., 2001) esto ilustra el impacto

masivo hecho por el hombre al ciclo del azufre (Devai y DeLaune, 1999).

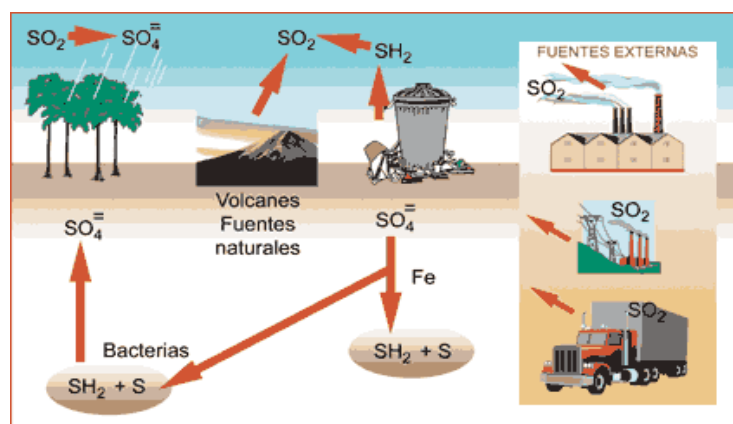


Figura 4. Efectos de actividades humanas sobre el ciclo del azufre (Capó y Miguel, 2004).

### I.1.1 Efectos de los compuestos nitrogenados y azufrados sobre el ambiente

Los altos niveles de amonio, nitrito y nitrato derivados de las actividades industriales y humanas, pueden estimular el desarrollo, el mantenimiento y la proliferación de los productores primarios (fitoplancton, algas bentónicas, macrófitos), contribuyendo al fenómeno generalizado de la eutroficación cultural de los ecosistemas acuáticos. La eutroficación de los ecosistemas acuáticos puede causar efectos ecológicos y toxicológicos que están directa o indirectamente relacionados con la proliferación de los productores primarios y a su vez a los niveles bajos de oxígeno en las aguas (Tabla 1) (Camargo y Alonso, 2006).

Tabla 1. Efectos ecológicos y toxicológicos de compuestos nitrogenados inorgánicos (Camargo y Alonso, 2006).

- Incremento de la biomasa de los productores primarios (proliferación de algas tóxicas en ciertas situaciones).
- Reducción de la transparencia y la disponibilidad de luz.
- Aumento de la materia orgánica sedimentada.
- Disminución de la concentración de oxígeno disuelto en las aguas y los sedimentos.
- Formación de compuestos reducidos ( $\text{H}_2\text{S}$ , por ejemplo) en las aguas del fondo y los sedimentos.
- Cambios (aumento o disminución) en la biomasa de los productores secundarios.
- Disminución de la diversidad de especies en las comunidades de productores primarios y secundarios.

Las condiciones anóxicas promovidas por la eutroficación de los ecosistemas acuáticos puede causar la muerte de especies sensibles de peces, con una reducción significativa en el área de hábitat adecuado para la alimentación, crecimiento y reproducción de estos organismos acuáticos (*Díaz y Rosenberg, 1995; Wetzel, 2001; Anderson y col., 2002; Breitburg, 2002*). Además, la proliferación de algas tóxicas es en la actualidad un fenómeno global que parece estar favorecido por la contaminación por nutrientes y puede contribuir significativamente a las muertes extensas de animales acuáticos (*Camargo y Alonso, 2006*).

Por otra parte, la disminución de las concentraciones de oxígeno disuelto también puede promover la acumulación de compuestos tóxicos, tales como el sulfuro de hidrógeno ( $H_2S$ ) mediante la reducción de sulfato ( $SO_4^{2-}$ ) dando lugar a mayores efectos adversos en los animales acuáticos (*Díaz y Rosenberg, 1995; Wetzel, 2001; Breitburg, 2002*). El  $H_2S$  es un compuesto tóxico que puede provocar una mortalidad aguda en los animales acuáticos en concentraciones bajas (0.1 mg/L), al afectar el sistema nervioso (*Ortiz y col., 1993*).

El  $H_2S$  es también emitido al ambiente por un gran número de industrias como la petrolera, tenerías, procesadoras de alimentos y látex (*Lens y col., 1998; Tait y col., 2009*). Además, este compuesto es el resultado del tratamiento anaerobio de aguas residuales que contienen sulfato (lixiviados y efluentes de tenerías por ejemplo). Se encuentra presente en la extracción del gas natural y es un intermediario de la oxidación biológica de  $CS_2$  (*Revah y col., 1995*). Sus propiedades corrosivas están relacionadas con el daño a paredes de concreto de reactores, sistemas de drenaje y tuberías de acero. Su emisión al ambiente genera olores desagradables y lluvia ácida (*Alcántara, 2000*). Con lo anterior, es claro que los efluentes deben estar prácticamente libres de sulfuro. Es común que se establezca como límite para descargas valores menores que 1 mg/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.

### **I.1.2 Efectos de los compuestos nitrogenados y azufrados sobre la salud humana**

La exposición superior a 35 mg N-NH<sub>3</sub>/m<sup>3</sup> en el aire puede producir quemaduras graves en la piel, ojos, garganta y pulmones. En casos extremos, puede provocar ceguera, daño en los pulmones y la muerte. Respirar concentraciones de 5 a 15 mg N-NH<sub>3</sub>/m<sup>3</sup> puede causar tos e

irritación de la nariz y la garganta (ATSDR, 2004). La ingestión de amoníaco en forma disuelta puede causar quemaduras en la boca, la garganta y el estómago (Greer y Shannon, 2005).

La ingestión de agua potable contaminada con nitrito puede inducir metahemoglobinemia en los seres humanos. Además, aguas contaminadas con nitrato también pueden promover el mismo problema de salud por la reducción de nitrato a nitrito en el tracto digestivo. La metahemoglobinemia se caracteriza por una obstrucción de la capacidad de transportar oxígeno de la hemoglobina (Knobeloch y col., 2000; Greer y Shannon, 2005). Se observó clínicamente una disminución en el transporte de oxígeno cuando los niveles de metahemoglobina alcanzan el 10% o más (Fwetrell, 2004). Los síntomas típicos de la metahemoglobinemia son cianosis, dolor de cabeza, letargo, fatiga, taquicardia, coma, convulsiones, asfixia y finalmente la muerte (Camargo y Alonso, 2006).

Ingerir nitrato (a concentraciones superiores a 10 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L) y nitrito (a concentraciones superiores a 1 mg N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/L) (Greer and Shannon, 2005) también puede promover la formación de compuestos nitrogenados (por ejemplo, nitrosaminas), que están entre los compuestos carcinógenos más potentes en mamíferos (Wolfe y Patz, 2002; Fwetrell, 2004). Una serie de importantes problemas de salud también se han asociado con la ingestión de nitrato y nitrito por los seres humanos, tales como defectos de mutagenicidad, teratogenicidad y defectos de nacimiento (Dorsch y col., 1984; Luca y col., 1987), riesgos de linfoma de Hodgkin (Ward y col., 1996), enfermedad coronaria (Cerhan y col., 2001) y cáncer de vejiga y de ovario (Meyer y col., 2005). Además, la ingestión de nitrato jugaría un papel en la etiología de la diabetes mellitus y en el desarrollo de la hipertrofia de tiroides (Van Maanen y col., 1994, 2000).

Por otro lado, en la Tabla 2, se muestran los niveles de H<sub>2</sub>S considerados como peligrosos y sus efectos en el ser humano. Como puede observarse, el sulfuro puede ocasionar diferentes trastornos en el hombre, los cuales dependen de la concentración y del tiempo de exposición. En Estados Unidos, el límite máximo de exposición de un trabajador a sulfuro es de 10 ppm, llegando a ser letal a una concentración de 600 ppm (Janssen, 1996).

**Tabla 2.** Niveles de peligrosidad asociados a diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>S (*Janssen, 1996*).

Concentración (ppm)	Efectos
10	Exposición laboral limitada a 8 horas
20	Requiere de cubre bocas
100	Puede causar dolor de cabeza, náusea, sensación de pérdida de olor
200	Rápida pérdida del sentido del olfato, irritación de ojos y garganta
500	Pérdida de razonamiento y equilibrio
700	Inmediata inconsciencia, se paraliza la respiración

El SO<sub>2</sub> puede afectar la salud humana en forma directa por acidificación de las mucosas respiratorias o contribuir a la formación de cristales de sulfato, que a su vez ayudan a desencadenar infartos extensos del miocardio. Los óxidos de azufre (S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>, SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) son solubles en agua y al hidratarse dan lugar a la formación de ácidos sumamente agresivos. Estos se hidratan con la humedad de las mucosas conjuntiva y respiratoria y constituyen un riesgo por producir irritación e inflamación aguda o crónica (*Ranguelova y col., 2012*). Tanto la absorción como la conversión de sulfato en las gotas de lluvia tienen lugar en la atmósfera. Los aerosoles sulfatados son agentes irritantes de tres a cuatro veces más potentes que el bióxido de azufre. Estas pequeñas partículas penetran hasta los pulmones, donde se depositan (*Rall, 1974*). El sulfato constituye un peligro serio para la salud y se ha demostrado que concentraciones muy bajas (de 8 a 10 µg/m<sup>3</sup>) ejercen efectos adversos sobre las personas asmáticas, los adultos mayores y otras personas susceptibles con problemas respiratorios crónicos (*Rall, 1974*).

### I.1.3 Efluentes industriales con amonio y sulfuro

Para la eliminación de los diferentes contaminantes del agua, se ha desarrollado una amplia gama de alternativas de tratamiento tanto físico-químico como biológico. A pesar de los avances alcanzados en el tratamiento biológico de aguas que posibilitan la disminución del carbono orgánico, el problema de la eliminación de compuestos nitrogenados y azufrados aún no ha sido totalmente resuelto. En particular, existen aguas residuales de origen industrial (farmacéuticas, químicas, petroquímicas y agroalimentarias, entre otras) con concentraciones de nitrógeno de 0.03 a 45 g/L y de sulfuro de 0.05 a 4 g/L que requieren de condiciones y equipos de tratamiento especiales (*Gupta y Sharma, 1996; Rattanapan y col., 2009*). En la

actualidad, se ha caracterizado la composición química de algunas aguas residuales industriales en las cuales se encuentran en conjunto amonio y sulfuro (Tablas 3 y 4).

**Tabla 3.** Caracterización de sosa gastada y aguas amargas de la refinería de Tula, México (Olmos y col., 2004).

Parámetro (g/L)	Sosa gastada		Aguas amargas	
	Promedio (n=9)	Desviación estándar	Promedio (n=10)	Desviación estándar
pH	13	0.2	10	0.8
DQOt	364.1	53.0	1.56	0.26
DQOs	320.1	80.1	1.41	0.20
DQOss	44.0		0.15	
COT	53.9	27.0	0.31	0.04
Fenol	30.6	27.4	0.12	0.04
<i>o</i> -Cresol	6.0	3.2	0.02	0.005
<i>p</i> -Cresol	17.9	6.0	0.06	0.01
3,4-Dimetilfenol	1.4	0.6	<0.0001	
2,5-Dimetilfenol	2.9	0.3	<0.0001	
2-Etilfenol	0		<0.0001	
NTK	1.1	0.4	5.49	3.95
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0.003	0.002	0.71	0.59
Sulfuro	48.5	18.4	0.32	0.09
Sulfato	20.3	3.0	0.30	0.16
Cloro	37.9	18.0	0.40	0.22
Nitrato	<0.0001		0.001	
Nitrito	<0.0001		0.063	0.03
Fosfato	4.6	3.7	0.53	0.15
Carbonato	15.5	11.4	1.04	0.08
Sodio	27.2	5.5	0.002	0.00085
Potasio	0.08	0.01	0.0003	0.000021
Calcio	0.03	0.005	0.00009	0.000007
Hierro (II)	0.05	0.001	0.00021	0.0000057

**DQOt:** Demanda química de oxígeno total, **DQOs:** Demanda química de oxígeno relativo al sulfuro, **DQOss:** Demanda química de oxígeno de sólidos suspendidos, **COT:** Carbono orgánico total, **NTK:** Nitrógeno total Kjeldhal.

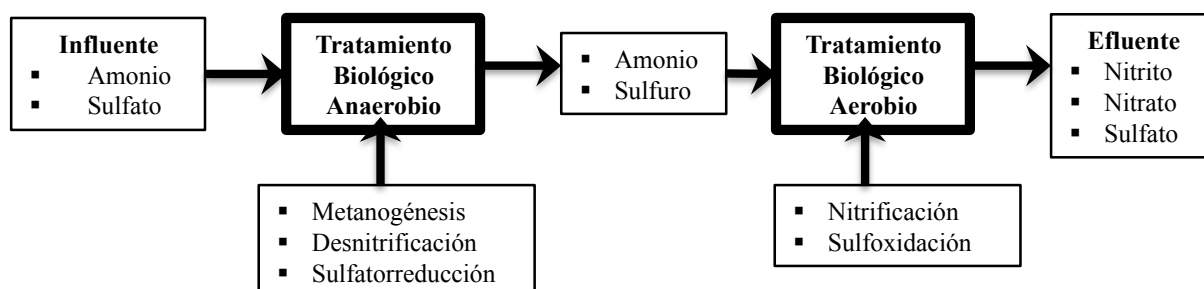
**Tabla 4.** Caracterización físico-química de aguas residuales de tenerías (Durai y Rajasimman, 2011).

Referencia	pH	SDT	ST	SS	SSV	DQO	DBO	NTK	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Cromo	Sulfuro
<i>Apaydin y col. (2009)</i>	7.4	—	—	2690	1260	3700	1470	—	180	—	440
<i>Leta y col. (2004)</i>	10.7	6810	—	—	—	1115 3.6	2906	—	162.2	32.7	507.5
<i>Orhon y col. (2000)</i>	7.8	—	—	15	576	2155	—	228	168	50.9	35.9
<i>Ram y col. (1999)</i>	10.5	17737	18884	1147	—	3114	1126	—	33	83.0	55.0
<i>Szpyrkowicz y col. (2005)</i>	7.7	—	—	—	—	2426	—	370	335	29.3	286

SDT: Sólidos disueltos totales, ST: Sólidos totales, SS: Sólidos suspendidos, SSV: Sólidos suspendidos volátiles, DQO: Demanda química de oxígeno, DBO: Demanda biológica de oxígeno y NTK: Nitrógeno total Kjeldhal. Excepto el pH, todos los valores están en mg/L.

Las fuentes de contaminación de amonio y sulfuro se presentan también en las industrias procesadoras de alimentos (amonio: 1000-3000 mg/L y sulfuro: 250-500 mg/L) (Omil y col., 1995).

Por otro lado, existen varios efluentes industriales contaminados con amonio y sulfato, tales como efluentes de tenerías (amonio: 149-178 mg/L y sulfato: 308-680 mg/L) (Leta y col., 2004) o lixiviados (amonio: 1.1-2.2 g/L y sulfato: 1.1-3.8 g/L) (Tait y col., 2009). Se ha observado que durante el proceso de tratamiento de aguas residuales con sulfato y amonio mediante trenes de tratamiento, se puede presentar en conjunto amonio y sulfuro en contacto con biomasa nitrificante cuando el primer paso de estos trenes de tratamiento es un proceso anaerobio sulfatorreductor donde el sulfato es reducido a sulfuro (Figura 5).



**Figura 5.** Posible configuración de un tren de tratamiento de aguas residuales con amonio y sulfato.

Además, en años recientes, requisitos más estrictos sobre el medio ambiente urbano han llevado a la migración de las plantas de tratamiento de aguas residuales municipales fuera de los suburbios. Las grandes redes de drenaje para el transporte de esas aguas residuales crean condiciones anaerobias, en donde el sulfuro es generado de la respiración anaerobia del sulfato (*Nielsen y col., 2003*). Por ejemplo, *Zhou y col. (2014)* reportaron concentraciones de sulfuro en tres plantas de tratamiento (Quyung, Dongquand y Bailonggang) de aguas residuales en Shanghai, China. Se midió la concentración de sulfuro en cada estación de bombeo de la red de tubería que transportaba el agua residual a las plantas de tratamiento, mostrando que entre mayor sea la longitud de la tubería, mayor tiempo bajo condiciones anaerobias y por consiguiente mayor concentración de sulfuro en el influente de cada una de las plantas de tratamiento de aguas residuales ( $13.0 \pm 2.0$ ,  $3.5 \pm 1.0$  y  $4.5 \pm 2.0$  mg S<sup>2-</sup>/L, respectivamente).

Por todo lo anterior, es evidente que existen diversos escenarios en donde el sulfuro puede estar en contacto con biomasa nitrificante en procesos de tratamiento biológico de aguas residuales, lo cual muestra la importancia de estudiar el efecto del sulfuro sobre el proceso respiratorio nitrificante (*Sears y col., 2004*).



ELIMINACIÓN BIOLÓGICA  
DEL AMONIO

---

---

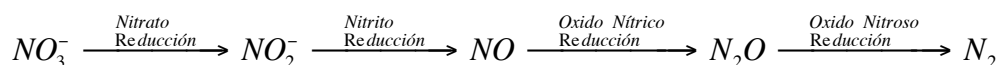
## I.2. Eliminación biológica del amonio

El sistema nitrificante-desnitrificante constituye una forma efectiva, sustentable y económicamente factible de eliminar biológicamente el nitrógeno de aguas residuales (Cervantes-Carrillo y col., 2000). Aunque se han logrado avances en la comprensión del proceso de nitrificación, faltan todavía estudios fisiológicos que ayuden a caracterizar cómo cambia la actividad nitrificante bajo diferentes condiciones ambientales, como por ejemplo en presencia de compuestos tóxicos o inhibitorios como el sulfuro en lodos activados utilizados en plantas de tratamiento de aguas.

### I.2.1 Desnitrificación

La desnitrificación es la transformación biológica del nitrato en óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) y nitrógeno molecular (N<sub>2</sub>). Éstos son compuestos gaseosos y no son fácilmente accesibles para el crecimiento microbiano. El gas nitrógeno se encuentra presente en un 78% de los gases atmosféricos (Catling y Zahnle, 2009) y su liberación en la atmósfera es un hecho benigno, por lo que se buscará su formación como producto final de la vía desnitrificante en tratamiento de aguas residuales.

La vía desnitrificante está constituida por varios pasos y cada reacción es catalizada por una enzima específica (reductasas): (a) el nitrato es reducido a nitrito por la nitrato reductasa; (b) posteriormente, la reducción de nitrito a óxido nítrico es catalizada por la enzima nitrito reductasa; (c) subsecuentemente, el óxido nítrico es transformado a óxido nitroso por la óxido nítrico reductasa; (d) finalmente, el óxido nitroso es reducido a nitrógeno molecular por catálisis de la óxido nitroso reductasa (Figura 6) (Knowles, 1982; Cuervo-López y col., 2009).



**Figura 6.** Ruta desnitrificante.

La desnitrificación puede ser organotrófica (compuestos orgánicos) o litotrófica (compuestos inorgánicos) dependiendo de su fuente de energía. El tipo de fuente de energía es un factor determinante en la velocidad de la desnitrificación (Cuervo-López y col., 2009). En la desnitrificación organotrófica, las fuentes reductoras pueden ser compuestos orgánicos de fácil oxidación como metanol, etanol, glucosa, ácidos grasos volátiles, así como compuestos

aromáticos recalcitrantes de lento consumo como benceno, tolueno, xilenos, compuestos fenólicos, entre otros (Texier y col., 2012). En la desnitrificación litotrófica, se puede acoplar la reducción del nitrato con la oxidación de compuestos inorgánicos reducidos del azufre como: sulfuro, tiosulfato y azufre elemental (Beristain-Cardoso y col., 2009). Los donadores de electrones utilizados en la desnitrificación pueden estar presentes en el agua residual a tratar o ser adicionados si hace falta poder reductor.

Existen más de 50 géneros de bacterias que pueden llevar a cabo la desnitrificación (Delwiche, 1982). La capacidad desnitrificante también se ha encontrado en arqueas y hongos (Zumft, 1992; Thorndycroft y col., 2007). Los géneros de bacterias desnitrificantes más citados incluyen: *Alcaligenes*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Thiobacillus*, *Rhizobium*, *Thiosphaera*, entre otros. La mayoría de las bacterias desnitrificantes son heterótrofas, pero algunas pueden crecer autotróficamente con hidrógeno (H<sub>2</sub>) y dióxido de carbono, con compuestos sulfurados reducidos, o con compuestos de arsénico reducidos, entre otros (Ahn, 2006). Además, se tienen reportes de que la desnitrificación se puede llevar a cabo aeróbicamente. Es por ejemplo el caso de *Aquaspirillum magnetotacticum* que consume O<sub>2</sub> mientras desnitrifica (Bazylnski y Blakemore, 1983). Los microorganismos desnitrificantes se encuentran fácilmente en los suelos y en humedales naturales (Zumft, 1992).

Respecto a las condiciones ambientales que tienen un efecto en la desnitrificación, se pueden mencionar la presencia y el tipo de donador de electrones, la ausencia de oxígeno molecular, el valor de pH, la temperatura, la relación C/N y el potencial redox, entre otros (Lin y col., 2009). Se pueden considerar como los factores más críticos a la disponibilidad de una fuente reductora (sustrato orgánico o inorgánico) y la ausencia de oxígeno.

## **I.2.2 Nitrificación**

La nitrificación es la oxidación biológica del amonio a nitrito y posteriormente a nitrato. Este proceso fue descubierto por Winogradsky (1890). Es realizado por dos tipos de bacterias quimiolitotrofas: las bacterias amonio oxidantes (BAO) que catalizan la amonio oxidación y las bacterias nitrito oxidantes (BNO) que realizan la oxidación del nitrito. La nitrificación ocurre en ambientes naturales como: suelos, aguas continentales y marinas, en donde tiene una función fundamental en el ciclo del nitrógeno. Este proceso es el primer paso de la eliminación de nitrógeno de aguas residuales en el sistema convencional de tratamiento por nitrificación-desnitrificación (Bernet y Spérandio, 2009).

### I.2.2.1 Microbiología de la nitrificación

Las bacterias amonio oxidantes pertenecen a dos grupos mono filogénicos, unas dentro del grupo beta y otras dentro del grupo gama-proteobacterias (*Purkhold y col., 2000*). Muchas de las bacterias amonio oxidantes son beta-proteobacterias como: *Nitrosomonas*, *Nitrospira*, *Nitrosolobus*, *Nitrosovibrio* y *Nitrosococcus mobilis*. Mientras que otras especies del género *Nitrosococcus* son gama-proteobacterias (*Schmidt y col., 2003*). Bacterias del género *Nitrosomonas* (incluyendo *Nitrosococcus mobilis*) y *Nitrospira* (incluyendo los géneros: *Nitrosolobus* y *Nitrosovibrio*) son las más frecuentemente encontradas en plantas de tratamiento de aguas residuales para la oxidación de amonio (*Wagner y col., 2002*). Estos microorganismos presentan diversas morfologías tales como: cocos, bacilos y espirales y su pared celular es típicamente Gram negativa. 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*).

Las bacterias nitrito oxidantes de los géneros *Nitrobacter* y *Nitrococcus*, forman parte del grupo alfa y gama proteobacteria respectivamente, y las del género *Nitrospira* forman parte de una división separada (*Schmidt y col., 2003*). Un cuarto género, *Nitrospina*, sólo ha sido encontrado en ambientes marinos. De acuerdo con el análisis de las secuencias 16S del rRNA, se mostró que cultivos de bacterias parecidas a *Nitrospira* fueron las bacterias nitrito oxidantes las más abundantes en las plantas de tratamiento de aguas residuales (*Daims y col., 2000; 2001*). Las bacterias nitrito oxidantes son bacterias Gram negativas, 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*).

Comparadas con organismos heterotróficos, las bacterias nitrificantes tienen tasas de crecimiento bajas aun en condiciones óptimas (*Bernet y Spérandio, 2009*).

### I.2.2.2 Bioquímica de la nitrificación

#### I.2.2.2.a Amonio oxidación

Es generalmente aceptado que el amoniaco ( $\text{NH}_3$ ) más que el amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) es el sustrato para las bacterias amonio oxidantes (*Suzuki y col., 1974*). La oxidación de amoniaco ( $\text{NH}_3$ ) a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) es un proceso mediado por dos pasos como se muestra en la Figura 7, descrito por las ecuaciones 3 y 4 (*Kowalchuk y Stephen, 2001*).

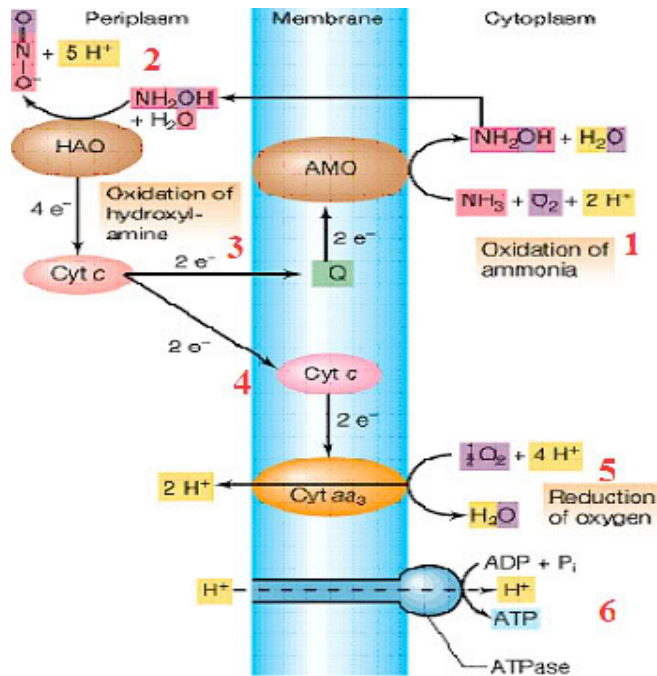
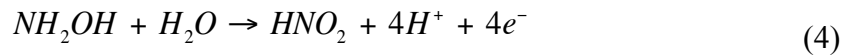
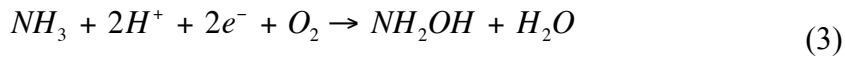
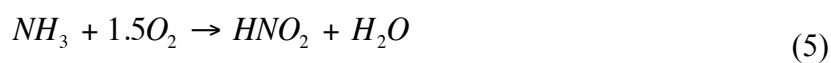


Figura 7. Esquema de la oxidación de amonio a nitrito (Madigan y col., 2003).

La primera reacción es catalizada por la enzima amonio monooxigenasa (AMO) y la segunda por una enzima llamada hidroxilamina oxidorreductasa (HAO). El amonio es usado como un donador 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 son usados para compensar la entrada de electrones de la primera reacción, mientras que los otros dos son llevados mediante una cadena de transporte de electrones a la oxidasa terminal, así se genera una fuerza motriz de protones (Kowalchuk y Stephen, 2001). Esta fuerza motriz de protones es usada como fuente de energía para la producción de ATP. El cambio de energía libre estándar ( $\Delta G^\circ$ ) de la oxidación de amoníaco es  $-275 \text{ kJ/mol}$ .

La siguiente reacción (Ecuación 5) es la reacción global de la oxidación de amoníaco a nitrito:



Puede verse en la ecuación 5 que la oxidación de amoníaco produce agua y esta reacción consume mucho oxígeno: 1.5 moles de oxígeno por mol de amoníaco, lo cual corresponde a 3.43 gramos de oxígeno por gramo de nitrógeno de amoníaco.

La AMO es una enzima localizada en la membrana citoplasmática y es similar en composición, subunidades y secuencias de nucleótidos (aunque no idénticas), a la monooxigenasa de metano (pMMO) de los metanotrofos (*Semrau y col., 1995; Murrell y Holmes, 1996*). *Arp y col. (2002)*, analizando un cultivo de *Nocardioides sp.* CF8 descubrieron un tercer miembro de monooxigenasa. La monooxigenasa que oxida el butano teniendo muchas propiedades parecidas a la AMO y pMMO (*Hamamura y col., 2001*). Se sugiere que la enzima AMO constaría de tres polipéptidos. Un polipéptido de 31.8 kDa al cual se denomina amoA (*Hyman y Arp, 1992*). Se cree que el polipéptido amoA es el sitio catalítico de la oxidación de NH<sub>3</sub>. Un segundo polipéptido (amoB; de 38 kDa) fue purificado (*McTavish y col., 1993*). La evidencia de un tercer polipéptido de la AMO (amoC; de 31.4 kDa) es indirecta. Los genes amoA, amoB y amoC son transcritos con un único ARNm (*Sayavedra-Soto y col., 1998*).

La AMO pierde fácilmente su actividad en la lisis celular, sin embargo, es posible determinar la actividad in vitro (*Ensign y col., 1993*). Evidencias experimentales sugieren que el cobre (Cu) es un cofactor para la AMO, ya que compuestos quelantes del Cu pueden inactivarla (*Bedard y Knowles, 1989*), mientras que la adición de Cu activa la AMO en extractos libres de células (*Ensign y col., 1993*). Un centro de hierro implicado en la oxidación de NH<sub>3</sub> también se ha sugerido (*Zahn y col., 1996*). La caracterización adicional de las proteínas y la composición en metales, así como los detalles del mecanismo catalítico de esta enzima requieren de una purificación con una actividad estable.

La AMO puede oxidar una amplia gama de sustratos, además de NH<sub>3</sub>, incluyendo la oxidación de enlaces C-H, alquil C-H y enlaces C=C (*Hyman y Wood, 1983, 1984, 1985; Hyman y col., 1988; Rasche y col., 1991*) y puede insertar oxidativamente oxígeno C-O-C (*Holland y col., 1985*). Se ha reportado también que puede oxidar el átomo de S de tioéteres para formar sulfóxidos (*Juliette y col., 1993*). Entre los sustratos estudiados, se encuentran: hidrocarburos de alquilo y arilo, hidrocarburos halogenados (*Rasche y col., 1991*), compuestos aromáticos (*Keener y Arp, 1994; McCarty, 1999*), entre otros compuestos.

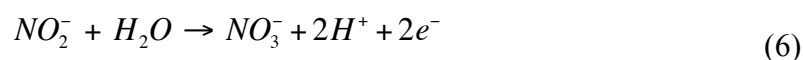
Por otro lado, la HAO se encuentra en el periplasma (Figura 7) y es un homotrímero de subunidades de 64 kDa. Cada subunidad contiene ocho hemos tipo C (*Hooper y col., 1997*). Siete de los hemos están unidos covalentemente a la proteína por dos enlaces tipo tioéter. El

octavo hemo designado P<sub>460</sub>, tiene un enlace covalente adicional a la proteína a través de un residuo de tirosina y se encuentra en el sitio activo de la oxidación de NH<sub>2</sub>OH. La estructura cristalina de HAO ha puesto de manifiesto la orientación de cada subunidad hemo y se ha sugerido posibles vías de flujo de electrones a través de la enzima (*Igarashi y col., 1997*). Los ocho hemos contienen cuatro agrupaciones. Cuatro hemos están involucrados en dos grupos dihemo; dos hemos y el hemo P<sub>460</sub> forman un grupo trihemo, y un grupo hemo es independiente (*Hendrich y col., 2001*). Los pares de hemo funcionan como dos centros redox de electrones en el proceso de transferencia de electrones.

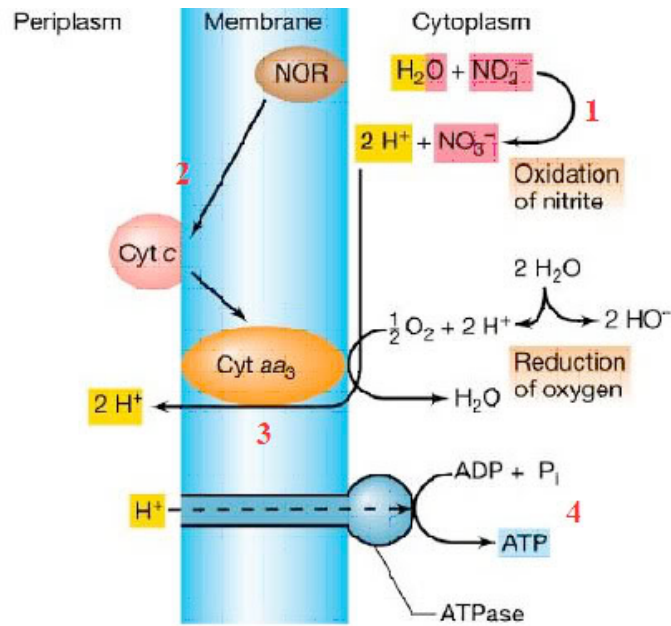
El flujo de electrones de HAO se canaliza a través del citocromo C<sub>554</sub> al citocromo C<sub>m552</sub>, donde se divide hacia la AMO y la oxidasa terminal a través de la ubiquinona (*Whittaker y col., 2000*). En la reacción catalizada por la AMO, un átomo de oxígeno del O<sub>2</sub> se inserta en el NH<sub>3</sub>, mientras que el segundo átomo de O se reduce a H<sub>2</sub>O. Esta reacción requiere dos electrones adicionales. Debido a que el NH<sub>3</sub> es la única fuente reductora de las bacterias amonio oxidantes, los electrones necesarios para la formación de H<sub>2</sub>O deben provenir de la oxidación posterior de NH<sub>2</sub>OH. De los cuatro electrones liberados en la oxidación de NH<sub>2</sub>OH por HAO, dos deben dirigirse a la oxidación de NH<sub>3</sub> y los dos restantes se utilizarán para formar el poder reductor que requieren otros procesos celulares, tales como la biosíntesis y la generación de ATP (*Wood, 1986*).

### **I.2.2.2.b Nitrito oxidación**

El nitrito es oxidado por las bacterias nitrito oxidantes en un sólo paso (Ecuación 6):



Esta reacción es catalizada por la enzima nitrito oxidorreductasa (NOR) (Figura 8). *Aleem y col. (1965)* sugieren que el oxígeno utilizado para oxidar el nitrito a nitrato proviene del agua y no del oxígeno molecular. El nitrito es el donador de electrones de la respiración de las bacterias nitrito oxidantes, mientras que el oxígeno es el aceptor final de electrones. El cambio de energía libre estándar ( $\Delta G^\circ$ ) de la oxidación de nitrito es de sólo -74 kJ/mol. La consecuencia de esto es un bajo rendimiento de crecimiento de estas bacterias comparado con las bacterias amonio oxidantes.



**Figura 8.** Esquema de la oxidación de nitrito a nitrato (Madigan y col., 2003).

La NOR es un complejo enzimático que se encuentra en la membrana citoplasmática (Bock y col., 1991) (Figura 8). La NOR está formada por los citocromos *c* y *a*, una quinona y una deshidrogenasa dependiente del NADH (Aleem y Sewell, 1981). Diversos estudios han proporcionado evidencia que en células enteras o en extractos libres de células de *Nitrobacter*, la oxidación del nitrito se realizó empleando un átomo de oxígeno del agua y no oxígeno molecular (Aleem y Sewell, 1981).

Se ha reportado que la enzima nitrito oxidorreductasa de *Nitrobacter hamburgensis* se compone de heterodímeros compuestos de una  $\alpha$ -subunidad (115-130 kDa) y una  $\beta$ -subunidad (65 kDa) (Spieck y col., 1996). Se ha reportado que una enzima de *Nitrospira moscoviensis* consta de una  $\alpha$ -subunidad (130 kDa) y una  $\beta$ -subunidad (46 kDa) (Spieck y col., 1998).

Un análisis de metales por ICP-AES (espectroscopia de emisión atómica de plasma) reveló que el molibdeno, hierro, zinc y cobre son cofactores de la enzima nitrito oxidorreductasa. Por otro lado, el manganeso, níquel, cobalto no fueron detectados (Meinke y col., 1992).

### 1.2.2.3 Condiciones ambientales que afectan a la nitrificación

Los microorganismos nitrificantes son susceptibles, como todos los demás seres vivos, al ambiente que les rodea. La nitrificación puede verse afectada por la temperatura, el valor de pH, la concentración de oxígeno y la disponibilidad en sustrato o la presencia de compuestos



tóxicos o inhibitorios (*Bernet y Spérandio, 2006*). Considerando lo anterior, es predecible que las enzimas que participan en el proceso respiratorio nitrificante puedan realizar su actividad más lentamente o verse inhibidas bajo ciertas condiciones ambientales. No obstante, los procesos amonio y nitrito oxidantes no serán afectados de la misma manera ya que diferentes microorganismos y enzimas participan en cada ruta. Por lo tanto, es necesario evaluar siempre los dos procesos oxidativos cuando se pretende evaluar la nitrificación bajo diferentes condiciones ambientales. Si el proceso nitrito oxidante es inhibido, se acumula nitrito en los reactores, siendo el nitrito un compuesto tóxico. Queda entonces claro que la nitrificación no puede ser evaluada solamente a través del consumo de amonio y se requiere cuantificar los productos obtenidos, así como las velocidades específicas de la amonio y nitrito oxidación para evaluar cualquier efecto inhibitorio.

### **I.2.2.3.a Efecto de la temperatura sobre la nitrificación**

Al igual que todos los procesos biológicos, la nitrificación se ve influida por la temperatura. Tanto las AOB como las NOB pueden sobrevivir en un intervalo de temperatura de 4-45°C, sin embargo, al ser microorganismos mesófilos, su mejor crecimiento se puede encontrar entre 28 y 36°C (*Bernet y Spérandio, 2009*). La temperatura tiene un efecto en diferentes proporciones en la velocidad de crecimiento de las AOB y NOB. A temperaturas superiores a 15°C, las AOB presentan una velocidad de crecimiento mayor que las NOB (*Bernet y Spérandio, 2009*). Las velocidades de crecimiento de las bacterias nitrificantes disminuyen con la temperatura, sin embargo, la nitrificación es posible a temperaturas tan bajas como 5°C (*Shammas, 1986*). 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 (Ecuación 7) y la respiración (Ecuación 8) puede ser expresado por la ecuación de van't Hoff-Arrhenius (*Bernet y Spérandio, 2009*).

$$\mu = A \cdot e^{(-E_a/RT)} \quad (7)$$

$$q_{s,p} = A \cdot e^{(-E_a/RT)} \quad (8)$$

Donde:  $\mu$  = velocidad específica de crecimiento celular (1/h),  $A$  = constante de Arrhenius,  $E_a$  = energía de activación (J/mol),  $R$  = constante de los gases (J/mol K),  $T$  = temperatura (K),  $q_s$  = velocidad específica de consumo de sustrato (1/h) y  $q_p$  = velocidad específica de formación de producto (1/h).

### I.2.2.3.b Efecto del pH sobre la nitrificación

La conversión óptima de amonio en nitrato en la nitrificación ocurre bajo condiciones neutrales a moderadamente alcalinas (valores de pH de 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 un efecto indirecto sobre la nitrificación influyendo directamente sobre el equilibrio químico entre amonio y amoniaco ( $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ ) ( $\text{pK}_a$  de 9.24 a 25°C según Harris (2003)) y ácido nitroso y nitrito ( $\text{HNO}_2/\text{NO}_2^-$ ) ( $\text{pK}_a$  de 3.34 a 25°C según Whitten y col. (2008)) (Ecuación 9).

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \left( \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \right) \quad (9)$$

Donde:  $\text{pK}_a$  es la constante de disociación del ácido,  $[\text{A}^-]$  es la concentración de la especie básica y  $[\text{HA}]$  es la concentración de la especie ácida.

Anthonsen 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 consumo de amonio por las bacterias amonio oxidantes y sobre la velocidad de producción de nitrato por las bacterias nitrito oxidantes. Estos autores describieron las condiciones bajo las cuales los procesos amonio y nitrito oxidantes podrían ser inhibidos por  $\text{NH}_3$  y  $\text{HNO}_2$ , delimitando regiones límite de acuerdo al pH del medio. Estos autores mencionan que la nitrito oxidación puede ser más sensible al efecto del  $\text{NH}_3$  que la amonio oxidación. Algunos estudios han señalado que el  $\text{NH}_3$  podría ser un inhibidor competitivo de la enzima nitrito oxidoreductasa (Yang y Alleman, 1992). Vadivelu y col. (2006a, 2006b) encontraron que el amonio libre y el ácido nitroso pueden inhibir tanto el crecimiento como la producción de energía en cultivos enriquecidos de *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*.

### I.2.2.3.c Efecto de la concentración de oxígeno sobre la nitrificación

El oxígeno es uno de los sustratos del proceso respiratorio nitrificante, por lo cual debe estar disponible para que pueda llevarse a cabo la nitrificación. Sin embargo, el oxígeno tiene una baja solubilidad (8 mg/L a 25 °C y 1 atm de presión, en agua libre de sales) por lo cual, debe tomarse en cuenta para que no exista una limitación de oxígeno en el sistema que cause una disminución en la velocidad del proceso. Por lo tanto, en reactores nitrificantes, se tiene que mantener una buena transferencia de oxígeno que garantice su disponibilidad. La ecuación 10 muestra el balance, entre la transferencia y el consumo de oxígeno disuelto.

$$\frac{dC}{dt} = k_{La}(C_b - C) - OUR \quad (10)$$

Donde: C es la concentración de oxígeno en el líquido (mg/L), t es el tiempo (h),  $k_{La}$  es el coeficiente de transferencia de oxígeno (1/h),  $C_b$  es la concentración de saturación de oxígeno (mg/L) y OUR (oxygen uptake rate) es la velocidad de consumo de oxígeno por el cultivo (mg/L.h).

La nitrificación se ve afectada con velocidades bajas de consumo de sustrato a bajas concentraciones de oxígeno. *Robinson y col. (2004)* reportaron valores de constante de afinidad ( $K_{O_2}$ ) entre 0.4 y 0.6 mg/L para bacterias nitrificantes. 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  $K_{O_2}$  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 (OD), alrededor de 0.2 a 0.5 mg/L, está limitado el crecimiento y la respiración de las bacterias nitrato oxidantes (*Robinson y col., 2004*). La limitación de oxígeno ha mostrado ser eficiente en sistemas de biopelículas para favorecer el aumento de nitrito por nitrificación parcial (*Bernet y col., 2000*).

### I.2.2.3.d Efecto de la concentración en sustrato sobre la nitrificación

El oxígeno, amonio y nitrito son los sustratos de la nitrificación y si se considera que la velocidad del proceso es una reacción de primer orden respecto a cada sustrato (Ecuación 11),

la velocidad de los procesos amonio y nitrito oxidantes será dependiente de la concentración de sustrato.

$$r = - dS/dt = - k.S \quad (11)$$

Donde: r es la velocidad volumétrica de consumo de sustrato (mg/L.h), S es la concentración en sustrato (mg/L), t es el tiempo (1/h) y k es la constante cinética (1/h).

En sistemas biológicos, se utiliza la ecuación de Monod que relaciona la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ , 1/h) (Ecuación 12), la velocidad específica de consumo de sustrato ( $q_s$ , 1/h) o de formación de producto ( $q_p$ ) (Ecuación 13) con la concentración en sustrato (S, mg/L).

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S} \quad (12)$$

$$q_{s,p} = \frac{q_{\max} S}{K_s + S} \quad (13)$$

Donde  $\mu_{\max}$  es la velocidad específica máxima de crecimiento (1/h),  $q_{\max}$  la velocidad específica máxima de reacción (consumo de sustrato o formación de producto) (1/h) y  $K_s$  la constante de saturación (mg/L).

Los procesos amonio y nitrito oxidantes pueden ser inhibidos por sus respectivos sustratos: amonio y nitrito (*Anthonisen y col., 1976; Noophan y col. 2004; Silva y col., 2011*). De hecho, la eliminación biológica de nitrógeno de aguas residuales con altas concentraciones de amonio o nitrito tiene un problema operacional importante, la inhibición por sustrato de los procesos nitrificantes. Frecuentemente, el modelo de Haldane (Ecuación 14) ha sido usado para determinar la inhibición de la nitrificación por sustrato (*Sheintuch y col., 1995; López-Fiuza y col., 2002*).

$$q = \frac{q_{\max} S}{K_s + S + \frac{S^2}{K_i}} \quad (14)$$

Donde:  $K_i$  es la constante de inhibición por sustrato (mg/L).

Sin embargo, otros modelos pueden ser considerados para describir inhibiciones por sustrato (Aiba y col., 1968; Edwards, 1970; Luong, 1987).

En la Tabla 5, se presentan valores de constantes cinéticas reportadas en la literatura para el proceso nitrificante. Se destaca lo variable que pueden ser los valores bajo las diferentes condiciones experimentales en las que fueron determinadas.

**Tabla 5.** Constantes cinéticas de consorcios nitrificantes bajo distintas condiciones experimentales.

VSS: Volatile Suspended Solids.

Referencia	Inóculo	Método analítico	Amonio oxidación		Nitrito oxidación	
			$K_s$	$V_{max}$ o $q_{max}$	$K_s$	$V_{max}$ o $q_{max}$
Antileo y col. (2002)	Sedimentos	Métodos Estándares	3.0 mg N-NH <sub>3</sub> /L	0.21 mg N/mg VSS·h	--	--
Artiga y col. (2005)	Lodo industrial	Métodos Estándares	0.36 ± 0.08 mg N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /L	2.50 ± 0.18 mg N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /mg VSS·h	0.40 ± 0.08 mg N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /L	2.80 ± 0.60 mg N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /mg VSS·d
	Lodo municipal		0.68 ± 0.15 mg N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /L	1.50 ± 0.30 mg N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /mg VSS·h	0.23 ± 0.02 mg N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /L	1.0 ± 0.17 mg N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /mg VSS·h
Blagodatsky y col. (1998)	Sedimentos	Métodos Estándares	0.647 mg N/mg suelo	0.947 mg N/mg suelo·d	--	--
Brockmann y Morgenroth (2010)	Biopelículas nitrificantes	--	2.4 mg N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /L	--	5.5 mg N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /L	--
Dinçer y Karg (2000)	Consorcio nitrificante	Métodos Estándares	5.14 mg N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /L	1.15 mg N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /L·d	--	--
Dokianakis y col. (2005)	Cultivo nitrito oxidante	Espectrofotometría	--	--	0.24 mg N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /L	0.80 mg N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /mg VSS·d
Guisasola y col. (2005)	Biomasa enriquecida con bacterias nitrificantes	Respirometría	0.74 ± 0.02 mg N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /L	--	1.75 ± 0.1 mg N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /L	--
Cao y col. (2005)	Biomasa inmovilizada (nitrificante y desnitrificante)	Métodos Estándares	30.3 mg N/L	0.096 mg N/L·d	--	--
Güven y col. (2009)	Biomasa nitrificante	Métodos Estándares	0.23 mg N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /L	1.22 mg N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /L·h	1.5 mg N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /L	<0.7 mg N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /L·h
Noophan y col. (2004)	Bacterias nitrito oxidantes	Métodos Estándares	--	--	0.302 mg N/L	0.372 mg N/mg VSS·h
Ordaz y col. (2008)	Biomasa nitrificante	Respirometría	0.48 ± 0.08 mg N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /L	OUR <sub>max</sub> = 53.55 mg O <sub>2</sub> /L·h	--	--
Park y Bae (2009)	Lodo nitrificante de un SBR	--	51.7 mg N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /L	0.96 mg N-NH <sub>x</sub> /mg VSS·d	11.7 mg N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /L	1.73 mg N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /mg VSS·d

Como se puede observar en la Tabla 5, existe una gran variedad de estudios referentes a la determinación de constantes cinéticas tanto para amonio oxidación como nitrito oxidación, lo cual demuestra la importancia de determinar este tipo de parámetros para caracterizar lodos con actividad nitrificante bajo condiciones experimentales bien controladas. La mayoría de los estudios utilizan como modelo base el modelo matemático de Monod o alguna modificación de éste. Sin embargo, las condiciones experimentales utilizadas en los experimentos no son las mismas, comenzando desde la fuente y la historia del inóculo, la concentración celular en los ensayos y/o el tipo de reactores utilizados. Los estudios muestran también diferencias en condiciones ambientales como temperatura, pH y concentración de oxígeno los cuales son factores que modifican la velocidad de ambos procesos (amonio y nitrito oxidante). Por otro lado, se utilizan diferentes métodos analíticos y puede influir en la estimación de los valores de las constantes cinéticas.

Por todo lo anterior, es evidente que se debe tener un mejor control de las condiciones ambientales para determinar las constantes cinéticas. Algunos autores mencionan que la variabilidad en las constantes de afinidad y las velocidades específicas se debe a la concentración celular y en específico a las especies de bacterias nitrificantes que predominan en los lodos con actividad nitrificante, es decir; se menciona que cada especie de bacterias amonio y nitrito oxidantes presenta una afinidad diferente (*Kim y col., 2008*).

Sin embargo, la determinación y comparación de las constantes cinéticas para los procesos amonio y nitrito oxidantes sigue constituyendo una forma específica de caracterizar el comportamiento de lodos con actividad nitrificante bajo diferentes condiciones experimentales, incluyendo en presencia de compuestos tóxicos o inhibitorios (*Lopez-Fiuza y col., 2002; Liwarska-Bizukoje and Bizukoje, 2012; Zhou y col., 2014*).

### **I.2.3 Inhibición de la nitrificación**

La inhibición del proceso nitrificante, incluso parcial, puede causar una interrupción completa 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*).

Para la valoración del efecto de compuestos tóxicos o inhibitorios sobre procesos microbianos aerobios, como lo son los procesos amonio y nitrito oxidantes, se pueden utilizar técnicas basadas en mediciones de oxígeno disuelto (*Surmacz-Gorzka y col., 1996*). Aunque

se puede también utilizar métodos no respirométricos, basados en el consumo de sustratos ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ) y/o la formación de intermediarios y productos de las rutas metabólicas ( $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ) (Grunditz y col., 1998). Es importante destacar que para evaluar los efectos tóxicos de algún compuesto se ha utilizado el parámetro  $\text{IC}_{50}$ , donde se determina la concentración a la cual el compuesto provoca un 50% de disminución en la actividad de los microorganismos (López-Fiuza y col., 2002). Por otro lado, la constante de inhibición  $K_i$  es ampliamente utilizada para la caracterización de la inhibición de algún compuesto sobre la actividad de consorcios microbianos o cultivos axénicos.

### I.2.3.1 Inhibición enzimática

Los inhibidores enzimáticos se dividen en dos grandes clases: los que causan la inactivación irreversible de enzimas y aquellos cuyos efectos inhibitorios se pueden revertir. Los inhibidores de la primera clase suelen provocar una inactivación y/o modificación covalente de la estructura de la enzima. El cianuro es un ejemplo clásico de un inhibidor enzimático irreversible. Por unión covalente de la citocromo oxidasa mitocondrial, inhibe todas las reacciones asociadas con el transporte de electrones. El efecto cinético de los inhibidores irreversibles es disminuir la concentración de la enzima activa, lo que disminuye la concentración máxima posible del complejo enzima-sustrato (ES) y la velocidad de reacción (Segel, 1993).

Los inhibidores reversibles se pueden dividir en cuatro categorías principales: los inhibidores competitivos, inhibidores no competitivos, inhibidores acompetitivos e inhibidores mixtos (Tabla 6). La inhibición mixta se refiere a la combinación de dos tipos reversibles de inhibición enzimática, la inhibición competitiva y la inhibición no-competitiva. El término *mixta* se usa cuando el inhibidor se puede unir tanto a la enzima libre como al complejo enzima-sustrato.

**Tabla 6.** Tipos de inhibidores reversibles y sus efectos (Tabla modificada de *Price, 1999*).

Tipo de inhibidor	Lugar de unión de la enzima	Efecto cinético
Inhibidor Competitivo	Específicamente en el sitio catalítico, donde compete con el sustrato.	Se ve disminuida la afinidad por el sustrato, aumentando la constante de afinidad $K_m$ mientras que $V_{max}$ se mantiene constante.
Inhibidor No-competitivo	Se une a la enzima o al complejo ES en otro sitio que no es el sitio catalítico.	Se ve disminuida la velocidad de reacción $V_{max}$ mientras que $K_m$ se mantiene constante.
Inhibidor Acompetitivo	Se une sólo a los complejos ES en otros lugares distintos al sitio catalítico.	Se ve aumentada la afinidad por el sustrato, disminuyendo la constante de afinidad $K_m$ y disminuye la velocidad de reacción $V_{max}$ .
Inhibidor Mixto	Se puede unir a la enzima libre en el sitio activo o al complejo ES en otros lugares distintos al sitio catalítico.	Se ve disminuida la afinidad por el sustrato, aumentando la constante de afinidad $K_m$ y disminuye la velocidad de reacción $V_{max}$ .

$K_m$ : Constante de afinidad enzima-sustrato y  $V_{max}$ : velocidad máxima de reacción enzimática de acuerdo a la ecuación de Michaelis-Menten (*Segel, 1993*). ES: Complejo enzima-sustrato.

Los inhibidores reversibles más conocidos son los inhibidores competitivos, que siempre se unen en el sitio catalítico o activo de la enzima. La mayoría de los compuestos que alteran la actividad enzimática son de este tipo (*Bisswanger, 2004*). El sello distintivo de todos los inhibidores reversibles es que cuando se agota la concentración del inhibidor, se vuelve a recuperar la actividad enzimática. Normalmente, estos inhibidores se unen a las enzimas por fuerzas no covalentes.

Michaelis y Menten propusieron un modelo para describir la mayoría de las reacciones catalizadas por enzimas (Ecuación 15).

$$V = \frac{V_{max} S}{K_m + S} \quad (15)$$



Donde  $V$  es la velocidad de la reacción enzimática (1/h),  $V_{\max}$  la velocidad máxima de la reacción enzimática (1/h),  $K_m$  la constante de afinidad ES (mg/L) y  $S$  la concentración en sustrato (mg/L).

El inhibidor reversible mantiene un equilibrio con la enzima y la constante de equilibrio para la disociación de los complejos enzima-inhibidor (EI) se conoce como  $K_i$  (Prado-Barragán y col., 1999). La importancia de  $K_i$  es que en todas las reacciones enzimáticas los sustratos e inhibidores interaccionan con las enzimas, por lo cual, las constantes cinéticas ( $K_m$  y  $V_{\max}$ ) de la ecuación de Michaelis-Menten pueden ser alterados (Ecuación 15).

De la misma manera, se puede extrapolar la influencia de  $K_i$  en la ecuación de Monod (Ec. 13) utilizada para describir la velocidad de procesos biológicos. Las ecuaciones 16 (inhibición competitiva), 17 (inhibición no-competitiva), 18 (inhibición acompetitiva) y 19 (inhibición mixta) describen cómo  $K_i$  interviene en la ecuación de Monod.

$$q = \frac{(q_{\max})(S)}{K_s \left(1 + \frac{I}{K'_i}\right) + S} \quad (16)$$

$$q = \frac{\left(\frac{q_{\max}}{1 + \frac{I}{K_i}}\right)(S)}{K_s + S} \quad (17)$$

$$q = \frac{(q_{\max})(S)}{\left(\frac{K_s}{1 + \frac{I}{K''_i}}\right) + S} \quad (18)$$

$$q = \frac{\left(\frac{q_{\max}}{1 + \frac{I}{K_i}}\right)(S)}{K_s \left(1 + \frac{I}{K'_i}\right) + S} \quad (19)$$

Donde:  $I$  es la concentración de inhibidor (mg/L),  $K_i'$  la constante de inhibición competitiva (mg/L),  $K_i$  la constante de inhibición no-competitiva (mg/L) y  $K_i''$  la constante de inhibición acompetitiva (mg/L)

Los efectos de  $K_i$  se observan mejor comparando las constantes cinéticas ( $K_s$  y  $q_{\max}$ ) sin inhibidor con las constantes con inhibidor ( $K_s'$  y  $q_{\max}'$  aparentes). En función de cómo varían las constantes cinéticas en presencia del inhibidor, se puede determinar el tipo de inhibición (Tabla 6). Se puede obtener el valor de  $K_i'$  mediante la ecuación 20 (inhibición competitiva), de  $K_i$  mediante la ecuación 21 (inhibición no-competitiva) y de  $K_i''$  mediante la ecuación 22 (inhibición acompetitiva) (Cornish-Bowden, 2004).

$$K_{s\text{aparente}} = K_s \left( 1 + \frac{I}{K_i'} \right) \quad (20)$$

$$q_{\max\text{aparente}} = \left( \frac{q_{\max}}{1 + \frac{I}{K_i}} \right) \quad (21)$$

$$K_{s\text{aparente}} = \frac{K_s}{1 + \frac{I}{K_i''}} \quad (22)$$

La ecuación de Monod ha sido ampliamente utilizada tanto para consorcios microbianos como cultivos puros, para la caracterización de procesos respiratorios microbianos con la determinación de constantes cinéticas. Sin embargo, en muchos casos, los datos experimentales no muestran un comportamiento que pueda ser descrito por este modelo, por lo cual existe una gran diversidad de modelos para la determinación de constantes cinéticas y constantes de inhibición (Alagappan y Cowan, 2003).

Bajo las semejanzas que tiene el modelo de Monod con la ecuación de Michaelis-Menten, se pueden utilizar los métodos de linealización para la determinación de las constantes cinéticas de acuerdo a las ecuaciones 23, 24 y 25. El método de Lineweaver-Burk formulado por Hans Lineweaver y Dean Burk utiliza la doble recíproca de la ecuación de Michaelis-Menten y la de Monod (Ecuación 23).

$$\frac{1}{q} = \frac{K_s}{q_{\max}} \frac{1}{S} + \frac{1}{q_{\max}} \quad (23)$$

En el modelo de Hanes-Woolf, se representa la relación concentración de sustrato /velocidad de reacción frente a la concentración de sustrato (Ecuación 24).

$$\frac{S}{q} = \frac{1}{q_{\max}} S + \frac{K_s}{q_{\max}} \quad (24)$$

La representación de Hanes-Woolf es preferible a otras linealizaciones ya que distribuye mejor los errores experimentales.

El modelo de Eadie-Hofstee, también llamado de Woolf-Eadie-Augustinsson-Hofstee o de Eadie-Augustinsson, relaciona la velocidad de una reacción con la concentración del sustrato de acuerdo a la ecuación 25.

$$q = q_{\max} - K_s \left( \frac{q_{\max}}{S} \right) \quad (25)$$

Esta representación, contrariamente a la de dobles inversos de Lineweaver-Burk que hace aparecer como buenos malos resultados, hace aparecer como malos, buenos resultados, dificultando grandemente el ocultamiento de puntos que se desvíen de la recta. Por lo que la representación de Eadie-Hofstee es la más adecuada para el estudio de comportamientos que se desvíen del modelo de Monod.

### **1.2.3.2 Efecto de compuestos inhibidores sobre la nitrificación**

Existe información sobre la inhibición de la nitrificación por la presencia de materia orgánica tanto en cultivos axénicos como en lodos nitrificantes, pero con diferente magnitud en función de la clase y de la concentración del compuesto, así como del tipo de cultivo (Gómez y col., 2000). Algunos estudios relacionan el efecto de la materia orgánica con una inhibición en el crecimiento (Jensen, 1950) mientras que otros informan que la materia orgánica puede ocasionar una disminución en las velocidades del proceso respiratorio nitrificante (Zepeda y col. 2003, 2006; Texier y Gómez, 2007; Silva y col., 2009; Silva, 2011).

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 competencia con el  $\text{NH}_3$  por el sitio activo de esta enzima. Otros compuestos, tales como el acetileno 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).

La mayoría de los estudios sobre compuestos inhibitorios de la nitrificación se enfocaron sobre la actividad de la AMO en cultivos axénicos de *Nitrosomonas europaea* (Keener y Arp, 1993, 1994). La información referente a compuestos inhibitorios sobre la actividad de las demás enzimas nitrificantes; es decir, sobre la nitrito oxidoreductasa (NOR) y la hidroxilamina oxidoreductasa (HOR), es aún muy escasa. Sin embargo, se puede encontrar información en la literatura principalmente sobre la nitrito oxidación. La azida es un compuesto inhibitorio específico de la nitrito oxidación, la cual a una concentración de 16.3  $\mu\text{g N}_3^-/\text{L}$  detuvo por completo la oxidación de nitrito a nitrato (López-Fiuza y col., 2002). Por otro lado, el clorato también se ha reportado como un inhibidor específico de la nitrito oxidación, el cual a una concentración de 3  $\mu\text{M}$  detuvo el proceso por completo (Belser y Mays, 1980). Park y Bae (2009) reportaron una constante de inhibición ( $K_i$ ) de 0.8 mg/L de  $\text{NH}_3$  y una  $K_i$  entre 0.08 y 0.3 mg/L de  $\text{HNO}_2$  para la inhibición de la nitrito oxidación. Los mismos autores reportaron una  $K_i$  entre 4.9 y 27.2 mg/L de  $\text{NH}_3$  y una  $K_i$  de 10.6 mg/L de ácido nitroso para la inhibición de la amonio oxidación. Anthonisen y col. (1976) reportaron un intervalo de concentraciones de 60 a 100 mM de ácido nitroso para la inhibición de la amonio oxidación mientras que Vadivelu y col. (2006 a, b) determinaron un intervalo de entre 0.2 y 0.3 mg N/L de ácido nitroso para la inhibición de la nitrito oxidación. Por otro lado, se ha evidenciado que en algunas ocasiones la inhibición por la presencia de materia orgánica en *Nitrobacter* es por represión en la síntesis de oxidoreductasas (Frietag y col., 1987). Es evidente que hace falta más investigación sobre los mecanismos de inhibición sobre las diferentes enzimas nitrificantes para entender mejor cómo son inhibidos los procesos de amonio y nitrito oxidación en la nitrificación (Bejarano y col., 2013).

### I.2.3.3 Compuestos azufrados inhibidores de la nitrificación

*Juliette y col. (1993)* evaluaron la amonio oxidación en cultivos de *Nitrosomonas europaea* en presencia de cuatro compuestos orgánicos azufrados: el disulfuro de carbono (CS<sub>2</sub>), el dimetilsulfuro (DMS), el dimetildisulfuro (DMDS) y el etanotiol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>SH) (Tabla 7). La producción de nitrito a partir de sulfato de amonio o de clorhidrato de hidroxilamina fue determinada con cada compuesto azufrado. Los autores concluyeron que los cuatro fueron compuestos inhibidores de la amonio oxidación, ya que observaron una disminución en la velocidad de oxidación de amoniaco por *N. europaea*. El DMS y el DMDS sólo fueron inhibidores débiles, mientras que el disulfuro de carbono y el etanotiol fueron inhibidores fuertes de la oxidación del amonio en nitrito (Tabla 7). En contraste con los otros compuestos de azufre, sólo el etanotiol inhibió significativamente la oxidación de la hidroxilamina a nitrito, aunque su efecto sobre la oxidación del amoniaco fue mayor que su efecto sobre la oxidación de la hidroxilamina. Estos resultados parecen indicar que la AMO fue más afectada que la HAO por los compuestos azufrados ya que el amonio no fue completamente oxidado a nitrito en presencia de éstos. Los autores concluyeron también que el DMS y DMDS mostraron características inhibitorias del tipo reversible, típicas de sustratos alternos de la AMO ya que mostraron mediante análisis de espectroscopía de masa la inserción de un átomo de oxígeno, mecanismo característico de la actividad de la amonio monooxigenasa. Además, observaron que en presencia de aliltiourea (un inhibidor específico de la AMO), no se registró la oxidación de estos tioéteres. El producto de oxidación del DMS fue el dimetilsulfóxido.




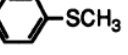
**Tabla 7.** Compuestos azufrados inhibidores de la nitrificación (*Juliette y col., 1993*).

Compuesto azufrado	Cantidad adicionada (µmol)	% Nitrito producido (relativo a células no inhibidas)		% Reversibilidad de la actividad de células inhibidas		% Disminución relativa a la cantidad adicionada
		10 mM NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	2 mM NH <sub>2</sub> OH	AMO	HAO	
CS <sub>2</sub>	0.1	23	95	16	105	ND
DMS	0.5	86	101	103	93	30
DMDS	0.5	76	107	99	102	69
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> SH	0.5	0	64	19	102	63

% **Reversibilidad**: Porcentaje de actividad recuperado una vez que el compuesto azufrado ya no estuvo presente en el medio; **ND**: No determinado.

Posteriormente, en su mismo estudio, *Juliette y col. (1993)* evaluaron el consumo de varios tioéteres en cultivos de *N. europaea* (Tabla 8).

**Tabla 8.** Oxidación de compuestos azufrados por *N. europaea* (*Juliette y col., 1993*).

Compuesto	Estructura	Cantidad (nmol)	Disminución de		Sulfóxido producido		Producto detectado
			sulfuro en 30 min.		en 30 min.		
			(nmol)		(nmol)		
		Sin NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	5mM NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Sin NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	5mM NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>		
Dimetilsulfuro	CH <sub>3</sub> SCH <sub>3</sub>	2000	502±102	1331±117	293±33	1063±124	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> SO
Dietilsulfuro	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> SCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	1000	200±96	757±59	-----	-----	-----
Tetrahidrotiofeno		1000	211±61	832±125	270±23	826±42	
Tiofeno		1000	310±35	882±44	-----	-----	-----
Metilfenilsulfuro		1000	171±139	378±204	196±4	416±9	Ph-S(O)CH <sub>3</sub>
Alilmetilsulfuro	H <sub>2</sub> C=CHCH <sub>2</sub> SCH <sub>3</sub>	1000	290±21	801±39	-----	-----	Alil-S(O)CH <sub>3</sub>
Alilsulfuro	<sup>3</sup> (H <sub>2</sub> C=CHCH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> S	1000	55±88	245±93	-----	-----	-----

Ninguno de los siete tioéteres evaluados mostraron un efecto irreversible en la actividad de las enzimas AMO o HAO, excepto el alilsulfuro. El alilsulfuro inactivó irreversiblemente la actividad de la AMO, pero no afectó la actividad de la HAO. Este resultado indicó que el alilsulfuro tenía propiedades inhibitorias diferentes a los otros tioéteres evaluados. Para cinco de los siete tioéteres, de 66 a 88% del compuesto fue eliminado en presencia de amonio por células de *N. europaea* (Tabla 8). El consumo de los tioéteres disminuyó significativamente cuando se adicionaron inhibidores específicos de la AMO en las suspensiones. Esto indicó que pueden ser sustratos de la AMO. Se presentó una oxidación de tres de los tioéteres evaluados a sus correspondientes sulfóxidos. El conjunto de los resultados presentados por *Juliette y col. (1993)* indica que la AMO podría oxidar el átomo de S de tioéteres para formar sulfóxidos.

Se ha reportado también que las diferentes especies del azufre 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: H<sub>2</sub>S > sulfito > tiosulfato > sulfato (*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 inhibitorio del sulfuro se ha atribuido a fenómenos de permeación del H<sub>2</sub>S 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<sub>2</sub>S 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<sup>-</sup>) o sólo el H<sub>2</sub>S no ionizado es el causante de la inhibición. *Reis y col. (1992)* demostraron que la inhibición del crecimiento de bacterias sulfato reductoras se correlacionaba mejor con el nivel de H<sub>2</sub>S no disociado. Esto está de acuerdo con la teoría que establece que sólo puede penetrar H<sub>2</sub>S a través de la membrana celular bacteriana (*Speece, 1983*) y las observaciones de *O'Flaherty y Collieran (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 HS<sup>-</sup> están en un intervalo de 2 a 64 mg/L (*McCartney y Oleszkiewicz, 1991*) y en el caso de H<sub>2</sub>S varían desde 0.5 hasta 10 mg/L (*Visser y col., 1996*).

#### **I.2.3.4 Inhibición de la nitrificación por sulfuro**

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 más limitados (Tabla 9).

**Tabla 9.** Estudios sobre el efecto del sulfuro sobre la nitrificación (modificado de *Bejarano y col., 2013*).

Concentración de sulfuro (mg/L)	Inóculo	Reactor	OD (mg/L)	Principales efectos	Referencia
0 – 50	Lodos activados con actividad nitrificante 2660–2975 mg SS/L	Lote	≥ 4.0	Inhibición del proceso nitrificante por el sulfuro bajo condiciones anaerobias ( $K_i = 36$ mg S/L)	<i>Zhou y col. (2013)</i>
0 – 100	Biomasa nitrificante 320 ± 16 mg SSV/L	Lote	6.0 – 6.5	Disminución en las velocidades específicas de consumo de $\text{NH}_4^+$ y formación de $\text{NO}_3^-$	<i>Bejarano y col. (2013)</i>
36 – 76 mg $\text{S}^{2-}$ /L.d	Biomasa nitrificante 2.0 g SSV/L	Reactor continuo de tanque agitado	5.0 – 6.0	No hubo efecto negativo sobre la eficiencia de consumo de amonio y el rendimiento en nitrato.	<i>Beristain-Cardoso y col. (2011)</i>
1.7 – 18	Biopelícula nitrificante 3.5 g SSV/L + 0.5 g SIV/L	Lote	4.5 – 5.5	Disminución en las velocidades específicas de consumo de $\text{NH}_4^+$ y formación de $\text{NO}_3^-$	<i>Beristain-Cardoso y col. (2010)</i>
1.3 – 80	Lodo nitrificante 2.7 ± 0.06 g VSS/L	Reactor de lotes secuenciales (SBR)	6.5 – 7.9	Incremento en la relación de acumulación de nitrato $\text{N-NO}_2^-/(\text{N-NO}_2^- + \text{N-NO}_3^-)$	<i>Erguder y col. (2008)</i>
0.5 – 3.6	Lodo nitrificante 1g SSV/L	Lote	2 – 6	Disminución en la velocidad volumétrica de consumo de $\text{NH}_4^+$ .	<i>Sears y col. (2004)</i>
0.5 – 206 0.5 – 2.6	No reportado	Reactor de lecho móvil con biopelícula	5 – 8	Disminución en la velocidad volumétrica de consumo de $\text{NH}_4^+$ .	<i>Æsøy y col. (1998)</i>
323	Mezcla de poblaciones de bacterias nitrificantes y desnitrificantes	Reactor de Tanque agitado aireado con lodos activados	> 6	Disminución en la eficiencia de consumo de $\text{NH}_4^+$ .	<i>Becker y col. (1997)</i>
1.9 o 3.2	Sedimentos de estuarios	Lote	4.8 – 6.4	Disminución en las velocidades específicas de formación de $\text{NO}_2^-$ y $\text{NO}_3^-$	<i>Joye y Hollibaugh (1995)</i>
7.2	No reportado	Reactor de tanque agitado con lodos activados; Reactor de lecho fluidificado y Reactor de lecho empacado	4 – 6	Disminución en la eficiencia de consumo de $\text{NH}_4^+$ .	<i>Martienssen y col. (1995)</i>
2.0 – 5.4	No reportado	Planta de tratamiento de aguas residuales	6 – 8	Disminución en la eficiencia de consumo de $\text{NH}_4^+$ .	<i>Bentzen y col. (1995)</i>

\*SBR: Sequencing Batch Reactor, según sus siglas en inglés o Reactor de lotes secuenciados. SSV: Sólidos Suspendidos Volátiles. SIV: Sólidos Inmovilizados Volátiles. SS: Sólidos Suspendidos.

Se observa que las condiciones experimentales utilizadas en los diferentes estudios son distintas y esto dificulta la comparación de los resultados. Por ejemplo, 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 la mayoría de los trabajos, se muestra que el sulfuro tiene un impacto negativo sobre la nitrificación.

Es interesante notar también que varios estudios utilizan una sola variable de respuesta como la eficiencia o la velocidad volumétrica de consumo en amonio para evaluar la nitrificación y muy pocos 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. Hay que señalar también que en la mayoría de los estudios no 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. 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. 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. Bajo estas condiciones 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. *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  $\mu\text{M}$ . Se ha reportado también 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.

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 82.5 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.

En el estudio realizado por Beristain-Cardoso y col. (2011) en un reactor continuo de tanque agitado, no se observó un efecto negativo del sulfuro (36-76 mg S/L.d) sobre la nitrificación en términos de eficiencia de consumo en amonio y de rendimiento en nitrato, los cuales permanecieron altos a pesar de la adición de sulfuro. Sin embargo, en este estudio, no se determinaron las velocidades específicas de la nitrificación y solamente se evaluó el desempeño del lodo (consumo total del amonio y conversión del mismo en nitrato). Es probable que el sulfuro cause un efecto inhibitorio sobre la nitrificación, disminuyendo las velocidades específicas como Beristain-Cardoso y col. (2010) lo habían reportado en un estudio anterior realizado en cultivos en lote.

Otro trabajo interesante fue el realizado por Zhou y col. (2013), donde se reporta que la adición de 6.2 mg/L de sulfuro bajo condiciones aireadas no provocó efecto inhibitorio sobre la actividad nitrificante. Sin embargo, los mismos autores observaron que, después de una exposición del lodo durante 0.5 h bajo condiciones anaerobias a la misma concentración en sulfuro (6.2 mg S/L), la velocidad específica máxima de crecimiento ( $\mu_{\text{AUT}}$ ) disminuyó 75.9%, concluyendo que la biomasa nitrificante fue más sensible a la presencia de sulfuro soluble bajo condiciones anaerobias. Sin embargo, cabe señalar que en el estudio de Zhou y col. (2013), la variable de respuesta utilizada ( $\mu_{\text{AUT}}$ ) es variable del proceso anabólico (crecimiento celular) y no sería del todo indicada para describir el proceso respiratorio catabólico. Los mismos autores determinaron una  $K_i$  de 36 mg S/L, mostrando que la biomasa utilizada presentaba una alta tolerancia al sulfuro, pero esto podría deberse a que la biomasa nitrificante utilizada provenía de plantas de tratamiento de aguas residuales, la cual podría haberse vuelto más tolerante a compuestos tóxicos. Por otro lado, la forma en que determinaron la constante de inhibición en este estudio no fue correcta y de hecho, de acuerdo con la metodología que utilizaron para determinarla, los mismos autores relacionan esa

constante de inhibición con la  $IC_{50}$  (disminución del 50% en la velocidad específica de consumo en amonio).

Por todo lo anterior, es evidente que hacen falta más estudios enfocados a la fisiología y cinética de consorcios nitrificantes en presencia de sulfuro para entender mejor cómo se ven inhibidos los procesos amonio y nitrito oxidantes en la 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 acerca del efecto inhibitorio del sulfuro sobre la nitrificación para tratar de entender mejor cómo controlar procesos nitrificantes en reactores biológicos que tratan este tipo de efluentes (*Bejarano y col., 2013*).

REACTOR DE  
LOTES SECUENCIADOS

---

---

### I.3. Reactor de lotes secuenciados

Durante los últimos cien años, los procesos de lodos activados convencionales se han utilizado ampliamente para el tratamiento de aguas residuales. El proceso de tratamiento biológico por lodos activados consiste en que las aguas residuales entran constantemente al reactor o aireador en el que se encuentra un cultivo de microorganismos (lodo activado), en su mayoría bacterias en suspensión. El medio ambiente aerobio así como la mezcla de sustratos y microorganismos se mantienen mediante el uso de aireación mecánica o inyección de aire por sopladores. Después de un determinado tiempo de retención, el lodo activado pasa a un tanque de sedimentación, donde se lleva a cabo la separación de microorganismos del agua, la cual sale por la parte superior del tanque, terminando aquí su proceso de tratamiento. Una parte de la biomasa sedimentada es retornada al tanque de aireación para mantener una concentración deseada y la otra es retirada del sistema como desecho (*Mauret y col., 2001*). El proceso de lodos activados se utiliza principalmente para eliminar la materia orgánica del agua (DBO, demanda bioquímica de oxígeno) por vía heterotrófica pero pueden llevarse a cabo también otros procesos biológicos aerobios como la eliminación biológica de fósforo o la oxidación de amonio a nitrito y nitrato por nitrificación. Sin embargo, las condiciones en los sistemas de lodos activados no son siempre favorables a la nitrificación (elevadas concentraciones en compuestos orgánicos inhibitorios, competencia de los microorganismos heterótrofos por el oxígeno con las bacterias nitrificantes) y ésta puede resultar inestable, poco eficiente y/o con bajos rendimientos en nitrato (*Plisson Saune y col., 1996*).

El tratamiento por lodos activados se caracteriza por un consumo de energía relativamente alto y una producción importante de biomasa, lo que conlleva altos costos de operación y problemas con la eliminación de la gran cantidad de lodo producido. El desarrollo tecnológico (mejores técnicas para el tratamiento de aguas residuales como: menor espacio, utilizando un mismo reactor donde se realice la reacción y sedimentación de los lodos activados, y la utilización de bacterias resistentes a compuestos tóxicos presentes en las aguas residuales), la mejora de las condiciones de operación (mayor control de las condiciones ambientales para obtener un proceso estable y eficiente) y la aplicación de las legislaciones estrictas en los últimos años han dado lugar a la sustitución del sistema de lodos activados convencional por el reactor de lotes secuenciales (SBR por sus siglas en inglés, sequencing batch reactor) (*Singh y Srivastava, 2011*). Se ha reportado que los procesos SBR pueden conllevar un ahorro de más del 60% en los gastos con respecto a los procesos de lodos

activados convencionales y lograr una alta calidad de los efluentes en un tiempo de aireación muy corto (Ng y col., 1993). Se ha reportado una eliminación en DBO de más del 90%, mientras que los procesos convencionales son capaces de eliminar del 60 a 95% de la DBO (Tchobanoglous y Burton, 1991). Otros beneficios que se obtienen al utilizar un SBR comparando con sistemas continuos convencionales son la fácil automatización, la gran flexibilidad de operación, el ahorro en espacio y en mantenimiento. Se pueden alcanzar si es requerido, largos tiempos de retención celular y la posibilidad de que la biomasa sea lavada del reactor es menor que en un sistema en continuo (Artan y col., 2001; Mace y Mata-Alvarez, 2002). Se ha estudiado y utilizado el sistema SBR para el tratamiento de una amplia gama de aguas residuales, incluyendo efluentes industriales de composición química compleja (Venkatamohan y col., 2005; Singh y Srivastava, 2011).

### I.3.1 Descripción del sistema SBR

Los reactores SBR son reactores biológicos con biomasa en suspensión, inmovilizada o en gránulos, en los cuales todas las reacciones metabólicas y la separación sólido-líquido se lleva a cabo en un solo tanque y en una secuencia de tiempo bien definido y se repite continuamente (Morgenroth y Wilderer, 2007). Se trata básicamente de un reactor discontinuo que opera bajo una serie de períodos que constituyen un ciclo del SBR (Figura 9).

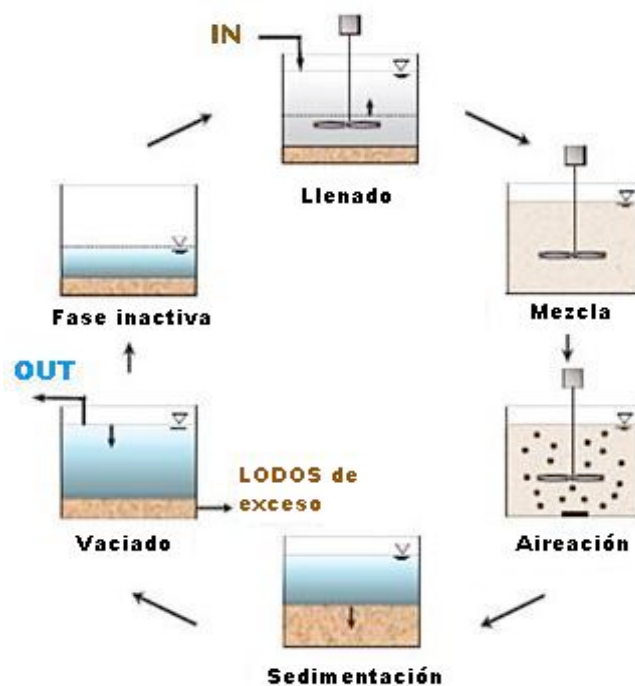


Figura 9. Esquema del reactor de lotes secuenciados.

El ciclo consiste en las siguientes cuatro etapas:

- 1) Llenado: Durante el llenado, se añade el agua a tratar a la biomasa que se queda en el tanque desde el ciclo anterior. El modo de llenado se puede mantener aireado o no aireado dependiendo de las características del agua residual. La longitud del período de llenado depende del número de tanques, el volumen de los SBR y el caudal del efluente. Por lo general, el periodo tiene una duración de 25% del tiempo del ciclo completo.
- 2) Reacción: Durante la fase de reacción, el flujo de las aguas residuales en el tanque se restringe y hay aireación y mezclado continuo. Los procesos biológicos de eliminación de sustratos inician durante el llenado y se terminan durante la fase de reacción. El tiempo de reacción puede superar el 50% del tiempo total del ciclo. El tratamiento puede ser aerobio, anaerobio o con fases alternadas de condiciones anóxicas y aeróbicas.
- 3) Sedimentación: Durante esta fase, se detienen la agitación y la aireación sin ninguna entrada o salida de líquido. Estas condiciones dan lugar a la separación sólido-líquido por sedimentación. Este período tiene una duración del 15% del tiempo del ciclo.
- 4) Drenado: Después de la fase de sedimentación, el sobrenadante clarificado se descarga del reactor como efluente. El drenado debe ser diseñado y operado de manera que se limite la pérdida de biomasa del tanque. El tiempo dedicado al drenado puede variar desde 5 a 30% del tiempo total del ciclo (*Coelho y col., 2000*).

Puede haber dos o más ciclos por día, dependiendo de las estrategias operativas deseadas (concentración y toxicidad de contaminantes, concentración de biomasa, entre otros).

El tratamiento por lodos activados se caracteriza por un consumo de energía relativamente alto y una producción importante de biomasa, lo que conlleva altos costos de operación y problemas con la eliminación de la gran cantidad de lodo producido. Los reactores SBR han demostrado ser una alternativa viable con respecto a los sistemas de flujo continuo en la eliminación biológica de nutrientes (N, P) mediante la alternancia de condiciones anóxicas y aerobias en un solo tanque durante un ciclo de tratamiento (*Hosomi y col., 1989; Yilmaz y Ozturk, 2003; Laitinen y col., 2006*).

A través de la manipulación de los diferentes períodos en un ciclo de operación, el sistema puede también lograr la eliminación biológica de compuestos orgánicos recalcitrantes

(Moreno y Buitrón, 2004). La exposición periódica de los microorganismos a las condiciones de proceso definidas se logra de manera efectiva en un sistema SBR en el cual el tiempo, la frecuencia y las concentraciones de exposición del lodo a los diferentes contaminantes, se pueden configurar independientemente del patrón de flujo de entrada (Wilderer y col., 2001). Los cambios químicos que tienen lugar debido a la actividad microbiana se pueden detectar a través de la monitorización en línea del pH, oxígeno disuelto (OD) y potencial de oxidoreducción (POR). La simulación y el modelado han sido utilizados para optimizar el sistema SBR para la eliminación de la demanda química de oxígeno (DQO) y nitrógeno mediante el ajuste del OD (Azwar y Hussain, 2008).

### **I.3.2 Reactores SBR nitrificantes**

El SBR es ampliamente utilizado en el tratamiento de aguas residuales, incluyendo el tratamiento biológico por nitrificación y desnitrificación (Yong-Ho, 2006). En la literatura, se pueden encontrar varios estudios con SBR que involucran la eliminación de amonio y materia orgánica (Calli y col., 2003; Bae y col., 2004). La mayoría acoplan los procesos biológicos de nitrificación y desnitrificación aprovechando la alta flexibilidad de operación que presenta el sistema SBR donde pueden combinarse fases de aireación y no aireación en la fase de reacción.

Por otra parte, el sistema SBR puede constituir también una herramienta valiosa para el estudio básico de procesos metabólicos microbianos bajo diferentes condiciones de cultivo. En particular, permite desarrollar estudios cinéticos a través de los ciclos de operación. Texier y Gómez (2004) realizaron estudios cinéticos de la nitrificación en un reactor SBR que mostraron la estabilidad de la actividad de un consorcio nitrificante a través de los ciclos de operación. Posteriormente, observaron en presencia de un inhibidor orgánico como el *p*-cresol, un incremento en las velocidades específicas de consumo de carbono orgánico total y una consecuente disminución en la inhibición de la nitrificación conforme aumenta el número de ciclos, sugiriendo una adaptación metabólica de los microorganismos responsables de la oxidación del *p*-cresol (Texier y Gómez, 2007; Silva y col., 2014). De forma similar, varios autores observaron la disminución del efecto inhibitorio sobre la nitrificación a través de los ciclos de operación en sistemas SBR de diferentes contaminantes, tales como el *m*-cresol (Zepeda y col., 2013), el *p*-hidroxibenzaldehído (Téllez-Pérez y col., 2013), el 2-clorofenol



(Martínez, 2013). La mayoría de los autores reportaron que fue posible realizar la eliminación simultánea de amonio por vía nitrificante y del compuesto inhibitorio en el mismo reactor.

Estos resultados mostraron que el reactor SBR, además de permitir la acumulación de la biomasa en el tanque, propicia un aumento en la actividad metabólica del lodo que se manifiesta a través de velocidades específicas mayores. Esto permite alcanzar velocidades volumétricas de consumo en sustratos cada vez mayores.

Muy poco se sabe del efecto inhibitorio de la adición de sulfuro en reactores SBR nitrificantes y es necesario investigar más sobre la fisiología y cinética de consorcios nitrificantes en este tipo de reactores alimentados con amonio y sulfuro. Información de ese tipo ayudaría a controlar mejor sistemas nitrificantes que tengan contacto con el sulfuro.

# BIBLIOGRAFÍA

---

---

1. Ahn Y.H. (2006). Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: A review. *Process Biochem.* **41**: 1709 - 1721.
2. Aiba S., Shoda M. y Nagatani M. (1968). Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* **10**: 845 - 64.
3. Alagappan G. y Cowan R. (2003). Substrate Inhibition Kinetics for Toluene and Benzene Degrading Pure Cultures and a Method for Collection and Analysis of Respiriometric Data for Strongly Inhibited Cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **83**: 798 - 809.
4. 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.
5. Aleem M.I.H., Hoch G.E. y Varner J.E. (1965). Water as the source of oxidizing and reducing power in bacterial chemosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* **5**: 869-873
6. Aleem M.I.H. y Sewell D.L. (1981). Mechanism of nitrite oxidation and oxidoreductase systems in *Nitrobacter agilis*. *Curr. Microbiol.* **5**: 267 - 272.
7. Anderson D.M., Gilbert P.M. y Burkholder J.M. (2002). Harmful algal blooms and eutrophication: nutrient sources, composition and consequences. *Estuaries* **25**: 704 - 726.
8. Annachhatre A.P. y Suktrakoolvait S. (2001). Biological Sulfate Reduction Using Molasses as a Carbon Source. *Water Environ. Res.* **73**: 118 - 126.
9. Anthonisen A.C., Loehr R.C., Prakasam T.B.S. y Srinath E.G. (1976). Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *J. Wat. Pollut. Control. Fed.* **48**: 835 - 852.
10. Antileo C., Aspé E., Urrutia H., Zaror C. Y Roeckel M. (2002). Nitrifying biomass acclimation to high ammonia concentration. *J. Envir. Eng.* **128**: 367 - 375.
11. Apaydin O., Kurt U. y Gonullu M.T. (2009). An investigation on the tannery wastewater by electrocoagulation. *Global NEST J.* **11**: 546 - 555.
12. Arp D.J., Sayavedra L.A., Norman S. y Hommes G. (2002). Molecular biology and biochemistry of ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea*. *Arch. Microbiol.* **178**: 250 - 255.
13. Artan N., Wilderer P., Orhon D., Morgenroth E. y Özgür N. (2001). The mechanism and design of sequencing batch reactor systems for nutrient removal — the state of the art. *Water Sci. Technol.* **43**: 53 - 60.

14. Artiga P., González F., Mosquera-Corral A., Camposa, J.L., Garrido J.M., Ficara E. y Méndez R. (2005). Multiple analysis reprogrammable titration analyser for the kinetic characterization of nitrifying and autotrophic denitrifying biomass. *Biochem. Engin. J.* **26**: 176 - 183.
15. Æsøy, A., Odegaard, H. y Bentzen, G. (1998). The effect of sulphide and organic matter on the nitrification activity in a biofilm process. *Water Sci. Technol.* **37**: 115 - 122.
16. ATSDR, (2004). Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades División de Toxicología 1600 Clifton Road NE, Mailstop F-32 Atlanta, GA 30333 <http://www.atsdr.cdc.gov/es> en español.
17. Azwar M.A. y Hussain K.B. (2008). Modeling and Dynamic Simulation of Activated Sludge Process in Sequencing Batch Reactor. *Asia-Pacific. J. Chem. Eng.* **13**: 675 - 686.
18. Bae J.H., Lee I.S., Jang M.S., Ahn K.H. y Lee S.H. (2004) Treatment of landfill leachate by a pilot-scale modified Ludzack-Ettinger and sulfur-utilizing denitrification process. *Water Sci. Technol.* **50**: 141 - 148.
19. Bazylinski D.A. y Blakemore R.P. (1983). Denitrification and assimilatory nitrate reduction in *Aquaspirillum magnetotacticum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**: 1118 - 1124.
20. Becker M., Martienssen M., Fuhrmann B. y Spohn U. (1997). Analyzing nitrogen and sulphide elimination from leachate by coulometric continuous flow titration. *ACTA Biotechnol.* **17**: 39 - 50.
21. Bedard C. y Knowles R. (1989). Physiology, biochemistry, and specific inhibitors of CH<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, and CO oxidation by methanotrophs and nitrifiers. *Microbiol. Rev.* **53**: 68 - 84.
22. Bejarano Ortiz D.I., Thalasso F., Cuervo López F.M., Texier A.-C. (2013). Inhibitory effect of sulfide on the nitrifying respiratory process. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **88**: 1344 - 1349.
23. Belser L.W. y Mays E.L. (1980). Specific inhibition of nitrite oxidation by chlorate and its use in assessing nitrification in soils and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**: 505 - 510.
24. Bentzen G., Smith A.T., Bennett D., Webster N.J., Reinholt F., Sletholt E. y 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**: 293 - 302.
25. Beristain-Cardoso R., Gómez J., Méndez-Pampín R. (2010). The behavior of nitrifying sludge in presence of sulfur compounds using a floating biofilm reactor. *Biores. Technol.* **101**: 8593 - 8598.
26. Beristain-Cardoso R., Pérez-González D.N., González-Blanco G. y Gómez J. (2011). Simultaneous oxidation of ammonium, *p*-cresol and sulfide using a nitrifying sludge in a

- multipurpose bioreactor: A novel alternative. *Biores. Technol.* **102**: 3623 - 3625.
27. Beristain-Cardoso R., Texier A.C., Razo-Flores E., Méndez-Pampín R. y Gómez J. (2009). Biotransformation of aromatic compounds from wastewaters containing N and/or S, by nitrification/denitrification: a review. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **8**: 325 - 342.
28. Bernet N., Peng D., Delgenés J.P. y Moletta R. (2000). Nitrification at low oxygen concentration in biofilm reactor. *J. Environ. Eng.-ASCE.* **127**: 266 - 271.
29. Bernet N. y Spérandio M. (2006). Application of biological treatment systems for nitrogen-rich wastewaters. En: *Advanced Biological Treatment Processes for Industrial Wastewaters*, F. Cervantes, S. Pavlostathis, and A. van Haandel (ed.), IWA Publishing, London. 186 - 208.
30. Bernet N. y Spérandio M. (2009). Principles of nitrifying processes. En: *Environmental Technologies to Treat Nitrogen Pollution*, 1<sup>a</sup> ed., Cervantes F.J., IWA Publishing, London. 23 - 37.
31. Bisswanger H. (2004). *Enzyme kinetics: principles and methods*. Weinheim (Germany) Wiley-VCH. 1st ed., 1st rep.
32. Blagodatsky S.A., Yevdokimov I.V., Larionova A.A. y Richter J. (1998). Microbial growth in soil and nitrogen turnover: model calibration with laboratory data. *Soil Biol. Biochem.* **30**: 1757 - 1764.
33. Bock E., Koops H.P., Harms H. y Ahlers B. (1991). The biochemistry of nitrifying microorganisms. *Variations in Autotrophic Life*. Editorial Academic press. Londres. 171 - 200.
34. Breitburg D. (2002). Effects of hypoxia, and the balance between hypoxia and enrichment, on coastal fishes and fisheries. *Estuaries.* **25**: 767 - 781.
35. Brockmann D. y Morgenroth E. (2010). Evaluating operating conditions for outcompeting nitrite oxidizers and maintaining partial nitrification in biofilm systems using biofilm modeling and Monte Carlo filtering. *Water Res.* **44**: 1995 - 2009.
36. Calli B., Tas N., Mertoglu B., Inanc B. y Ozturk I. (2003) Molecular analysis of microbial communities in nitrification and denitrification reactors treating high ammonia leachate. *J. Environ. Sci. Heal. A.* **38**: 1997 - 2007.
37. Camargo J.A. y Alonso A. (2006). Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: a global assessment. *Environ. International.* **32**: 831 - 849.
38. Cao G., Zhao Q., Sun X. y Zhang T. (2005). Characterization of nitrifying and denitrifying bacteria coimmobilized in PVA and kinetics model of biological nitrogen removal by coimmobilized cells. *Enz. Microbiol. Technol.* **30**: 49 - 55.

39. Capó M. y Miguel A. (2004) Principios de Ecotoxicología. Diagnóstico, Tratamiento y Gestión del Medio Ambiente. McGraw Hill. España.
40. Catling D.C. y Zahnle K.J. (2009). Pérdidas en las atmósferas planetarias. Investigación y ciencia. *Scientific American*. **394**: 14 - 22.
41. Cerhan J.R., Weyer P.J., Janney C.A., Lynch C.F. y Folsom A.R. (2001). Association of nitrate levels in municipal drinking water and diet with risk of coronary heart disease mortality: the Iowa Women's Health Study. *Epidemiology*. **12**: S84 - 457.
42. Cervantes-Carrillo F., Pérez J. y Gómez J. (2000). Avances en la eliminación biológica de nitrógeno de las aguas residuales. *Rev. Latinoam. Microbiol.* **42**: 73 - 82.
43. Cervantes F.J. (2009). Anthropogenic sources of N-pollutants and their impact on the environment and on public health. In: Environmental Technologies to Treat Nitrogen Pollution, Ed. F. J. Cervantes, IWA Publishing, London, UK, Chapter **1**, pp. 1 - 23.
44. Coelho M.A.Z., Russo C. y Araujo O.Q.F. (2000). Optimization of a sequencing batch reactor for biological nitrogen removal. *Wat. Res.* **34**: 2809 - 2817.
45. Cork J., Jerger D. y Maka A. (1986). Biocatalytic production of sulfur from process waste streams. *Biotechnol. Bioenerg. Symp. Ser.* **16**: 149 - 162.
46. Cornish-Bowden A. (2004). Fundamentals of enzyme kinetics. London: Portland Press, 3rd Ed.
47. Cuervo-López F., Martínez Hernández S., Texier A.-C. y Gómez J. (2009). Principles of denitrifying processes. In: Environmental Technologies to Treat Nitrogen Pollution, Ed. F. J. Cervantes, IWA Publishing, London, UK, Chapter **3**: 41 - 65.
48. Daims H., Nielsen J.L., Nielsen P.H., Schleifer K.H. y Wagner M. (2001). In situ characterization of *Nitrospira*-like nitrite oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 5273 - 5284.
49. Daims H., Nielsen P.H., Nielsen J.L., Juretschko S. y Wagner M. (2000). Novel *Nitrospira*-like bacteria as dominate nitrite-oxidizers in biofilms from wastewater treatment plants: diversity and in situ physiology. *Water Sci. Technol.* **41**: 85 - 90.
50. De Boer W. y Kowalchuk G.A. (2001). Nitrification in acid soils: micro-organisms and mechanisms. *Soil Biol. Biochem.* **33**: 853 - 866.
51. Delwiche C.C. (1982). Denitrification, Nitrification and Atmospheric Nitrous Oxide. edition F, editor. New York, USA: John Wiley & Sons, Inc.
52. Devai I. y DeLaune R.D. (1999). Emission of reduced malodorous sulfur gases from wastewater treatment plants. *Water Environ. Res.* **71**: 203 - 208.

53. Diaz R.J. y Rosenberg R. (1995). Marine benthic hypoxia: a review of its ecological effects and the behavioral responses of benthic macrofauna. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* **33**: 245 - 303.
54. Dinçer A.R. y Karg F. (2000). Kinetics of sequential nitrification and denitrification processes. *Enz. Microb. Technol.* **27**: 37 - 42.
55. Dokianakis S.N., Kornaros M. y Lyberatos G. (2005). Effect of Wall Growth on the Kinetic Modeling of Nitrite Oxidation in a CSTR. *Biotechnol. Bioeng.* **93**: 718 - 726.
56. Dorsch M.M., Scragg R.K.R., McMichel A.J., Baghurst P.A. y Dyer K.F. (1984). Congenital malformations and maternal drinking water supply in rural south Australia: a case-control study. *Am. J. Epidemiol.* **119**: 473 - 486.
57. Durai G. y Rajasimman M. (2011). Biological treatment of tannery wastewater: a review. *J. Environ. Sci. Technol.* **4**: 1 - 17.
58. Edwards V.H. (1970). The influence of high substrate concentration on microbial kinetics. *Biotechnol. Bioeng.* **12**: 679 - 712.
59. Ensign S.A., Hyman M.R. y Arp D.J. (1993). In vitro activation of ammonia monooxygenase from *Nitrosomonas europaea* by copper. *J. Bacteriol.* **175**: 1971 - 1980.
60. Erguder T.H., Boon N., Vlaeminck SE. y Verstrate W. (2008). Partial nitrification achieved by pulse sulfide doses in a sequential batch reactor. *Environ. Sci. Technol.* **42**: 8715 - 8720.
61. Freitag A., Rudert M. y Bock E. (1987). Growth of *Nitrobacter* by dissimilatoric nitrate reduction. *FEMS Microbiol. Lett.* **48**: 105 - 109.
62. Fwetrell L. (2004). Drinking-water nitrate, methemoglobinemia, and global burden of disease: a discussion. *Environ. Health Perspect.* **112**: 1371 - 1374.
63. Gieseke A., Tarre S., Green M. y 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.
64. Gómez J., Méndez J.R. y Lema J.M. (2000). Kinetic study of addition of volatile organic compounds to a nitrifying sludge. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **88**: 1 - 12.
65. Greer F.R. y Shannon M. (2005). Infant methemoglobinemia: the role of dietary nitrate in food and water. *Pediatrics* **116**: 784 - 786.
66. Grunditz C., Gumaelius L. y Dalhammar G. (1998). Comparison of inhibition assays using nitrogen removing bacteria: Application to industrial wastewater. *Water Res.* **32**: 2995 - 3000.
67. Guisasola A., Jubany I., Baeza J.A., Carrera J. y Lafuente J. (2005). Respirometric estimation of the oxygen affinity constants for biological ammonium and nitrite oxidation. *J. Chem.*

- Technol. Biotechnol.* **80**: 388 - 396.
68. Gupta M. y Sharma K. (1996): "Environmental operations management: an opportunity for improvement". *Prod. Inv. Manage. J.* **37**: 40 - 46.
69. Güven D., Kutlu O., Insel G. y Sözen S. (2009). Model-based process analysis of partial nitrification efficiency under dynamic nitrogen loading. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **32**: 655 - 661.
70. Hamamura N., Yeager C. y Arp D.J. (2001). Two distinct monooxygenases for alkane oxidation in *Nocardioides sp.* strain CF8. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 4992 - 4998.
71. Harris D.C. (2003). Análisis Químico Cuantitativo. 3ra edición. Editorial:Reverté. Apéndice G pp. AP-13.
72. Hendrich M.P., Petasis D., Arciero D.M. y Hooper A.B. (2001). Correlations of structure and electronic properties from EPR spectroscopy of hydroxylamine oxidoreductase. *J. Am. Chem. Soc.* **123**: 2997 - 3005.
73. Henze M. (2002). Basic biological processes. En: Wastewater treatment – Biological and Chemical Processes. *Springer.* 65 - 129.
74. Hill J.W. y Petrucci R.H. (1996). General Chemistry. Prentice Hall. 896 pag.
75. Holland H.L., Popperl, H., Ninnis R.W. y Chenchaiiah C. (1985). The oxidation of organic sulphides by *Mortierella isabellina*. 2. Effects of substituents on the stereochemistry of sulphoxide formation. *Can. J. Chem.* **63**: 1118 - 1120.
76. Holt J., Krieg N., Sneath P., Staley J. y Williams S. (1994). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Novena edición. William & Hensyl. 436 - 451.
77. Hooper A.B., Vannelli T., Bergmann D.J. y Arciero D.M. (1997). Enzymology of the oxidation of ammonia to nitrite by bacteria. *A. Van Leeuw.* **71**: 59 - 67.
78. Hosomi M., Matsusige K., Inamori Y., Sudo R., Yamada K. y Yoshino Z. (1989). Sequencing batch reactor activated sludge processes for the treatment of municipal landfill leachate: Removal of nitrogen and refractory organic compounds. *Water Sci. Technol.* **21**: 1651 - 1654.
79. Hyman M.R., y Wood P.M. (1983). Methane oxidation by *Nitrosomonas europaea*. *Biochem. J.* **212**: 31 - 37.
80. Hyman M.R., y Wood P.M. (1984). Ethylene oxidation by *Nitrosomonas europaea*. *Arch. Microbiol.* **137**: 155 - 158.
81. Hyman M.R. y Wood P.M. (1985). Suicidal inactivation and labelling of ammonia monooxygenase by acetylene. *Biochem. J.* **227**: 719 - 725.
82. Hyman M.R., Murton I.B. y Arp D.J. (1988). Interaction of ammonia monooxygenase from



- Nitrosomonas europaea* with alkanes, alkenes, and alkynes. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 3187 - 3190.
83. Hyman M.R. y Arp D.J. (1992).  $^{14}\text{C}_2\text{H}_2$ - and  $^{14}\text{CO}_2$ -labelling studies of the de novo synthesis of polypeptides by *Nitrosomonas europaea* during recovery from acetylene and light inactivation of ammonia monooxygenase. *J. Biol. Chem.* **267**: 1534 - 1545.
84. Igarashi N., Moriyama H., Fujiwara T., Fukumori Y. y Tanaka N. (1997). The 2.8 Å structure of hydroxylamine oxidoreductase from a nitrifying chemoautotrophic bacterium, *Nitrosomonas europaea*. *Nat. Struct. Biol.* **4**: 276 - 284.
85. Janssen A. (1996). Formation and colloidal behavior of elemental sulphur produced from biological oxidation of hydrogenosulfide. PhD thesis, Wageningen, The Netherlands.
86. Janssen A., Ma C., Lens P. y Lettinga G. (1997). Performance of a sulphide oxidizing expanded bed reactor with a spatially separated aeration unit. *Biotechnol. Bioeng.* **53**: 32 - 40.
87. Jayamohan S., Ohgaki S. y Hanaki K. (1988). Effect of DO on kinetics of nitrification. *Water Supply.* **6**: 141 - 150.
88. Jensen H.L. (1950). Effect of organic compounds on *Nitrosomonas*. *Nature.* **165**: 968 - 974.
89. Joye S.B. y Hollibaugh J.T. (1995). Influence of sulfide inhibition of nitrification on nitrogen regeneration in sediments. *Science.* **270**: 623 - 625.
90. Juliette L., Hyman M. y 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 - 727.
91. Keener W.K. y Arp D.J. (1993). Kinetic studies of ammonia monooxygenase inhibition in *Nitrosomonas europaea* by hydrocarbons and halogenated hydrocarbons in a optimizer whole-cell assay. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 2501 - 2510.
92. Keener W.K. y Arp D.J. (1994). Transformations of aromatic compounds by *Nitrosomonas europaea*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 1914 - 1920.
93. Kim M.Y., Park D., Lee S-D. y Park J.M. (2008). Inhibitory effects of toxic compounds on nitrification process for cokes wastewater treatment. *J. Hazard. Mater.* **152**: 915 - 921.
94. Knobloch L., Salna B., Hogan A., Postle J. y Anderson H. (2000). Blue babies and nitrate-contaminates well water. *Environ. Health Perspect.* **108**: 675 - 678.
95. Knowles R. (1982). Denitrification. *Microbiological Rev.* **46**: 43 - 70.
96. Kowalchuk G.A. y Stephen J.R. (2001). Ammonia-oxidizing bacteria: A model for molecular microbial ecology. *Ann. Rev. Microbiol.* **55**: 485 - 529.
97. Laanbroek H.J. y 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.
98. Laitinen N., Luonsi A. y Vilen J. (2006) Landfill leachate treatment with sequencing batch reactor and membrane bioreactor. *Desalination* **191**: 86 - 91.
99. Lens P. y Kuenen J. (2001). The biological sulfur cycle: novel opportunities for environmental biotechnology. *Water Sci. Technol.* **44**: 57 - 66.
100. Leta S., Assefa F., Gumaelius L. y Dalhammar G. (2004). Biological nitrogen and organic matter removal from tannery wastewater in pilot plant operations in Ethiopia. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **66**: 333 - 339.
101. Lin Y.M., Tay J-H., Liu Y. y Hung Y-T. (2009). Biological nitrification and denitrification processes. En: *Biological treatment processes*, volumen 8. Editorial: Humana Press. pp 539 - 580.
102. Liwarska-Bizukojc E. y Bizukojc M. (2012). A new approach to determine the kinetic parameters for nitrifying microorganisms in the activated sludge systems. *Biores. Technol.* **109**: 21 - 25.
103. López-Fiuza J., Buys B., Mosquera-Corral A., Omil R. y Méndez R. (2002). Toxic effects exerted on methanogenic, nitrifying and denitrifying bacteria by chemicals used in a milk analysis laboratory. *Enz. Microb. Technol.* **31**: 976 - 985.
104. Luca D., Luca V., Cotor F. y Rileanu L. (1987). In vivo and in vitro cytogenetic damage induced by sodium nitrite. *Mutat. Res.* **189**: 333 - 340.
105. Luong J.H.J. (1987). Generalization of Monod kinetics for analysis of growth data with substrate inhibition. *Biotechnol. Bioeng.* **29**: 242 - 8.
106. Mace S. y Mata-Alvarez J. (2002). Utilization of SBR technology for wastewater treatment: An overview. *Ind. Eng. Chem. Res.* **41**: 5539 - 5553.
107. Madigan M., Martinko J. y Parker J. (2003). *Brock Microbiología de los Microorganismos*. 20ª edición. Editorial Pearson. Prentice Hall. Madrid. 359 - 360.
108. Martínez M. (2013). Evaluación del efecto del 2-clorofenol en la nitrificación utilizando un reactor de lote secuenciado (SBR). Tesis de Especialidad en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México.
109. Martienssen M., Schulze R. y Simon J. (1995). Capacities and limits of three different technologies for the biological treatment of leachate from solid waste landfill sites. *ACTA Biotechnol.* **15**: 269 - 276.
110. Mauret M., Ferrand F., Boisdon V., Spérandio M. y Paul E. (2001). Process using DO and

- ORP signals for biological nitrification and denitrification: validation of a food-processing industry wastewater treatment plant on boosting with pure oxygen. *Water Sci. Technol.* **44**: 163 - 170.
111. McCartney D.M. y Oleszkiewicz J.A. (1991). Sulfide inhibition of anaerobic degradation of lactate and acetate. *Water Res.* **25**: 203 - 209.
112. McCarty G.W. (1999). Modes of action of nitrification inhibitors. *Biol. Fertil. Soils.* **29**: 1 - 9.
113. McTavish H., Fuchs J.A. y Hooper A.B. (1993). Sequence of the gene coding for ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea*. *J. Bacteriol.* **175**: 2436 - 2444.
114. Meincke M., Bock E., Kastrau D. y Kroneck P.M.H. (1992). Nitrite oxidoreductase from *Nitrobacter hamburgensis*: redox centers and their catalytic role. *Arch. Microbiol.* **158**: 127 - 131.
115. Meyer F., Galan P. y Douville P. (2005). Antioxidant vitamin and mineral supplementation and prostate cancer prevention. *Int J Cancer.* **116**: 182 - 186.
116. Moreno G. y Buitrón G. (2004). Influence of the origin of the inoculum and the acclimation strategy on the degradation of 4-chlorophenol. *Biores. Technol.* **94**: 215 - 218.
117. Morgenroth E. y Wilderer P.A. (2007). Sequencing Batch Reactor Technology: Concepts, Design and Experiences (*Abridged*). *Water Environ. J.* **12**: 314 - 320.
118. Murrell J.C. y Holmes A.J. (1996). Molecular biology of particulate methane monooxygenase. In: Lidstrom ME, Tabita FR (eds) Microbial growth of C<sub>1</sub> compounds. Kluwer, Dordrecht. 133 - 140.
119. Nagpal S., Chuichulcherm S., Livingston A. y Peeva L. (2000). Ethanol utilization by sulfate-reducing bacteria: an experimental and modeling study. *Biotechnol. Bioeng.* **70**: 533 - 543.
120. Neculita C.M., Zagury G.J. y 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.
121. Ng W.J., Sim T.S., Ong S.L., Ng K.Y., Ramasamy M. y Tan K.N. (1993). Efficiency of sequencing batch reactor (SBR) in the removal of selected microorganisms from domestic sewage. *Water Res.* **27**: 1591 - 1600.
122. Nielsen A.H., Vollertsen J. y Hvitved-Jacobsen T. (2003). Determination of kinetics and stoichiometry of chemical sulfide oxidation in wastewater of sewer networks. *Environ. Sci. Technol.* **37**: 3853 - 3858.
123. Noophan P., Figueroa L.A., Munakata-Marr J. (2004). Nitrite oxidation inhibition by hydroxylamine: experimental and model evaluation. *Water Sci. and Technol.* **50**: 295–304.

124. O'Flaherty V. y Colleran E. (1998). Effect of sulphate addition on volatile fatty acid and ethanol degradation in an anaerobic hybrid reactor. I: Process disturbance and remediation. *Biores. Technol.* **68**: 101 - 107.
125. Okabe S., Nielsen P.H. y 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.
126. Olmos A., Olguin P., Fajardo C., Razo E. y Monroy O. (2004). Physicochemical characterization of spent caustic from the OXIMER process and sour waters from Mexican oil refineries. *Energy Fuels.* **18**: 302 - 304.
127. Omil F., Méndez R. y Lema J.M. (1995). Anaerobic treatment of saline wastewaters under high sulphide and ammonia content. *Biores Technol* **54**: 269 - 278.
128. Ordaz A., Oliveira C.S., Aguilar R. y Carrión M. (2008). Kinetic and stoichiometric parameters estimation in a nitrifying bubble column through "In-Situ" pulse respirometry. *Biotechnol. Bioeng.* **100**: 94 - 102.
129. Orhon D., Ates E. y Sozen S. (2000). Experimental evaluation of the nitrification kinetics for tannery wastewaters. *Water SA*: **26**: 43 - 52.
130. Ortiz J.A., Rueda A., Carbonell G., Camargo J.A., Nieto F. y Tarazona J.V. (1993). Acute toxicity of sulfide and lower pH in cultured rainbow trout and coho salmon. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **50**: 164 - 170.
131. Park S. y Bae W. (2009). Modeling kinetics of ammonium oxidation and nitrite oxidation under simultaneous inhibition by free ammonia and free nitrous acid. *Process Biochemistry* **44**: 631 - 640.
132. Pidwirny M. (2006). Introduction to the atmosphere: the green house effect, Fundamentals of physical geography, 2nd edition.
133. Plisson-Saune S.P., Capdeville M., Mauret M., Deguin A. y Baptiste P. (1996). Real-time control of nitrogen removal using three ORP bending-points: signification, control strategy and results. *Water Sci. and Technol.* **33**: 275 - 280.
134. Postgate J.R. (1984). The Sulphate Reducing Bacteria, 2nd ed., University Press, Cambridge.
135. Prado Barragán L., Huerta Ochoa, S., Rodríguez Serrano, G. y Saucedo Castañeda G. (1999). Tópicos en Biotecnología. Avances en purificación y aplicación de enzimas en biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. México D.F. pp. 225 - 226.
136. Price N.C. (1999). Fundamentals of enzymology: the cell and molecular biology of catalytic proteins. Oxford University Press.

137. Prosser, J.I. (1989). Autotrophic nitrification in bacteria. *Adv. Microbiol. Physiol.* **30**: 125 - 181.
138. Purkhold U., Pommerening-Röser A., Juretschko S., Schmid M.C., Koops H.P. y Wagner M. (2000). Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and *amoA* sequence analysis: Implications for molecular diversity surveys. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 5368 - 5382.
139. Rall D.P. (1974). Review of the Health Effects of Sulfur Oxides. *Environ. Health Perspect.* **8**: 97 - 121.
140. Ram B., Bajpai P.K y Parwana H.K. (1999). Kinetics of chrome-tannery effluent treatment by the activated sludge system. *Process Biochem.* **35**: 255 - 265.
141. Ranguelova K., Rice A.B., Khajo A., Triquigneaux M., Garantziotis S., Magliozzo R.S. y Mason R.P. (2012). Formation of Reactive Sulfite-Derived Free Radicals by the Activation of Human Neutrophils: An ESR Study. *Free Radic Biol Med.* **52**: 1264 - 1271.
142. Rasche M.E., Hyman M.R. y Arp D.J. (1991). Factors limiting aliphatic chlorocarbon degradation by *Nitrosomonas europaea*: cometabolic inactivation of ammonia monooxygenase and substrate specificity. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 2986 - 2994.
143. Rattanapan C., Boonsawang P. y 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.
144. Reis M.A.M., Almeida J.S., Lemos P.C. y Carrondo M.J.T. (1992). Effect of hydrogen sulphide on growth of sulphate reducing bacteria. *Biotechnol. Bioeng.* **40**: 593 - 600.
145. Revah S., Acosta M., Hugler W., Trinidad R., Avila C., Estrada I. y Hinojosa A. (1995). Air Biodesulfuration from Viscose Plants: Carbon Disulfide Elimination, Conference on Biofiltración (an Air pollution Control Technology), Los Angeles, California. 5 - 6.
146. Robinson K.G., Sayler G.S. y Janalyn, J.R. (2004). Used of Novel Techniques to Quantify Phenotypes in Biological Treatment Process, IWA Publishing, Orlando, USA. 2.11 - 2.12.
147. Sayavedra-Soto L.A., Hommes N.G., Alzerreca J.J., Arp D.J., Norton J.M. y Klotz M.G. (1998). Transcription of the *amoC*, *amoA*, and *amoB* genes in *Nitrosomonas europaea* and *Nitrospira sp.* NpAV. *FEMS Microbiol. Lett.* **167**: 81 - 88.
148. Schmidt I., Sliemers O., Schmid M., Bock E., Fuerst J., Kuenen J.G., Jetten, M.S.M. y Strous M. (2003). New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**: 481 - 492.
149. Sears K., Alleman J.E. Barnard J.L. y Oleszkiewicz J.A. (2004). Impacts of reduced sulfur

- components on active and resting ammonia oxidizers. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 369 - 378
150. Segel I.H. (1993). *Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*. Wiley-Interscience. New Ed edition.
151. Semrau J.D., Chistoserdov A., Lebron J., Costello A., Davagnino J., Kenna E., Holmes A.J., Finch R., Murrell J.C. y Lidstrom M.E. (1995). Particulate methane monooxygenase genes in methanotrophs. *J. Bacteriol.* **177**: 3071 - 3079.
152. Shammass N.K. (1986). Interactions of temperature, pH and biomass on the nitrification process. *Journal Water Pollution Control Federation.* **58**: 52 - 59.
153. Sheintuch M., Tartakovsky B., Narkis N. y Rebhun M. (1995). Substrate inhibition and multiple states in a continuous nitrification process. *Water Res.* **29**: 953 - 63.
154. Silva C.D., Gómez J., Houbroun E., Cuervo-López F.M. y Texier A.-C. (2009). *p*-Cresol biotransformation by a nitrifying consortium. *Chemosphere.* **75**: 1387 - 1391.
155. Silva C.D. (2011). Estudio fisiológico de la nitrificación y oxidación del *p*-cresol en un consorcio nitrificante. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México.
156. Silva C.D., Cuervo-López F.M., Gómez J. y Texier A.-C. (2011). Nitrite effect on ammonium and nitrite oxidizing processes in a nitrifying sludge. *World J. Microb. Biot.* **27**: 1241 - 1245.
157. Silva C.D., Beristain-Montiel L., Cuervo-López F.M. y Texier A.-C. (2014). *p*-Cresol mineralization and bacterial population dynamics in a nitrifying sequential batch reactor. *J. Environ. Sci.* **26**: 1885 - 1893.
158. Singh M. y Srivastava R.K. (2011). Sequencing batch reactor technology for biological wastewater treatment: a review. *Asia Pac. J. Chem. Eng.* **6**: 3 - 13.
159. Singh S.N. y Verma A. (2007). The Potential of Nitrification Inhibitors to Manage the Pollution Effect of Nitrogen Fertilizers in Agricultural and Other Soils: A Review. *Environ. Pract.* **9**: 266 - 279.
160. Speece R.E. (1983). Anaerobic biotechnology of industrial wastewaters. *Environ. Sci. Technol.* **17**: 416A - 427A.
161. Spieck E., Ehrich S., Aamand J. y Bock E. (1998). Isolation and immunocytochemical location of the nitrite-oxidizing system in *Nitrospira moscoviensis*. *Arch. Microbiol.* **169**: 225 - 230.
162. Spieck E., Müller S., Engel A., Mandelkow E., Patel H. y Bock E. (1996). Two-dimensional structure of membrane-bound nitrite oxidoreductase from *Nitrobacter hamburgensis*. *J. Struct. Biol.* **117**: 117 - 123.



163. Surmacz-Gorzka J., Gernaey K., Demuynck C., Vanrolleghem P. y Verstraete W. (1996). Nitrification monitoring in activated sludge by oxygen uptake rate (OUR) measurements. *Water Res.* **30**: 1228 - 1236.
164. Suzuki I., Dular U. y Kwok S.C. (1974). Ammonia or ammonium ion as substrate for oxidation by *Nitrosomonas europaea* cell and extracts. *J. of Bacteriol.* **120**: 556-558.
165. Szpyrkowicz L., Kaul S.N y Neti R.N. (2005). Tannery wastewater treatment by electro-oxidation coupled with a biological process. *J. Appl. Electrochem.* **35**: 381 - 390.
166. Tait S., Clarke W.P., Keller J. y Batstone D.J. (2009). Removal of sulfate from high strength wastewater by crystallization. *Water Res.* **43**: 762 - 772.
167. Tarre S. y Green M. (2004). High-rate nitrification at low pH in suspended- and attached-biomass reactors. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 6481 - 6487.
168. Tchobanoglous G. y Burton F.L (1991). *Wastewater Engineering: Treatment, Disposal and Reuse*. 3er ed. Metcalf & Eddy, Inc. McGraw-Hill. New York. 403 pag.
169. Téllez-Pérez S. K., Silva C.D. y Texier A.C. (2013). Simultaneous ammonium and *p*-hydroxybenzaldehyde oxidation in a sequencing batch reactor. *Rev. Mex. Ing. Quim.* **12**: 97 - 104.
170. Texier A-C. y Gomez J. (2004). Settleability and kinetics of a nitrifying sludge in a sequencing batch reactor. *Can. J. Microbiol.* **50**: 943 - 949.
171. Texier A-C. y Gómez J. (2007). Simultaneous nitrification and *p*-cresol oxidation in a nitrifying sequencing batch reactor. *Water Res.* **41**: 315 - 322.
172. Texier A.-C., Zepeda A., Gómez J. y Cuervo-López F. (2012). Simultaneous elimination of carbon and nitrogen compounds of petrochemical effluents by nitrification and denitrification. In: *Petrochemicals*, Ed. Vivek Patel, Intech, Croatia.
173. Thorndycroft F.H., Butland G., Richardson D.J. y Watmough N.J. (2007). A new assay for nitric oxide reductase reveals two conserved glutamate residues form the entrance to a proton-conducting channel in the bacterial enzyme. *Biochem. J.* **401**: 111 - 119.
174. Vadivelu V.M., Yuan Z., Fux C. y Keller J. (2006a). The inhibitory effects of free nitrous acid on the energy generation and growth processes of an enriched *Nitrobacter* culture. *Environ. Sci. Technol.* **40**: 4442 - 4448.
175. Vadivelu V.M., Keller J. y Yuan Z. (2006b). Effect of free ammonia and free nitrous acid concentration on the anabolic and catabolic processes of an enriched *Nitrosomonas* culture. *Biotechnol. Bioeng.* **95**: 830 - 839.
176. Van Maanen J.M.S., Van Dijk A., Mulder K., De Baets M.H., Menheere P.C.A. y Van der

- Heide D. (1994). Consumption of drinking waters with high nitrate levels causes hypertrophy of the Thyroid. *Toxicol. Lett.* **72**: 365 - 374.
177. Van Maanen J.M.S., Albering H.J., De Kok T.M.C.M., Van Breda S.G.I., Curfs D.M.J. y Vermeer I.T.M. (2000). Does the risk of childhood diabetes mellitus require revision of the guideline values for nitrate in drinking water? *Environ. Health Perspect.* **108**: 457 - 461.
178. Vásquez T y Guadalupe A.M. (2001). Ecología y Formación Ambiental. 2da Edición. McGraw-Hill. 343 pag.
179. Venkatamohan S., Rao N.C., Prasad K.K., Madhavi B.T.V. y Sharma P.N. (2005). Treatment of complex chemical wastewater in a sequencing batch reactor (SBR) with an aerobic suspended growth configuration. *Proc. Biochem.* **40**: 1501 - 1508.
180. Vidyalakshmi, R., Paranthaman, R. y Bhakyaraj, R. (2009). Sulphur Oxidizing Bacteria and Pulse Nutrition - A Review. *World Journal of Agricultural Sciences.* **5**: 270 - 278.
181. Visser A., Hulshoff L.W. y Lettinga P. G. (1996). Competition of methanogenic and sulfidogenic bacteria. *Water Sci. Technol.* **33**: 99 - 110.
182. Wagner M., Loy A., Nogueira R., Purkhold U., Lee N. y Daims, H. (2002). Microbial community composition and function in wastewater treatment plants. *A. Van Leeuw.* **81**: 665 - 680.
183. Ward M.H., Mark S.D., Cantor K.P., Weisenburger D.D., Correa-Villasenor A. y Zahm S.H. (1996). Drinking water nitrate and the risk of non-Hodgkin's lymphoma. *Epidemiology.* **7**: 465 - 471.
184. Wetzel R.G. (2001). Limnology. 3rd. Edition. New York. Academic Press.
185. Whittaker M., Bergmann D., Arciero D. y Hooper A.B. (2000). Electron transfer during the oxidation of ammonia by the chemolithotrophic bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Biochem. Biophys. Acta.* **1459**: 346 - 355.
186. Whitten K.W., Davis R.E., Peck M.L. y Stanley G.G. (2008). Química. 8va edición. Cengage Learning Editores S.A. Anexo A14.
187. Wilderer P.A., Irvine R.L. y Goronsky M.C. (2001). Sequencing Batch Reactor Technology, Scientific and Technical Report. IWA Publishing: No. 10, London.
188. Winogradsky M.S. (1890). Recherches sur les organismes de la nitrification. *Ann. Inst. Pasteur.* **5**: 257 - 275.
189. Wolfe A.H. y Patz J.A. (2002). Reactive nitrogen and human health: acute and longterm implications. *Ambio.* **31**: 120 - 125.
190. Wood P.M. (1986). Nitrification as a bacterial energy source. In: Prosser J.I. (ed)



- Nitrification. Society for General Microbiology, IRL, Oxford. 39 - 62.
191. Yang L. y Alleman J.E. (1992). Investigation of batchwise nitrite build-up by an enriched nitrification culture. *Water Sci. Technol.* **26**: 997 - 1005.
192. Yilmaz, G. y Ozturk, I. (2003) Nutrient removal of ammonia rich effluent in a sequencing batch reactor. *Water Sci. Technol.* **48**: 377 - 383.
193. Yong-Ho A. (2006). Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: A review. *Process. Biochem.* **41**: 1709 - 1721.
194. Zahn J.A., Arciero D.M., Hooper A.M. y DiSpirito A.A. (1996). Evidence for an iron center in the ammonia monooxygenase from *Nitrosomonas europaea*. *FEMS Lett.* **397**: 35 - 38.
195. Zepeda A., Texier A-C. y Gómez J. (2003). Benzene transformation in nitrifying batch cultures. *Biotechnol. Prog.* **19**: 789 - 793.
196. Zepeda A., Texier A-C. y Gómez J. (2006). Kinetic and metabolic study of benzene, toluene and *m*-xylene in nitrifying batch cultures. *Water Res.* **40**: 1643 - 1649.
197. Zepeda A., Ben-Youssef C., Rincón S., Cuervo-López F. y Gómez J. (2013) Complete and simultaneous removal of ammonium and *m*-cresol in a nitrifying sequencing batch reactor. *Biodegradation.* **24**: 377 - 385.
198. Zhou Z., Xing C., An Y., Hu D., Qiao W. y Wang L. (2014). Inhibitory effects of sulfide on nitrifying biomass in the anaerobic–anoxic–aerobic wastewater treatment process. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **89**: 214 - 219.
199. Zumft W.G. (1992). The denitrifying prokaryotes. En: *The prokaryotes a handbook of the biology of bacteria: Ecophysiology isolation identification applications*. 2da edición, volumen. 1. Editorial: Springer-Verlag, New York. 554-582.

# JUSTIFICACIÓN

---

---

## II. Justificación

En muchos efluentes industriales (textil, tenerías, procesadoras de alimentos, papeleras, productoras de látex y caucho, manufactureras de explosivos, productoras de pesticidas, químicas, refinadoras de petróleo, productoras de gas natural, entre otras), se pueden encontrar altas concentraciones de amonio y sulfuro. El tratamiento biológico de estos efluentes industriales se lleva a cabo mediante trenes de tratamiento donde la nitrificación puede ser utilizada como la etapa para oxidar el amonio a nitrato, para que posteriormente este último se reduzca hasta nitrógeno molecular por desnitrificación. Sin embargo, se ha reportado en la literatura que el sulfuro puede afectar negativamente el proceso nitrificante, pero aún no se cuenta con suficiente información sobre la fisiología y cinética del proceso nitrificante en presencia de sulfuro.

Se requiere evaluar el efecto del sulfuro sobre los procesos amonio y nitrito oxidantes determinando datos cinéticos como: velocidades específicas del consumo de sustratos, producción de nitrato, consumo de oxígeno, oxidación del sulfuro y constantes cinéticas como  $K_S$ ,  $q_{max}$  y  $K_i$ , que permitan entender mejor cómo son afectadas estas rutas nitrificantes en presencia de sulfuro.

También es evidente que hace falta evaluar el proceso nitrificante en reactores biológicos siendo alimentados con sulfuro, así como caracterizar el comportamiento fisiológico y cinético de lodos nitrificantes para poder contribuir a proponer alternativas para tratar efluentes que contengan a la vez amonio y sulfuro, o bien, proponer la manera de evitar o minimizar el efecto del sulfuro. Una de ellas podría ser utilizando un reactor SBR bajo condiciones experimentales definidas y controladas para poder eliminar el sulfuro y el amonio simultáneamente, así como evaluar las ventajas que proporcionaría usar este tipo de reactor como una herramienta para evaluar la respiración y la cinética de un lodo nitrificante a través de los ciclos de operación.

# HIPÓTESIS

### **III. Hipótesis**

Aún bajo el efecto inhibitorio del sulfuro (disminución de velocidades), la nitrificación podrá llevarse a cabo exitosamente con alta eficiencia de consumo de amonio y alto rendimiento de formación de nitrato.

La exposición repetida de un lodo nitrificante a concentraciones crecientes de sulfuro en un reactor de lotes secuenciados permitirá disminuir el efecto inhibitorio del sulfuro sobre los procesos amonio y nitrito oxidantes, alcanzando altas eficiencias de consumo de amonio y altos rendimientos de formación de nitrato.

# OBJETIVOS



## **IV. Objetivos**

### **IV.1 Objetivo general**

- Evaluar y analizar el efecto del sulfuro sobre la actividad amonio y nitrito oxidante de un lodo nitrificante fisiológicamente estable.

### **IV.2 Objetivos particulares**

Mediante cultivos en lote con biomasa nitrificante sin previa exposición a sulfuro:

- Evaluar el efecto de diferentes concentraciones iniciales de sulfuro sobre el proceso respiratorio nitrificante a través de las variables de respuesta: eficiencia, rendimiento y velocidad específica.
- Evaluar la oxidación del sulfuro en los cultivos nitrificantes a través de perfiles cinéticos y balances de masa.
- Evaluar el efecto del sulfuro sobre las constantes cinéticas ( $K_s$  y  $q_{max}$ ) de los procesos amonio y nitrito oxidantes del lodo nitrificante para deducir el tipo de inhibición y los valores de las constantes de inhibición ( $K_i$ ) en ambas rutas.

Mediante cultivos en un reactor de lotes secuenciados alimentado a diferentes concentraciones iniciales de sulfuro:

- Evaluar, analizar y comparar el comportamiento fisiológico y cinético de los procesos amonio y nitrito oxidantes a través de los ciclos de operación.
- Determinar y comparar los perfiles cinéticos de la oxidación del sulfuro y formación de sus productos durante los ciclos de operación.

MATERIALES  
Y  
MÉTODOS

---

---



## V. Materiales y Métodos

### V.1 Variables de respuesta

#### V.1.1 Variables de respuesta para evaluar el comportamiento fisiológico de la biomasa nitrificante

Para valorar fisiológicamente la biomasa nitrificante utilizada en cada etapa de este estudio bajo diferentes condiciones experimentales, se determinaron, tanto para los cultivos en lote, como en el reactor en continuo y el reactor de lotes secuenciados, las siguientes variables de respuesta: eficiencias de consumo de sustratos y rendimientos de formación de productos, las cuales nos proporcionaron información global del proceso metabólico.

##### V.1.1.1 Eficiencia de consumo de sustrato

El consumo de sustrato no está relacionado solamente a la producción de biomasa. Éste tiene principalmente dos cometidos en el metabolismo celular: asimilación de los microorganismos para biosíntesis celular (proceso anabólico) y obtención de energía para procesos de síntesis y mantenimiento celular (proceso catabólico).

La eficiencia es la forma de cuantificar el consumo de sustrato en porcentaje. En este trabajo, se determinaron las eficiencias de consumo de amonio ( $E_{NH_4^+}$ ) y de nitrito ( $E_{NO_2^-}$ ) para caracterizar el consumo de sustrato de las rutas amonio y nitrito oxidantes respectivamente (Ecuaciones 26 y 27).

$$E_{NH_4^+} = \left( \frac{mgN - NH_4^+ \text{ Consumido}}{mgN - NH_4^+ \text{ Inicial}} \right) \times 100 \quad (26)$$

$$E_{NO_2^-} = \left( \frac{mgN - NO_2^- \text{ Consumido}}{mgN - NO_2^- \text{ Inicial}} \right) \times 100 \quad (27)$$

### V.1.1.2 Rendimiento de formación de producto

El rendimiento se refiere a la generación de producto a partir del sustrato consumido. Los rendimientos de producción de nitrito ( $Y_{NO_2^-}$ ), nitrato ( $Y_{NO_3^-}$ ) y biomasa microbiana ( $Y_{BO}$ ) fueron determinados (Ecuaciones 28, 29 y 30).

$$Y_{NO_2^-} = \left( \frac{mgN - NO_2^- \text{ Formado}}{mgN - NH_4^+ \text{ Consumido}} \right) \quad (28)$$

$$Y_{NO_3^-} = \left( \frac{mgN - NO_3^- \text{ Formado}}{mgN - NH_4^+ \text{ Consumido}} \right) \quad (29)$$

$$Y_{BO} = \left( \frac{mgN - Biomasa \text{ Formada}}{mgN - NH_4^+ \text{ Consumido}} \right) \quad (30)$$

El rendimiento puede proporcionar información relacionada con las vías metabólicas y puede ayudar a determinar si alguna de estas rutas se ve afectada por alguna condición ambiental como la presencia de un compuesto tóxico o inhibitorio por ejemplo. Por lo cual, es una variable de gran importancia en estudios microbiológicos. El rendimiento de formación de biomasa informa acerca de la asimilación de sustrato para biosíntesis celular (proceso anabólico) mientras que los rendimientos de los productos finales e intermediarios de las vías respiratorias están relacionados con el proceso catabólico. En este estudio, el rendimiento de nitrito es variable de respuesta de la ruta amonio oxidante y el rendimiento de nitrato informa de manera global del proceso nitrificante (amonio y nitrito oxidación).

### V.1.2 Variables de respuesta para evaluar el comportamiento cinético de la biomasa nitrificante

El comportamiento cinético de la biomasa nitrificante utilizada en las distintas etapas de este estudio (cultivos en lote, reactor de lotes secuenciados y reactor en continuo), se evaluó mediante el cálculo de las velocidades volumétricas y/o específicas de consumo de sustratos y formación de productos.

En muchas ocasiones se evalúa el efecto inhibitorio de un compuesto sobre un proceso metabólico, mediante variables de respuesta tales como eficiencia de consumo de sustrato y

rendimientos de formación de productos, las cuales no constituyen una respuesta directa del efecto inhibitorio. Estas variables se ven afectadas por compuestos inhibitorios debido a que este compuesto disminuye la velocidad específica de consumo de sustrato y/o formación de producto. Por lo tanto, la variable para determinar una inhibición es la velocidad específica. La velocidad específica es una variable de respuesta que nos permite determinar el efecto inhibitorio de un compuesto sobre un proceso biológico porque está estrechamente relacionada con la actividad enzimática de las bacterias.

### V.1.2.1 Velocidad volumétrica

La velocidad volumétrica es una variable de respuesta de un proceso metabólico que proporciona información sobre la velocidad de consumo de sustrato y formación de productos. Es una forma de determinar el estado fisiológico de un cultivo microbiano en un reactor. Sin embargo, esta variable no es confiable en la comparación de resultados, ya que las velocidades volumétricas dependen de la concentración celular presente en el reactor (Ecuación 31).

$$\frac{dS}{dt} = q \cdot X \quad (31)$$

Donde:  $dS/dt$  es la velocidad volumétrica de consumo de sustrato (mg/L.h);  $q$  es la velocidad específica de consumo de sustrato (mg/mg.h) y  $X$  es la concentración celular (mg/L).

En el reactor en continuo y en los cultivos en lote se determinaron las velocidades volumétricas iniciales del proceso biológico nitrificante para determinar que el estado fisiológico del cultivo nitrificante se encontrara estable y con actividad amonio y nitrito oxidante, determinándose las velocidades volumétricas de consumo de amonio ( $Q_{NH_4^+}$ ) (Ecuación 32), producción de nitrito ( $Q_{NO_2^-}$ ) (Ecuación 33), producción de nitrato ( $Q_{NO_3^-}$ ) (Ecuación 34) y producción de biomasa ( $Q_{BO}$ ) (Ecuación 35).

$$Q_{NH_4^+} = \left( \frac{mgN - NH_4^+ \text{ Consumido}}{\text{Volumen} \times \text{tiempo}} \right) \quad (32)$$

$$Q_{NO_2^-} = \left( \frac{mgN - NO_2^- \text{ Formado}}{\text{Volumen} \times \text{tiempo}} \right) \quad (33)$$

$$Q_{NO_3^-} = \left( \frac{mgN - NO_3^- \text{ Formado}}{\text{Volumen} \times \text{tiempo}} \right) \quad (34)$$

$$Q_{BO} = \left( \frac{mgN - \text{Biomasa Formada}}{\text{Volumen} \times \text{tiempo}} \right) \quad (35)$$

Donde: Q es la velocidad volumétrica inicial de consumo o producción (mg/L.h).

Para los ensayos en lote y el reactor de lotes secuenciados, las velocidades volumétricas se determinaron mediante la pendiente de la regresión lineal de los datos experimentales del cambio en la concentración de sustratos y productos con respecto al tiempo.

### V.1.2.2 Velocidad específica

La velocidad específica está referida a cierta cantidad de biomasa y puede brindar información acerca de la actividad metabólica de los microorganismos en un cultivo. Está relacionada con la velocidad volumétrica según la ecuación 36.

$$q = \frac{Q}{X} \quad (36)$$

Donde: Q es la velocidad volumétrica de consumo de sustrato (mg/L.h); q es la velocidad específica inicial de consumo de sustrato (mg/mg.h) y X es la concentración celular (mg/L).

Cualquier disminución en la velocidad específica estará indicando que se afectó el metabolismo de los microorganismos, por factores ambientales o por la presencia de compuestos tóxicos o inhibitorios. Cualquier efecto inhibitorio debe estar relacionado con una disminución en la velocidad específica. Para evaluar el proceso amonio oxidante, se determinaron las velocidades específicas iniciales de consumo de amonio ( $q_{NH_4^+}$ ) (Ecuación 37) y producción de nitrato ( $q_{NO_3^-}$ ) (Ecuación 38), mientras que se calcularon las velocidades específicas de consumo de nitrito ( $q_{NO_2^-}$ ) (Ecuación 39) y producción de nitrato ( $q_{NO_3^-}$ ) (Ecuación 38) para caracterizar la cinética del proceso nitrito oxidante.

$$q_{NH_4^+} = \left( \frac{mgN - NH_4^+ \text{ Consumido}}{mg \text{ Proteína microbiana} \times \text{tiempo}} \right) \quad (37)$$

$$q_{NO_3^-} = \left( \frac{mgN - NO_3^- \text{ Formado}}{mg \text{ Proteína microbiana} \times \text{tiempo}} \right) \quad (38)$$

$$q_{NO_2^-} = \left( \frac{mgN - NO_2^- \text{ Consumido}}{mg \text{ Proteína microbiana} \times \text{tiempo}} \right) \quad (39)$$

Cabe mencionar que la velocidad volumétrica aumenta conforme aumenta la concentración celular, por lo que no es útil para evaluar la capacidad metabólica exclusiva del cultivo, mientras que la velocidad específica sí evalúa las capacidades metabólicas propias del cultivo.

### V.1.3 Balance de materia de la nitrificación

Cabe destacar también que se realizó el balance de nitrógeno en el reactor en continuo, en los cultivos en lote, así como en el reactor de lotes secuenciados.

#### V.1.3.1 Balance de materia en el reactor en continuo

$$Q_{eN-NH_4^+} = Q_{sN-NH_4^+} + Q_{sN-NO_3^-} + Q_{sN-NO_2^-} + Q_{sN-BO}$$

Donde:  $Q_e$  es la velocidad de carga (mg N/L.d) y  $Q_s$  la velocidad de descarga. Al ser cuantificada la formación de biomasa en el reactor como proteína microbiana, se asumió que el 16% de la proteína microbiana es nitrógeno asimilado para crecimiento celular (Bailey y Ollis, 1986).

Para la determinación de la velocidad de carga y descarga ( $Q$ ) se utilizó la ecuación 40:

$$Q = \left( \frac{F}{V} \right) C \quad (40)$$

Donde:  $Q$  es la velocidad de carga o descarga (mg N/L.d),  $F$  es el flujo de alimentación o descarga (L/d),  $V$  es el volumen operacional del reactor (L) y  $C$  es la concentración de nitrógeno alimentado o descargado (mg N/L).

Para la determinación de la velocidad de carga, se determinó la concentración de nitrógeno de amonio en el medio de cultivo y para la velocidad de descarga se determinó la concentración de nitrógeno de amonio, nitrito y nitrato en el efluente.

### V.1.3.2 Balance de materia en cultivos en lote y reactor SBR

Para los cultivos en lote y en el reactor SBR, el balance de nitrógeno se realizó con base en las concentraciones determinadas al inicio y al final de los cultivos (mg N/L):

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

### V.1.4 Evaluación de la oxidación de sulfuro bajo condiciones nitrificantes

Se realizaron cinéticas de oxidación del sulfuro en los cultivos en lote y en el reactor de lotes secuenciados. Se tomaron muestras a diferentes tiempos y se cuantificó la concentración de sulfuro residual y de sulfato y tiosulfato formados como posibles productos de la oxidación de sulfuro. Se determinó la velocidad volumétrica de oxidación de sulfuro a través de una regresión lineal de los datos experimentales.

Se estableció también el balance de materia para determinar el porcentaje de recuperación de azufre con base en el sulfuro adicionado al inicio de cada cinética:

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

## V.2 Reactor nitrificante en continuo

Se instaló un reactor nitrificante de tanque agitado con un volumen de operación de 6 L (Figura 10). Se inoculó con lodo nitrificante a una concentración de proteína microbiana de  $500 \pm 50$  mg/L. Se operó a una temperatura de  $30 \pm 3^\circ\text{C}$ , un pH de  $7.0 \pm 0.5$ , una agitación de 200 rpm, una aireación continua (concentración de oxígeno disuelto de  $4.0 \pm 0.5$  mg O<sub>2</sub>/L) y un tiempo de retención hidráulica de 1.54 d.

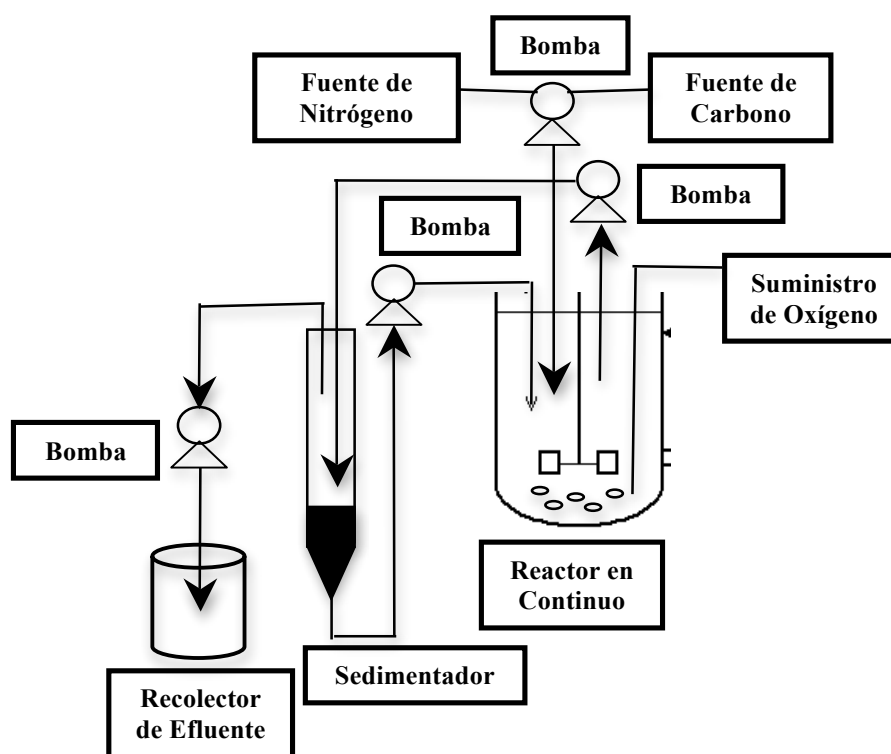


Figura 10. Esquema del reactor en continuo.

El reactor fue alimentado con agua residual sintética compuesta por dos medios que se separaron como fuente de nitrógeno (A) y carbono (B) (Tabla 10). El medio A tuvo una concentración total de  $\text{N-NH}_4^+$  de  $750 \pm 50$  mg/L. El bicarbonato de sodio del medio B además de ser la fuente de carbono sirvió como amortiguador de pH. Los medios A y B fueron alimentados a un flujo de 1.94 L/d en ambos casos. La velocidad de carga de  $\text{N-NH}_4^+$  en el reactor fue de  $243 \pm 17$  mg  $\text{N-NH}_4^+$ /L.d. La relación C/N fue de 2.5. 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 de las enzimas nitrificantes.

**Tabla 10.** Composición del medio de cultivo del reactor nitrificante en continuo.

<b>Medio A</b>	<b>Concentración (g/L)</b>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.73
(NH <sub>4</sub> )Cl	1.40
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.73
MgSO <sub>4</sub>	0.60
NaCl	1.00
<b>Medio B</b>	<b>Concentración (g/L)</b>
NaHCO <sub>3</sub>	9.30
CaCl <sub>2</sub>	0.05

Se operó el reactor y dio seguimiento durante 48 meses. Se determinaron las velocidades volumétricas de carga y descarga de: N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y se dio seguimiento al crecimiento celular en el reactor. Una vez que se verificó que el cultivo alcanzó el régimen estacionario con altos valores de eficiencia de consumo de amonio y rendimiento de formación de nitrato, se mantuvo operando bajo las mismas condiciones para poder ocuparlo como fuente de inóculo para los ensayos en lote y el reactor SBR.

### V.3 Cultivos en lote con biomasa nitrificante

#### V.3.1 Ensayos para determinar el efecto del sulfuro sobre el lodo nitrificante a diferentes concentraciones iniciales

Se utilizaron botellas serológicas de 160 mL con un volumen de operación de 100 mL. El inóculo (30 mL) proveniente del reactor nitrificante en continuo se añadió para obtener una concentración inicial de proteína microbiana de 130 ± 15 mg/L. El lodo se lavó previamente con una solución fisiológica (9 g/L de NaCl). Se utilizaron los medios C (25 mL) y D (25 mL) que se describen en la tabla 11. La concentración inicial en amonio fue de 118 ± 12 mg N/L. Se adicionaron además 0.5 mL de una solución de FeSO<sub>4</sub> y 0.5 mL de una solución de CuSO<sub>4</sub>, ambas con una concentración de 0.5% (p/v).



**Tabla 11.** Concentraciones de los nutrientes del medio de cultivo nitrificante en lote.

<b>Medio C</b>	<b>Concentración (g/L)</b>
(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>	0.80
NaCl	0.80
<b>Medio D</b>	<b>Concentración (g/L)</b>
NaHCO <sub>3</sub>	7.00
CaCl <sub>2</sub>	0.04

Se le inyectó oxígeno puro (99% de pureza) durante 3 min (obteniéndose una concentración inicial de 6.1 mg/L) 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 (60 mL) con oxígeno durante 2 min. Finalmente, se colocó cada botella en un agitador orbital a 200 rpm dentro de una incubadora a temperatura controlada de 30°C por 60 h. Cada ensayo se realizó por duplicado. El sulfuro (Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>O) se añadió a los cultivos nitrificantes a diferentes concentraciones: 0, 3.1, 6.4, 13.5, 52.0 y 112.0 mg S-HS<sup>-</sup>/L.

### V.3.2 Ensayos para determinar el efecto del sulfuro sobre las constantes cinéticas de los procesos amonio y nitrito oxidantes

Se utilizaron botellas serológicas de 160 mL con un volumen de operación de 100 mL. El inóculo (10 mL) proveniente del reactor nitrificante en continuo se añadió a una concentración inicial de proteína microbiana de 60 ± 10 mg/L. El lodo se lavó previamente con una solución fisiológica (9 g/L de NaCl). Se utilizaron los medios E (25 mL) y F (25 mL) que se describen en la tabla 12 y se adicionaron diferentes concentraciones iniciales de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> o N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (1.5, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 15.0, 25.0 y 50.0 mg N/L) a partir de soluciones estándares de NH<sub>4</sub>Cl y NaNO<sub>2</sub> (500 mg N/L). Se adicionaron además 0.5 mL de una solución de FeSO<sub>4</sub> y 0.5 mL de una solución de CuSO<sub>4</sub>, ambas con una concentración de 0.5% (p/v).

**Tabla 12.** Concentraciones de los nutrientes del medio de cultivo nitrificante en lote.

Medio E	Concentración (g/L)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.12
MgSO <sub>4</sub>	0.80
NaCl	0.80
Medio F	Concentración (g/L)
NaHCO <sub>3</sub>	7.00
CaCl <sub>2</sub>	0.04

Se le inyectó oxígeno puro (99% de pureza) durante 3 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 (60 mL) con oxígeno durante 3 min. Finalmente, se colocó cada botella en un agitador orbital a 200 rpm dentro de una incubadora a temperatura controlada de 30°C por 24 h. Cada ensayo se realizó por duplicado. El sulfuro (Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>O) se añadió a los cultivos nitrificantes a diferentes concentraciones: 2.5, 3.5 y 5.0 mg S-HS<sup>-</sup>/L.

En una primera etapa en ausencia de sulfuro, se determinaron las velocidades específicas de consumo de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> a cada concentración inicial de sustrato (1.5, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 15.0, 25.0 y 50.0 mg N/L) y se construyeron las curvas relacionando las velocidades específicas de consumo de sustrato con respecto a la concentración inicial de sustrato. Se utilizó el modelo matemático de Monod para describir las curvas obtenidas tanto para el proceso amonio oxidante (Ecuación 41) como para el proceso nitrito oxidante (Ecuación 42).

$$q_{NH_4^+} = \frac{q_{maxNH_4^+} C_{NH_4^+}}{Ks_{NH_4^+} + C_{NH_4^+}} \quad (41)$$

$$q_{NO_2^-} = \frac{q_{maxNO_2^-} C_{NO_2^-}}{Ks_{NO_2^-} + C_{NO_2^-}} \quad (42)$$

Donde:  $q_{NH_4^+}$  es la velocidad específica de consumo de amonio (mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/mg proteína microbiana.h);  $q_{NO_2^-}$  es la velocidad específica de consumo de nitrito (mg N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/mg proteína microbiana.h);  $q_{maxNH_4^+}$  es la velocidad específica máxima de consumo de amonio (mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/mg proteína microbiana.h);  $q_{maxNO_2^-}$  es la velocidad específica máxima de consumo de nitrito (mg N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/mg proteína microbiana.h);  $Ks_{NH_4^+}$  es la constante de saturación de la

amonio oxidación (mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L); K<sub>SNO<sub>2</sub>-</sub> es la constante de saturación de la nitrito oxidación (mg N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/L); C<sub>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></sub> es la concentración de amonio (mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L) y C<sub>NO<sub>2</sub>-</sub> es la concentración de nitrito (mg N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/L).

Las constantes cinéticas de Monod (K<sub>s</sub> y q<sub>max</sub>) para ambos procesos se determinaron por un método no lineal usando el paquete Sigma plot 10 (Systat Software Inc., 2010).

Posteriormente, se determinaron las constantes cinéticas aparentes (K<sub>s</sub> y q<sub>max</sub>) de los procesos amonio y nitrito oxidantes en presencia de sulfuro. De igual forma, se determinaron por un método no lineal usando el paquete Sigma plot 10 (Systat Software Inc., 2010). Para esto, se evaluaron diferentes concentraciones iniciales de sulfuro (2.5, 3.5 y 5.0 mg S-HS<sup>-</sup>/L) y las mismas concentraciones iniciales de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (1.5, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 15.0, 25.0 y 50.0 mg N/L). Con los valores obtenidos de las constantes cinéticas aparentes, se evaluaron los siguientes modelos de inhibición enzimática del tipo reversible: inhibición competitiva (Ecuación 43), no-competitiva (Ecuación 44), acompetitiva (Ecuación 45) y mixta (Ecuación 46) para describir el efecto inhibitorio del sulfuro sobre la amonio y nitrito oxidación. Una vez seleccionado el modelo de inhibición enzimática que describiera mejor los datos experimentales obtenidos, se prosiguió a determinar las constantes de inhibición (K<sub>i</sub>) del sulfuro sobre cada uno de los procesos con la ayuda de un software computacional (Sigma plot 10, Systat Software Inc., 2010).

$$q = \frac{q_{\max} S}{K_s \left(1 + \frac{I}{K'_i}\right) + S} \quad (43)$$

$$q = \frac{\left(\frac{q_{\max}}{1 + \frac{I}{K_i}}\right) S}{K_s + S} \quad (44)$$

$$q = \frac{(q_{\max})(S)}{\left(\frac{K_s}{1 + \frac{I}{K''_i}}\right) + S} \quad (45)$$

$$q = \frac{\left( \frac{q_{\max}}{1 + \frac{I}{K_i}} \right) S}{\left( K_s \left( 1 + \frac{I}{K'_i} \right) \right) + S} \quad (46)$$

Donde: I es la concentración inicial de sulfuro (mg S-HS<sup>-</sup>/L); S es la concentración de sustrato (mg N/L); K<sub>i</sub>' es la constante de inhibición competitiva (mg S-HS<sup>-</sup>/L); K<sub>i</sub> es la constante de inhibición no-competitiva (mg S-HS<sup>-</sup>/L); K<sub>i</sub>'' es la constante de inhibición acompetitiva (mg S-HS<sup>-</sup>/L).

#### V.4 Reactor de lotes secuenciados con biomasa nitrificante

Se instaló un reactor de lotes secuenciados (SBR, sequencing batch reactor, por sus siglas en ingles) con un volumen de trabajo de 2.0 L con biomasa nitrificante en suspensión a una concentración de 385 ± 41 mg proteína microbiana/L (Figura 11). Se purgó de manera rutinaria el lodo del reactor para mantener la misma concentración de biomasa durante todo el tiempo de operación del reactor.

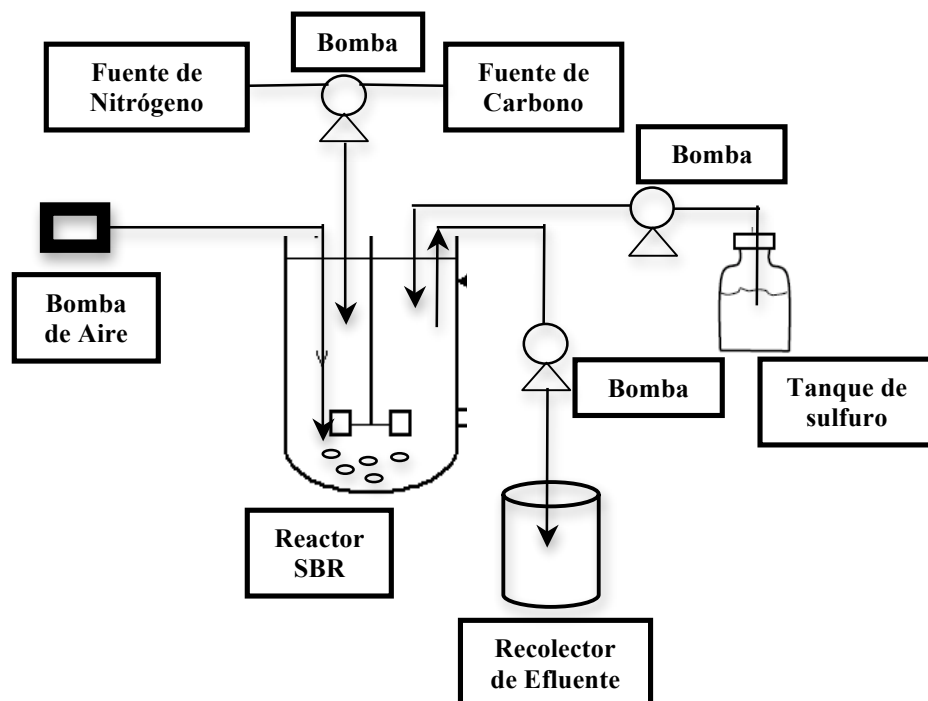


Figura 11. Esquema del reactor de lotes secuenciados.

Se alimentó el SBR con medio de cultivo litoautotrófico (Tabla 13) compuesto de los medios G y H a un flujo de 220 y 217 mL/min, respectivamente. La concentración inicial de amonio fue de  $125 \pm 14$  mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L resultando en una relación C/N de aproximadamente 2.6. Se adicionaron además 0.5 mL de una solución de FeSO<sub>4</sub> y 0.5 mL de una solución de CuSO<sub>4</sub>, ambas con una concentración de 0.5% (p/v).

**Tabla 13.** Concentraciones de los nutrientes del medio de cultivo nitrificante en el SBR.

<b>Medio G</b>	<b>Concentración (g/L)</b>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.60
(NH <sub>4</sub> )Cl	0.48
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.71
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.63
NaCl	0.50
<b>Medio H</b>	<b>Concentración (g/L)</b>
NaHCO <sub>3</sub>	4.40
CaCl <sub>2</sub>	0.03

El SBR se operó con ciclos de 12 h controlados electrónicamente, incluyendo las fases de llenado (0.07 h), reacción aireada (11.25 h), sedimentado (0.25 h) y drenado (0.43 h). La temperatura fue de  $30 \pm 3^\circ\text{C}$ , la velocidad de agitación de 200 rpm y el pH se mantuvo a  $7.6 \pm 0.3$ , la concentración de oxígeno en el reactor fue de  $3.5 \pm 0.2$  mg O<sub>2</sub>/L y el porcentaje de recambio fue de 87.5%.

El sulfuro se adicionó a partir de una solución madre a razón de 7.5 mL/min durante 4 min para alcanzar las diferentes concentraciones iniciales de sulfuro (2.5 - 20.0 mg S-HS<sup>-</sup>/L) dentro del SBR a los diferentes ciclos (Tabla 14).

**Tabla 14.** Concentraciones iniciales del sulfuro adicionado al SBR.

Concentración de sulfuro (mg S-HS <sup>-</sup> /L)	Ciclos
0	1 - 96
2.5	97 - 146
5.0	147 - 262
7.5	263 - 346
10.0	347 - 446
15.0	447 - 516
20.0	517 - 747

Se tomaron muestras al final de cada dos ciclos a lo largo de la operación del reactor. De igual manera, se realizó el muestreo a diferentes tiempos dentro de un mismo ciclo de operación para establecer las cinéticas del proceso nitrificante y de la oxidación del sulfuro. Todas las muestras fueron centrifugadas (Sol-Bat, mod. J-600) a 4000 rpm aproximadamente, para posteriormente ser filtradas (0.45 µm) y analizadas para amonio, nitrito, nitrato, sulfuro, sulfato y tiosulfato.

## V.5 Métodos analíticos

Los métodos analíticos que se utilizaron durante el proyecto experimental se enlistan en la tabla 15. La descripción de cada método se presenta en los siguientes apartados con su respectiva curva de calibración.

Tabla 15. Métodos analíticos.

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

### V.5.1 Cuantificación de amonio

Para cuantificar el amonio, se utilizó un electrodo selectivo de amoniaco (Phoenix electrode Co). Primeramente, se construyó una curva de calibración con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  a cinco concentraciones conocidas: 1, 10, 50, 100 y 150 mg N- $\text{NH}_4^+$ /L, a partir de la cual se determinó la concentración de amonio en las muestras (Figura 12, Tabla 16). La lectura del potencial generado por el electrodo se registró con un potenciómetro (Cole-Parmer). 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 la solución de NaOH).

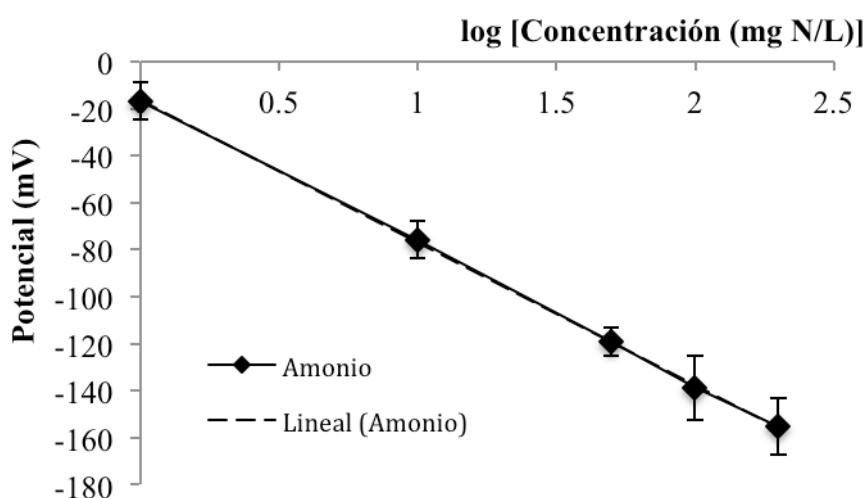


Figura 12. Curva de calibración para la cuantificación de amonio.

### V.5.2 Cuantificación de nitrito y nitrato

Para la cuantificación de nitrito y nitrato, se utilizó un cromatógrafo de líquidos (HPLC, Perkin Elmer serie 200) con una columna de intercambio iónico (Waters IC-Pak Anion HC, 4.6 x 150 mm) y un detector UV-visible. La longitud de onda fue de 214 nm y el flujo de 2 mL/min. La fase móvil consistió en una mezcla de butanol, acetonitrilo y una solución concentrada de gluconato (20:120:20, v:v:v) diluidos con agua desionizada a un volumen de 1 L. La solución borato-gluconato fue preparada con 16 g de gluconato de sodio, 18 g de ácido bórico, 25 g de tetraborato decahidratado de sodio, 250 mL de glicerol y llevados a 1 L con agua desionizada. Se construyó una curva de calibración con soluciones estándares de  $\text{N-NO}_2^-$  y  $\text{N-NO}_3^-$  a las concentraciones de: 0, 25, 50, 100 y 150 mg N/L y se encontró que la respuesta del equipo fue lineal y reproducible (Figura 13 y Tabla 16).

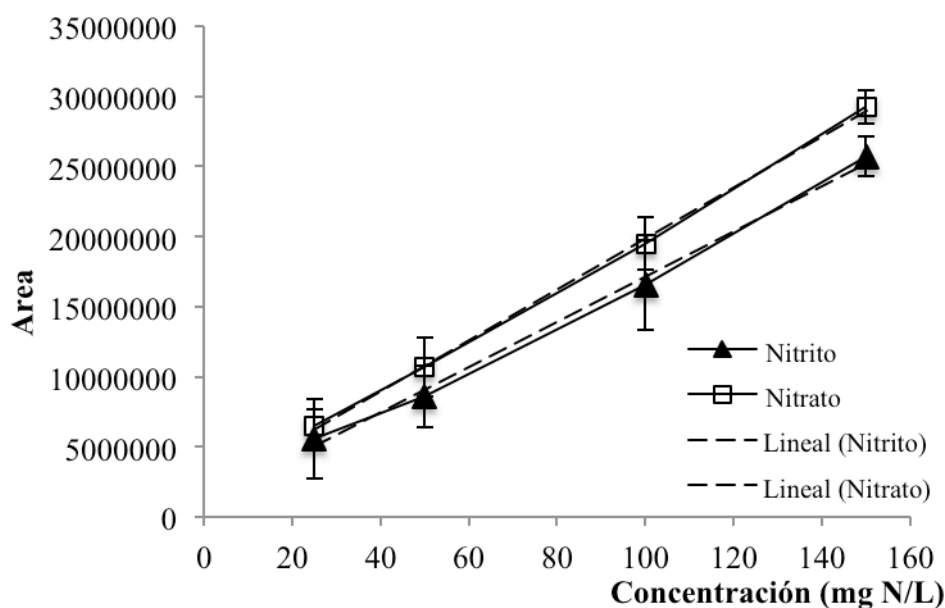


Figura 13. Curva de calibración para la cuantificación de nitrito y nitrato.

### V.5.3 Cuantificación de sulfuro

El procedimiento de cuantificación de sulfuro en fase acuosa se realizó inmediatamente después de tomar la muestra por el método yodométrico (*Bartlett y Skoog, 1954*). En un matraz Erlenmeyer de 100 mL, se adicionó 5 mL de solución de yodo (0.025N previamente valorada), 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 una solución de tiosulfato de sodio



(0.025 N también previamente valorada). Al alcanzar el contenido del matraz una coloración amarilla, se adicionó de 0.5 a 1 mL de indicador de almidón con lo que la solución adquirió una coloración oscura que al continuar la titulación en el punto final cambió a incoloro. Se obtuvo una respuesta lineal y reproducible como lo muestra la curva de calibración obtenida (Figura 14 y Tabla 16).

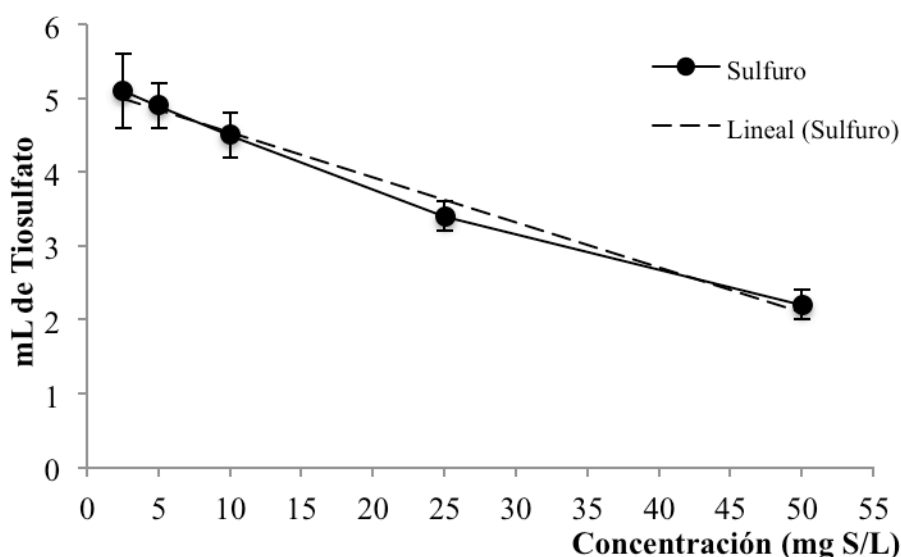


Figura 14. Curva de calibración para la cuantificación de sulfuro.

#### V.5.4 Cuantificación de sulfato y tiosulfato

Para la 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 longitud de onda fue de 308 nm y el flujo de 0.8 mL/min. La fase móvil consistió en una solución de ftalato ácido de potasio (0.04 M). Se construyó una curva estándar a partir de soluciones de  $S-SO_4^{2-}$  y  $S-S_2O_3^{2-}$  con concentraciones conocidas (5, 10, 20, 30 y 50 mg S/L) y se encontró que la respuesta del equipo fue lineal y reproducible (Figura 15 y Tabla 16).

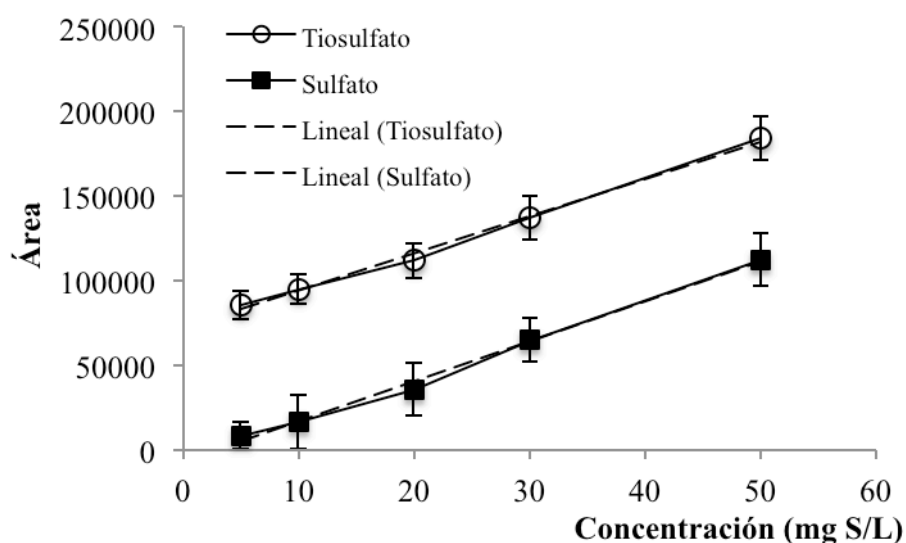


Figura 15. Curva de calibración para la cuantificación de sulfato y tiosulfato.

### V.5.5 Medición de proteína microbiana

La concentración de proteína fue determinada por el método colorimétrico de Lowry (*Lowry y col., 1951*). Para cada serie de muestras analizadas, se preparó una curva de calibración de albúmina (Sigma, 96-99%) de 0 a 300 mg/L (Figura 16 y Tabla 16). Las muestras y los estándares recibieron el mismo tratamiento. Se tomó 1 mL de muestra y se colocó en tubos de ensaye con tapa de rosca de 10 mL. Se adicionó 0.1 mL de NaOH (10 N). Posterior a la agitación mediante un vórtex, se calentaron los tubos por 20 min a 90 °C en un baño seco. Se prepararon tres soluciones: (a) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.19 M en NaOH 0.1 N, (b) CuSO<sub>4</sub> al 1% y (c) tartrato de sodio y potasio al 2 %. Se preparó una solución de trabajo (1 mL solución (b) + 1 mL de solución (c) + 48 mL de solución (a)) que fue posteriormente adicionada a cada tubo (5 mL). Se dejaron reposar los tubos por 30 min en la oscuridad. Posteriormente, se agregó 1 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu, dejando reposar nuevamente en la oscuridad por 1 h, para finalmente medir la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro UV/VIS (Shimadzu, mod. UV-1601). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

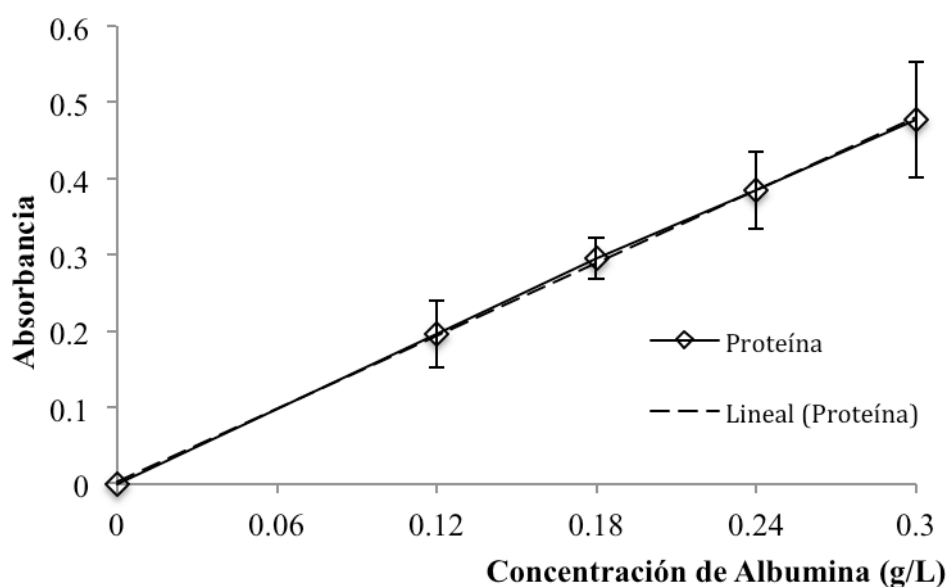


Figura 16. Curva de calibración para la cuantificación de proteína microbiana.

Para todos los métodos analíticos, se corroboró que cada una de las curvas estándares presentaron valores de  $R^2$  superiores a 0.98 y un coeficiente de variación menor al 8 %. Además, se verificó que los métodos fueron reproducibles a través de los coeficientes de variación de las pendientes de las curvas de calibración, los cuales se mantuvieron por debajo de 8 % (Tabla 16).

Tabla 16. Coeficientes de variación (CV) de los valores promedios de: coeficientes de regresión ( $R^2$ ), pendientes (m) y ordenadas al origen (b) de las diferentes curvas de calibración realizadas por cada método analítico.

Compuesto	$R^2$			m			b		
	Promedio	D.E	CV (%)	Promedio	D.E	CV (%)	Promedio	D.E	CV (%)
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0.999	0.011	1.1	60.67	0.97	1.6	16.46	0.21	1.3
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	0.995	0.045	4.5	162037	64329	4.0	925659	34990	3.8
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0.999	0.031	3.1	181843	6274	3.6	2000000	63000	3.1
HS <sup>-</sup>	0.987	0.075	7.6	0.061	0.004	6.8	5.15	0.37	7.3
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0.994	0.045	4.5	2352	84	3.6	6493	160	2.5
S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	0.995	0.021	2.1	2200	135	6.1	72007	3521	4.9
Proteína microbiana	0.996	0.034	3.4	1.593	0.055	3.5	0.004	0.0003	7.3

D.E: Desviación estándar. CV: Coeficiente de variación

# BIBLIOGRAFÍA

---

---

1. Bailey J.E. y Ollis D.F. (1986). Biochemical engineering fundamentals. 2da Edición. McGraw-Hill. 984 pp.
2. Bartlett J.K. y Skoog D.A. (1954). Colorimetric determination of elemental sulfur in hydrocarbons. *Anal Chem.* **26**: 1008 - 1011.
3. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. y Randall R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* **193**: 265 - 275.

RESULTADOS  
Y  
DISCUSIÓN

---

---

REACTOR EN  
CONTINUO

---

---

## VI. Resultados y Discusión

Para el desarrollo de este estudio, se contó con un reactor en continuo como fuente de inóculo de biomasa con actividad nitrificante para poder realizar los estudios en lote.

### VI.1 Reactor nitrificante en continuo

En la Figura 17 y la Tabla 17, se presentan las velocidades volumétricas de carga y descarga de amonio ( $Q_{eNH_4^+}$  y  $Q_{sNH_4^+}$ , respectivamente), así como las velocidades volumétricas de producción de nitrito ( $Q_{sNO_2^-}$ ) y nitrato ( $Q_{sNO_3^-}$ ), obtenidas en el reactor nitrificante en continuo, durante un periodo de 104 días.

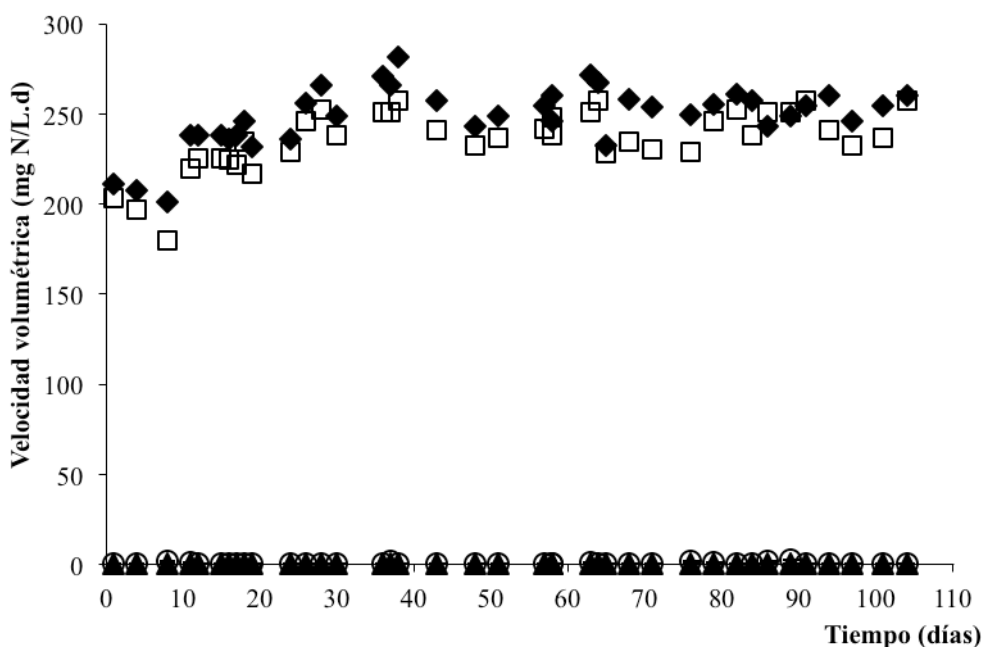


Figura 17. Perfil del reactor nitrificante en continuo:  $Q_{eNH_4^+}$  (◆);  $Q_{sNO_3^-}$  (□);  $Q_{sNO_2^-}$  (▲) y  $Q_{sNH_4^+}$  (○)

Tabla 17. Balance de nitrógeno en el reactor en continuo.

$Q_{eNH_4^+}$ (mg N/L.d)	$Q_{sNH_4^+}$ (mg N/L.d)	$Q_{sNO_2^-}$ (mg N/L.d)	$Q_{sNO_3^-}$ (mg N/L.d)	$Q_s$ biomasa (mg N-Proteína microbiana/L.d)	Porcentaje de recuperación (%)
$249.7 \pm 14.3$	$1.5 \pm 1.7$	$1.9 \pm 1.7$	$236.3 \pm 11.7$	$3.9 \pm 0.3$	97.6

El reactor se alimentó con una  $Q_{eNH_4^+}$  de  $249.7 \pm 14.3$  mg N/L.d. La velocidad de descarga en  $N-NH_4^+$  residual fue muy baja y la velocidad de producción de  $N-NO_3^-$  fue de  $236.3 \pm 11.7$  mg N/L.d. Durante el tiempo de operación del reactor nitrificante, la velocidad



de descarga en  $\text{N-NO}_2^-$  fue despreciable. Se observó que la  $Q_{\text{SNO}_3^-}$  se mantuvo constante con un coeficiente de variación de solamente 5%. Esto indicó que el cultivo nitrificante alcanzó el régimen estacionario.

Se determinó una eficiencia en el consumo de amonio de  $99.4 \pm 5.1$  % y un rendimiento de producción de nitrato de  $0.95 \pm 0.05$  mg  $\text{N-NO}_3^-$ /mg  $\text{N-NH}_4^+$  consumido (Tabla 18). Se encontró que el rendimiento de producción de proteína microbiana ( $Y_{\text{Biomasa}}$ ) fue de  $0.016 \pm 0.002$  mg  $\text{N-proteína}$ /mg  $\text{N-NH}_4^+$  consumido. Esto indicó que menos del 2% del  $\text{N-NH}_4^+$  consumido se utilizó para biosíntesis celular. Tanto el rendimiento alto de producción de nitrato como el bajo rendimiento de biomasa indicaron que el proceso nitrificante fue netamente desasimilativo.

El valor promedio de pH fue  $7.0 \pm 0.5$ . 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.

**Tabla 18.** Valores promedio y desviación estándar de las variables de respuesta del proceso nitrificante en el reactor en continuo.

Variables	Valor
Eficiencia (%)	$99.4 \pm 5.1$
$Y_{\text{NO}_3^-}$ (mg $\text{N-NO}_3^-$ /mg $\text{N-NH}_4^+$ consumido)	$0.95 \pm 0.05$
$Y_{\text{NO}_2^-}$ (mg $\text{N-NO}_2^-$ /mg $\text{N-NH}_4^+$ consumido)	$0.008 \pm 0.002$
$Y_{\text{BO}}$ (mg $\text{N-Proteína}$ microbiana/mg $\text{N-NH}_4^+$ consumido)	$0.016 \pm 0.002$

De acuerdo con los resultados obtenidos, el consorcio nitrificante del reactor en continuo pudo utilizarse para inocular los ensayos en lote y el reactor de lotes secuenciados, ya que se encontraba fisiológicamente estabilizado, con altos valores de eficiencia de consumo de amonio y rendimiento de formación de nitrato.

# CULTIVOS EN LOTE

---

---

## VI.2 Efecto del sulfuro sobre el proceso respiratorio nitrificante

Se procedió a evaluar el efecto del sulfuro mediante cultivos en lote ya que esto nos permitió controlar mejor las condiciones experimentales y obtener datos específicos sobre el efecto del sulfuro como las velocidades específicas del proceso nitrificante. En particular, es importante destacar que todos los cultivos en lote se realizaron con la misma concentración inicial de biomasa, permitiendo la determinación y comparación de las velocidades específicas de consumo de sustrato (amonio y nitrito) y formación de producto (nitrato), variables de respuesta de las rutas metabólicas amonio y nitrito oxidantes.

El principal objetivo de esta parte experimental fue evaluar fisiológica y cinéticamente el proceso nitrificante a diferentes concentraciones iniciales de sulfuro adicionado (3.1-112.0 mg S/L). Para ello, se establecieron los balances de nitrógeno y se hizo uso de variables de respuesta como eficiencias, rendimientos y velocidades específicas. Adicionalmente, se dio seguimiento a la oxidación del sulfuro bajo las condiciones experimentales utilizadas.

### VI.2.1 Ensayo control abiótico

Con la finalidad de evaluar la oxidación química del sulfuro bajo las condiciones experimentales utilizadas, se realizó un ensayo control con sulfuro y amonio pero sin biomasa y se dio seguimiento a las concentraciones de sulfuro, sulfato y amonio durante casi 4 h (Figura 18).

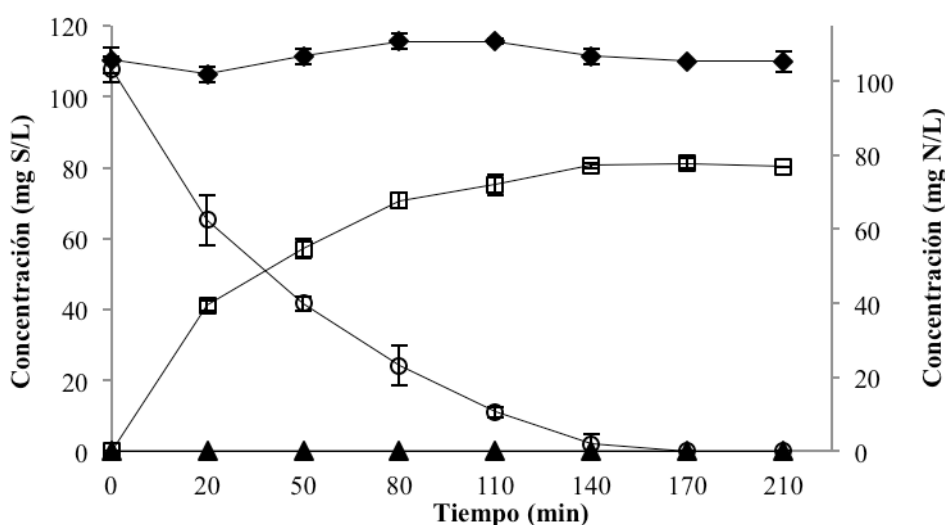
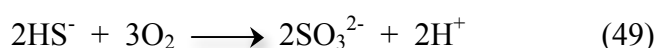
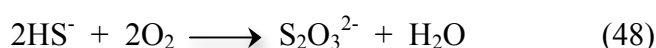
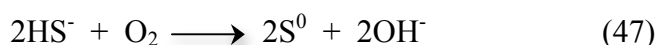


Figura 18. Perfiles de oxidación de amonio (◆), sulfuro (○) y formación de sulfato (□) y tiosulfato (▲) en ensayos abióticos.

La concentración de amonio se mantuvo constante a un valor de  $106.4 \pm 2.8$  mg N/L. Esto permite evidenciar que la oxidación del amonio obtenida en los ensayos posteriores realizados con lodo fue bioquímicamente llevada a cabo por los microorganismos del consorcio nitrificante.

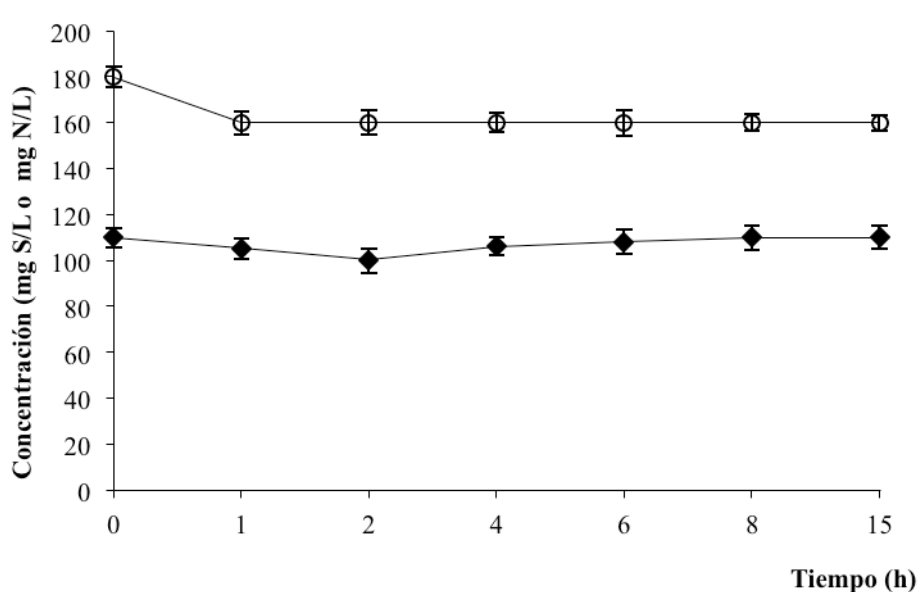
Como se observa en la Figura 18, antes de las 3 h, todo el sulfuro fue oxidado abióticamente, teniendo como producto principal el sulfato. La velocidad de oxidación del sulfuro fue de  $38.0 \pm 2.1$  mg S-HS<sup>-</sup>/L.h. No se registró la formación de tiosulfato durante este periodo de tiempo. Además, se observó un precipitado blanquecino, que se asume que corresponde a la formación de azufre elemental (S<sub>0</sub>). *Chen y Morris (1972)* reportaron en su estudio que el sulfuro en solución acuosa puede ser oxidado químicamente en presencia de oxígeno. *Nielsen y col. (2006)* observaron lo mismo, siendo las condiciones experimentales utilizadas en su estudio, parecidas a las condiciones experimentales del presente estudio. Estos mismos autores observaron también que los productos finales de la oxidación del sulfuro dependen de las condiciones ambientales (pH y temperatura) pero sobre todo de la concentración de oxígeno. *González-Sánchez y Revah (2007)* mostraron que los productos de la oxidación química dependen de la relación estequiométrica de sulfuro y oxígeno y pueden ser polisulfuros, azufre elemental, tiosulfito, tiosulfato y sulfato de acuerdo a las ecuaciones 47-50.



Bajo las condiciones experimentales utilizadas en los ensayos en lote, el sulfuro fue oxidado a sulfato por vía química, por lo tanto en los cultivos nitrificantes realizados posteriormente, se tendrá que tomar en cuenta que la concentración de exposición del lodo al sulfuro no permanece constante y va disminuyendo a través del tiempo y que hay acumulación de sulfato en los cultivos, el cual podría tener también un efecto sobre la nitrificación.

### VI.2.2 Ensayo control con biomasa esterilizada

Se realizó un ensayo control con biomasa esterilizada (120 °C, 20 min) ( $128.0 \pm 6.4$  mg proteína microbiana/L) con una concentración inicial de  $180.0 \pm 4.6$  mg S-HS<sup>-</sup>/L y  $110.0 \pm 3.2$  mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/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 19, se puede apreciar el perfil de las concentraciones de sulfuro y amonio.



**Figura 19.** 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 y posteriormente la concentración permaneció constante. No se presentó la formación de ningún producto azufrado en la fase líquida. Esto se podría explicar debido a que una parte del sulfuro disuelto (HS<sup>-</sup>) pasó a su estado gaseoso (H<sub>2</sub>S no ionizada), cuando se alcanzó el equilibrio químico (Ecuaciones 51 y 52). De acuerdo a la ecuación de Henderson-Hasselbalch (Ecuación 9) y al valor inicial experimental de pH de  $7.8 \pm 0.3$ , se estimó que hasta el 25% del sulfuro podría encontrarse en forma de H<sub>2</sub>S. Esto concuerda con el hecho de que se observó un incremento en el valor de pH de  $7.8 \pm 0.3$  a  $8.6 \pm 0.3$  debido a la adición de sulfuro en los ensayos. Por lo tanto, se sugiere que la disminución inicial en la concentración en sulfuro disuelto observada en la primera hora de ensayo se debió más a la formación de H<sub>2</sub>S que a procesos de adsorción.

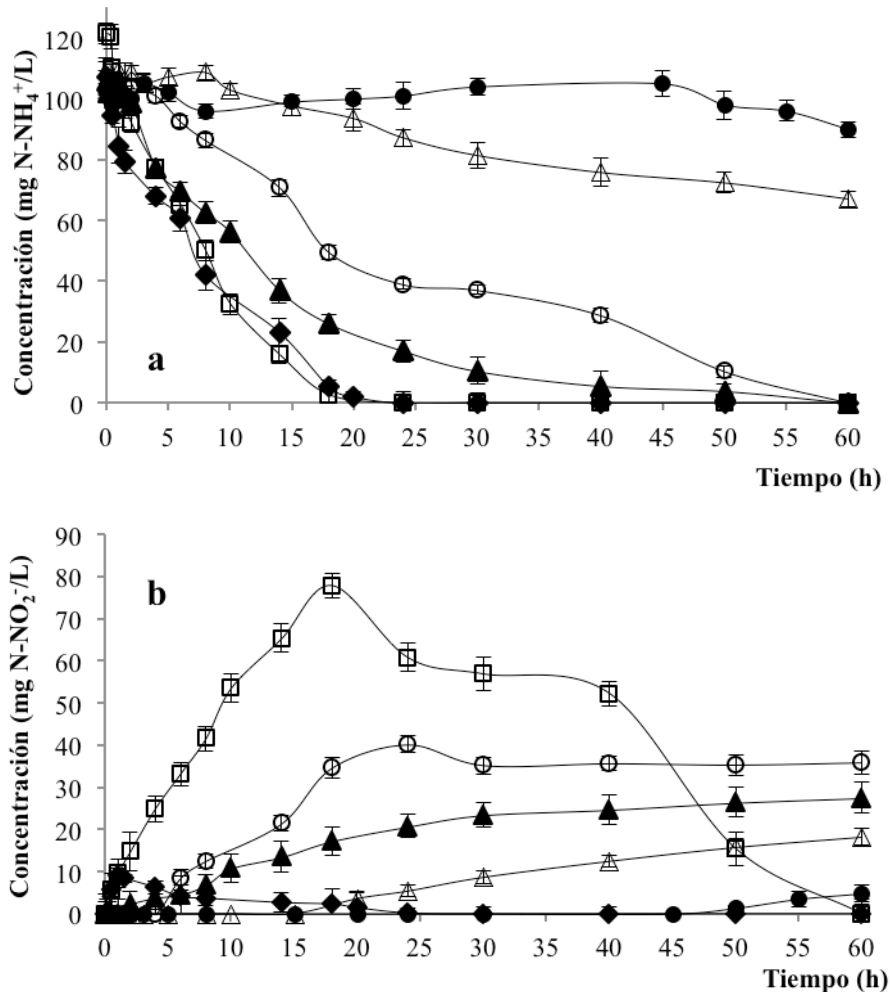


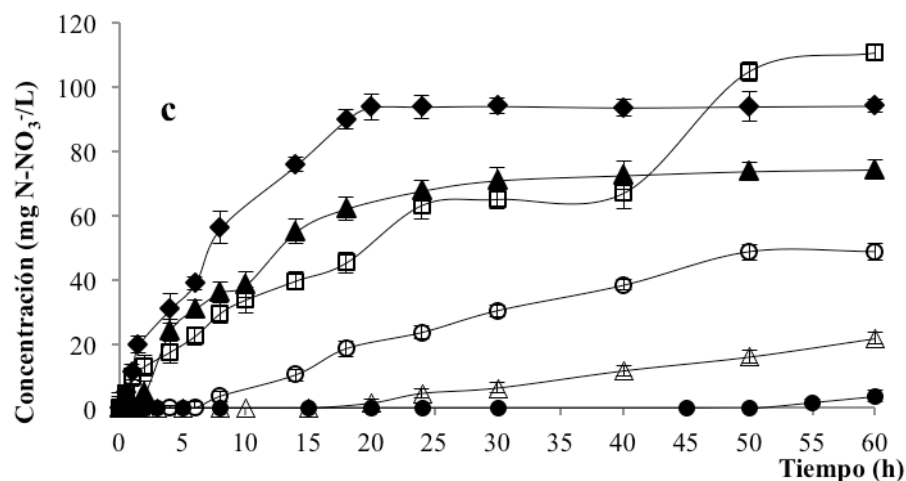
En cuanto al amonio, su concentración se mantuvo constante a un valor promedio de  $107.0 \pm 3.4 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{L}$  y no se presentó la formación de ningún producto nitrogenado.

Con base en los resultados obtenidos, se considera que la adsorción de sulfuro y amonio por la biomasa no fue significativa.

### VI.2.3 Cinética nitrificante con sulfuro

A continuación se presentan los perfiles de consumo de amonio (Figura 20a), acumulación de nitrito (Figura 20b) y formación de nitrato (Figura 20c) en presencia de sulfuro a las diferentes concentraciones ensayadas:  $3.1 \pm 0.2$ ,  $6.4 \pm 0.5$ ,  $13.5 \pm 0.7$ ,  $52.0 \pm 2.6$  y  $112.0 \pm 2.5 \text{ mg S-HS}^-/\text{L}$ .





**Figura 20.** Perfil cinético de consumo de amonio (a), acumulación de nitrito (b) y formación de nitrato (c) a diferentes concentraciones iniciales de sulfuro (mg S/L): 0 (◆), 3.1 (□), 6.4 (▲), 13.5 (●), 52.0 (△) y 112.0 (●).

Se observó que a concentraciones hasta de  $13.5 \pm 0.7$  mg S-HS<sup>-</sup>/L, el amonio fue consumido en su totalidad después de 60 h, determinándose así una eficiencia de consumo de amonio del 100 % (Tabla 19). Estos resultados demuestran que la oxidación de amonio puede realizarse eficientemente a bajas concentraciones de sulfuro. A concentraciones mayores ( $52.0 \pm 2.6$  y  $112.0 \pm 2.5$  mg S-HS<sup>-</sup>/L), la eficiencia de consumo de amonio disminuyó significativamente y se acumuló amonio residual (Tabla 19 y Figura 20a).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Tabla 19.** Balance de nitrógeno, eficiencia de consumo de amonio ( $E_{NH_4^+}$ ) y rendimientos de formación de nitrito ( $Y_{NO_2^-}$ ) y nitrato ( $Y_{NO_3^-}$ ) del proceso nitrificante a diferentes concentraciones iniciales de sulfuro. Valores obtenidos después de 60 h de cultivo, excepto para el ensayo sin sulfuro donde fue calculado después de 24 h.

Sulfuro adicionado (mg S-HS <sup>-</sup> /L)	Conc.				$E_{NH_4^+}$ (%) <sup>a</sup>	$Y_{NO_2^-}$ <sup>b</sup>	$Y_{NO_3^-}$ <sup>c</sup>
	inicial (mg/L)	Concentración final (mg/L)					
		N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>			
0	107.3 ± 3.4	0.0 ± 1.2	0.0 ± 0.8	97.0 ± 2.1	100.0 ± 2.1	0.0 ± 0.1	0.90 ± 0.01
3.1 ± 0.2	121.5 ± 4.2	0.0 ± 1.5	0.0 ± 1.1	110.0 ± 1.3	100.0 ± 3.0	0.0 ± 0.1	0.90 ± 0.01
6.4 ± 0.5	105.8 ± 3.0	0.0 ± 1.1	27.5 ± 2.0	74.0 ± 3.1	100.0 ± 1.6	0.26 ± 0.03	0.70 ± 0.01
13.5 ± 0.7	102.5 ± 2.3	0.0 ± 2.1	36.0 ± 3.1	49.0 ± 2.7	100.0 ± 2.4	0.35 ± 0.02	0.48 ± 0.01
52.0 ± 2.6	110.2 ± 3.2	67.0 ± 3.4	18.0 ± 1.4	21.6 ± 3.0	39.0 ± 2.1	0.42 ± 0.04	0.50 ± 0.01
112.0 ± 2.5	102.0 ± 2.8	90.0 ± 2.4	7.2 ± 0.5	3.7 ± 0.4	11.7 ± 1.0	0.60 ± 0.05	0.30 ± 0.01

$$^a E_{NH_4^+} = (g \text{ N-NH}_4^+ \text{ consumido} / g \text{ N-NH}_4^+ \text{ inicial}) \times 100$$

$$^b Y_{NO_2^-} = g \text{ N-NO}_2^- / g \text{ N-NH}_4^+ \text{ consumido}$$

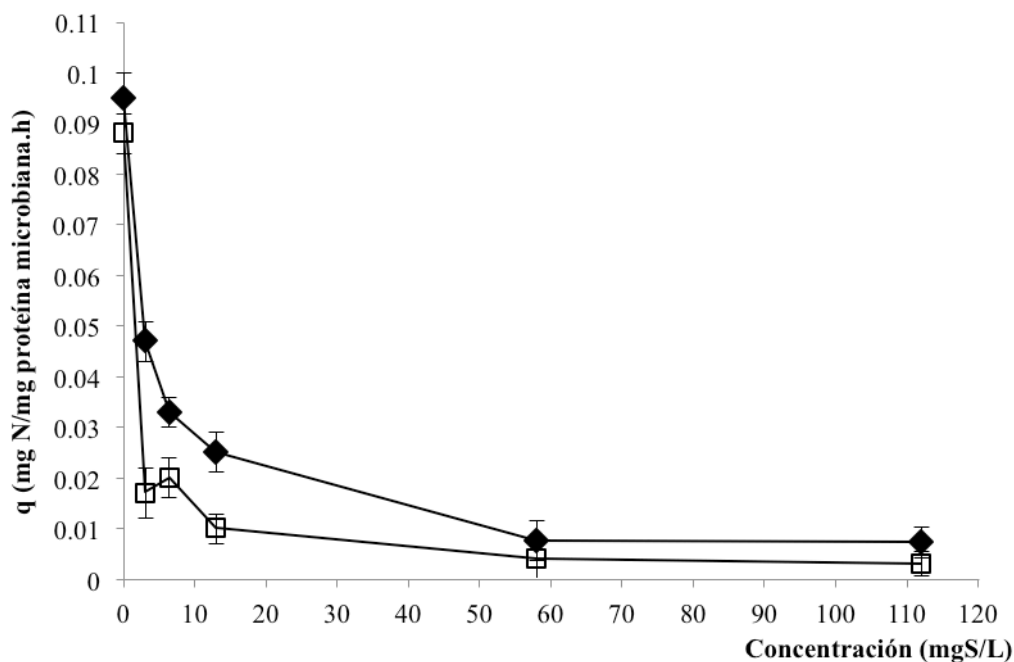
$$^c Y_{NO_3^-} = g \text{ N-NO}_3^- / g \text{ N-NH}_4^+ \text{ consumido}$$

Cabe destacar que a  $3.1 \pm 0.2$  mg S-HS<sup>-</sup>/L, todo el amonio consumido fue oxidado a nitrato, por lo cual se obtuvo un alto valor en rendimiento de formación de nitrato. Sin embargo, a las concentraciones de sulfuro de  $6.4 \pm 0.5$  y  $13.5 \pm 0.7$  mg S-HS<sup>-</sup>/L, a pesar de la elevada eficiencia de consumo de amonio, el nitrato no fue el único producto final de la oxidación de amonio, se registró una significativa acumulación de nitrito. Estos resultados mostraron que la oxidación de nitrito se vio afectada por la adición de sulfuro. A las concentraciones más altas de sulfuro analizadas ( $52.0 \pm 2.6$  y  $112.0 \pm 2.5$  mg S-HS<sup>-</sup>/L), tanto la amonio como la nitrito oxidación se vieron fuertemente afectadas con valores bajos tanto para la eficiencia de consumo de amonio como para el rendimiento de formación de nitrato.

Las variaciones en las velocidades específicas de consumo de amonio y formación de nitrato se muestran en la Figura 21. La adición de sulfuro provocó una disminución significativa sobre ambas velocidades de oxidación. Los porcentajes de disminución variaron desde 51 a 92 % para la velocidad específica de consumo de amonio y de 77 hasta 97 % para la velocidad específica de formación de nitrato. Estos resultados evidencian el efecto inhibitorio del sulfuro sobre ambos procesos oxidativos: amonio y nitrito oxidación. Sin embargo, el proceso nitrito oxidante fue el más afectado por la presencia del sulfuro con respecto al proceso amonio oxidante. Se determinó para cada una de las concentraciones de sulfuro evaluadas una diferencia estadística significativa entre los valores de las velocidades



específicas de consumo de amonio y formación de nitrato con un  $\alpha < 0.038$ .



**Figura 21.** Perfil de velocidades específicas de consumo de amonio (◆) y formación de nitrato (□) a diferentes concentraciones iniciales de sulfuro: 0, 3.1, 6.4, 13.5, 52.0 y 112.0 mg S-HS/L.

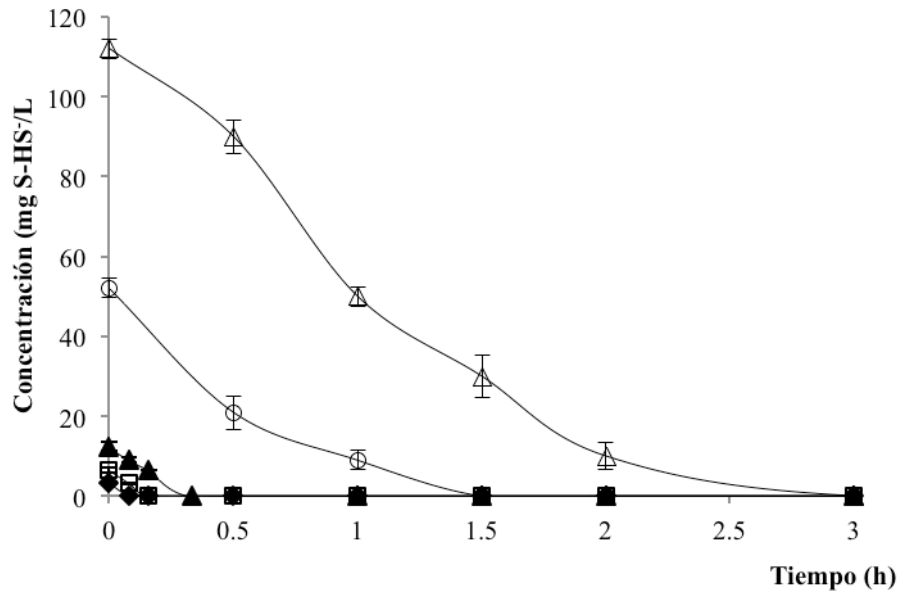
Además, se determinaron los valores de  $IC_{50}$ , definido como la concentración de sulfuro a la cual la velocidad específica de consumo de amonio y/o formación de nitrato disminuyó el 50 %. Los valores de  $IC_{50}$  para los procesos amonio y nitrito oxidantes fueron  $2.6 \pm 0.3$  y  $1.2 \pm 0.2$  mg S-HS/L, respectivamente (*Bejarano y col., 2013*). Estos resultados confirman que el proceso de nitrito oxidación es más sensible al sulfuro que el proceso amonio oxidante y que la presencia de sulfuro puede provocar la acumulación de nitrito en reactores nitrificantes. Esta es la primera vez que se determinaron valores de  $IC_{50}$  para ambos procesos amonio y nitrito oxidantes utilizando biomasa nitrificante en suspensión, fisiológicamente estable y nunca antes expuesta a sulfuro o algún otro compuesto azufrado. *Beristain-Cardoso y col. (2010)* habían reportado anteriormente un valor de  $IC_{50}$  de 13 mg  $S^2-/L$  para el proceso amonio oxidante, siendo este valor cinco veces mayor que el valor encontrado en el presente trabajo. Cabe destacar que en el estudio de *Beristain-Cardoso y col. (2010)* se utilizó una biomasa nitrificante en biopelícula previamente expuesta a tiosulfato en un reactor continuo, la cual mostró una capacidad metabólica para oxidar tiosulfato y sulfuro a sulfato. La mayor tolerancia al sulfuro por la biomasa nitrificante utilizada en el estudio de *Beristain-Cardoso y col. (2010)* podría deberse al origen y historial del inóculo, así como al hecho de que estuvo

en forma de biopelícula. En un estudio más reciente realizado por *Zhou y col. (2014)*, se evaluó el impacto de la exposición previa del lodo a diferentes concentraciones de sulfuro bajo condiciones anaerobias sobre la amonio oxidación. Se determinaron valores de  $IC_{50}$  de 36 y 10 mg  $S^{2-}/L$  después de una exposición previa al sulfuro bajo condiciones anaerobias de 1.0 y 1.5 h, respectivamente. Estos valores muestran que el lodo tuvo una alta tolerancia al sulfuro pero esto también podría deberse a que la biomasa utilizada en este estudio provenía de una planta de tratamiento de aguas residuales tanto industriales como urbanas, expuesta a una gran variedad de compuestos tóxicos. Además, el desarrollo de los experimentos fue distinto con el objetivo principal de evaluar el efecto del tiempo de exposición previa del lodo a sulfuro bajo condiciones anaerobias sobre la nitrificación. Estas diferencias experimentales dificultan la comparación de los datos entre los diferentes estudios.

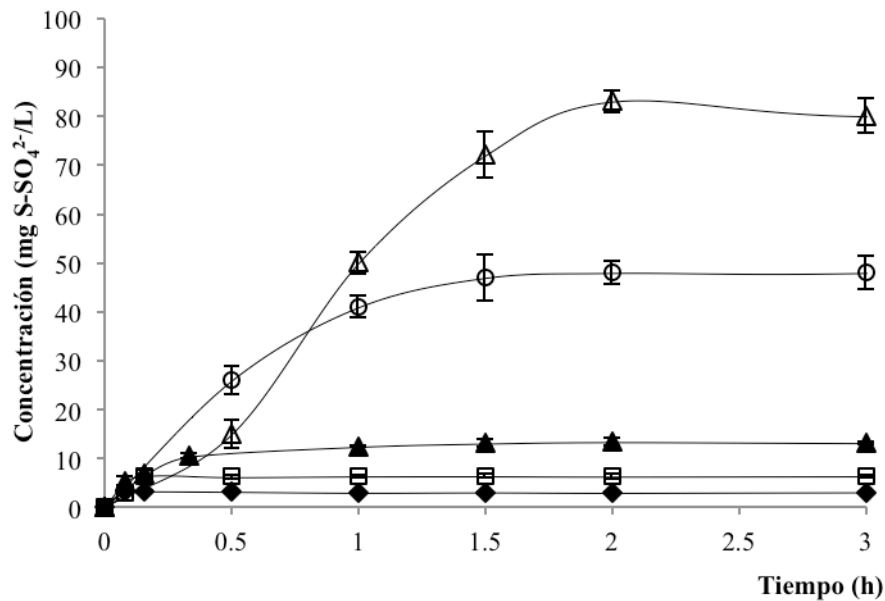
Los resultados obtenidos mostraron que el proceso nitrito oxidante es más sensible a la presencia de sulfuro que el proceso amonio oxidante. Por lo tanto, la presencia de sulfuro en efluentes puede causar una acumulación de nitrito durante la nitrificación. De hecho, *Erguder y col. (2008)* propuso adicionar sulfuro en un reactor de lotes secuenciados como una herramienta para inhibir la nitrito oxidación y propiciar una nitrificación parcial. Sin embargo, en un sistema convencional de tratamiento de aguas residuales acoplando nitrificación-desnitrificación, la acumulación de nitrito es indeseable en reactores nitrificantes ya que el nitrito puede inhibir este proceso (*Silva y col., 2011*). La información del efecto del sulfuro sobre el proceso nitrito oxidante es aún muy limitada y no queda claro por qué el proceso nitrito oxidante es más sensible al sulfuro que el proceso amonio oxidante. En cultivos nitrificantes en suspensión, el sulfuro podría afectar de diferente manera la actividad de las enzimas involucradas en la nitrificación (AMO, HAO y NOR). En cultivos con biopelículas nitrificantes, *Beristain-Cardoso y col. (2010)* sugieren que el azufre elemental formado por la oxidación parcial del sulfuro podría afectar el transporte de nitrito dentro de la biopelícula. Sin embargo, es necesario investigar más a fondo para entender mejor cómo son afectadas las rutas oxidativas de la nitrificación por el sulfuro.

#### **VI.2.4 Oxidación del sulfuro en cultivos nitrificantes**

A continuación se presentan los perfiles de oxidación del sulfuro (Figura 22) y formación de sulfato (Figura 23) a las diferentes concentraciones ensayadas de sulfuro.



**Figura 22.** Perfil cinético de oxidación de sulfuro a diferentes concentraciones iniciales: 3.1 (◆) 6.4 (◻) 13.5 (□) 52.0 (▲) y 112.0 (Δ) mg S-HS<sup>-</sup>/L.



**Figura 23.** Perfil cinético de formación de sulfato a diferentes concentraciones iniciales de sulfuro: 3.1 (◆) 6.4 (◻) 13.5 (□) 52.0 (▲) y 112.0 (Δ) mg S-HS<sup>-</sup>/L.

En todos los cultivos nitrificantes, el sulfuro fue rápida y completamente oxidado en menos de 3 h. Los perfiles cinéticos de la oxidación del sulfuro fueron similares en todos los ensayos realizados, obteniéndose sulfato como principal producto final (Tabla 20). A las concentraciones en sulfuro de 3.1 a 52.0 mg/L, el sulfato fue el producto de la oxidación del sulfuro en un  $96 \pm 5 \%$ . A 112.0 mg/L, el 76 % del sulfuro inicial fue convertido a sulfato,

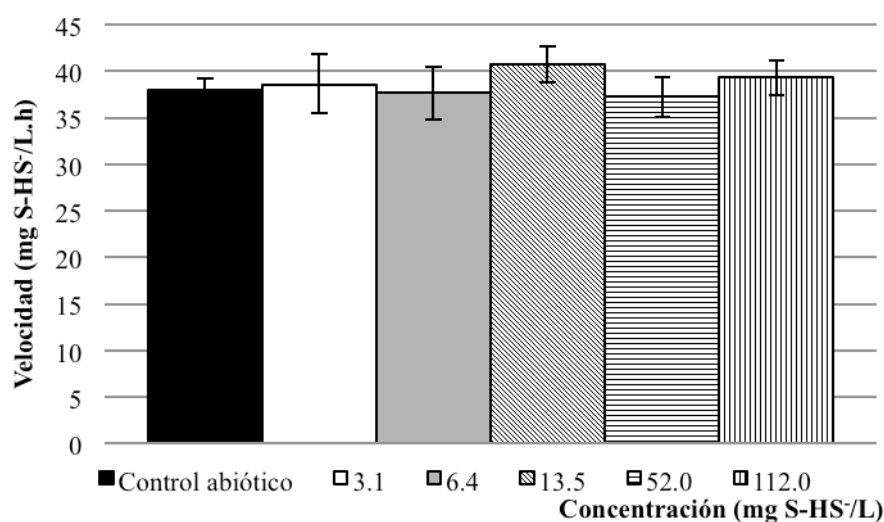
aunque no se pudo descartar la formación de otros productos de oxidación tales como polisulfuros, sulfito o azufre elemental ya que no se cuantificaron.

**Tabla 20.** Balance de azufre en los cultivos nitrificantes en lote después de 60 h (mg S/L).

S-HS <sub>i</sub>	S-HS <sub>f</sub>	S-S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> <sub>f</sub>	S-SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> <sub>f</sub>
3.1 ± 0.2	0	0	3.1 ± 0.3
6.4 ± 0.5	0	0	6.4 ± 0.6
13.5 ± 0.7	0	0	12.8 ± 0.5
52.0 ± 2.6	0	0	46.0 ± 2.9
112.0 ± 2.5	0	5.2 ± 0.6	80.0 ± 1.8

i: al inicio de los cultivos; f: al final de los cultivos después de 60 h.

No se observó una diferencia significativa ( $\alpha > 0.86$ ) entre los promedios de las velocidades de oxidación de sulfuro a las diferentes concentraciones analizadas en los cultivos en lote (Figura 24) ( $38.7 \pm 2.7$  mg S-HS<sup>-</sup>/L.h) con respecto a la encontrada en el ensayo sin biomasa (control abiótico) ( $38.0 \pm 2.1$  mg S-HS<sup>-</sup>/L.h.), indicando que aún en presencia de lodo nitrificante, la oxidación de sulfuro fue principalmente debida a una oxidación química.



**Figura 24.** Velocidad de oxidación del sulfuro en cultivos nitrificantes.

La oxidación química espontánea del sulfuro en presencia de oxígeno ha sido previamente reportada y varios trabajos muestran la coexistencia de la oxidación química y biológica del sulfuro en aguas residuales y reactores biológicos (*Chen y Morris, 1972*). Se ha reportado que las cinéticas de ambos procesos de oxidación dependen de varios factores ambientales como: valor de pH, temperatura, concentración de oxígeno, fuerza iónica y la

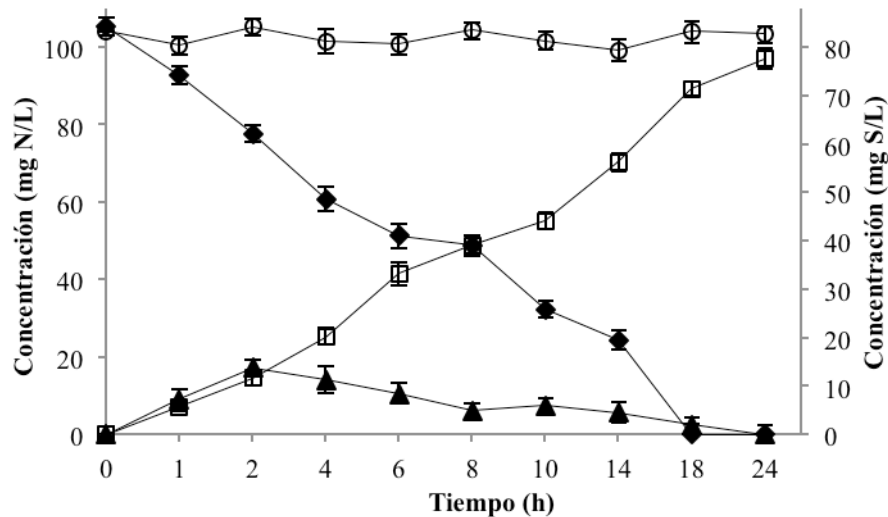
presencia de inhibidores o catalizadores (*O'Brien y Brikner, 1977; Nielsen y col., 2006*). Por otra parte, se ha determinado que la estequiometría de la oxidación del sulfuro es compleja y puede resultar en la formación de distintos productos tales como: azufre elemental, sulfuro, polisulfuros, tiosulfato, sulfito y sulfato (*Nielsen y col., 2006; González-Sánchez y Revah, 2007*). La capacidad metabólica de oxidar sulfuro y la velocidad de oxidación biológica de un lodo también dependen de varios factores como: origen del lodo, historia del lodo, tipo de lodo (biopelícula, flóculo, gránulo), concentración inicial de biomasa, y concentración inicial de sustrato (sulfuro, oxígeno) entre otros. Por lo tanto, en reactores biológicos aireados, se podrá dar la oxidación química y/o biológica a diferentes velocidades y obteniéndose diferentes productos de oxidación del sulfuro, ya que las condiciones de operación (concentración en sustratos y biomasa, historial previo del inóculo, etc.) tienen un impacto en la cinética de las reacciones involucradas, así como en los productos formados, cumpliendo con la estequiometría. Por ejemplo, *Beristain-Cardoso y col. (2010)* utilizaron un inóculo previamente alimentado con amonio y tiosulfato en un reactor en continuo y observaron en cultivos en lote que el lodo fue capaz de oxidar biológicamente el tiosulfato a una velocidad 56 veces mayor que la velocidad de oxidación química. Reportaron también que la oxidación del sulfuro a sulfato observada en sus ensayos fue llevada a cabo principalmente por vía bioquímica. Es muy probable que la alimentación previa del lodo con tiosulfato, entre otros posibles factores, haya tenido un papel decisivo en la capacidad metabólica del lodo para oxidar rápidamente tiosulfato y sulfuro. Estos resultados difieren de los encontrados en el presente trabajo donde la oxidación del sulfuro fue mayoritariamente abiótica. Esto se debe probablemente al hecho de que se utilizó un inóculo que nunca había sido expuesto a ningún compuesto azufrado. La oxidación química del sulfuro en reactores aireados podría ser ventajosa para la nitrificación ya que puede disminuir la concentración del sulfuro como compuesto inhibitorio.

Es importante destacar también que aún cuando el sulfuro fue oxidado rápidamente a sulfato en los cultivos (antes de 3 h), el tiempo y la concentración de exposición del lodo al sulfuro fueron suficientes para provocar una inhibición de la nitrificación durante 60 h (Figuras 20 y 21). Esta información es relevante para el tratamiento de aguas residuales, indicando que la presencia de sulfuro en efluentes aún a concentraciones bajas podría alterar fuertemente la actividad nitrificante de lodos activados y provocar la acumulación de nitrito.

### VI.2.5 Efecto del sulfato, pH y oxígeno sobre la nitrificación

Para confirmar que la inhibición observada en la nitrificación fue debida a la adición de sulfuro y descartar que fuera por algún otro efecto externo, se evaluó el efecto de la concentración de sulfato, del valor de pH y la concentración en oxígeno disuelto en los ensayos nitrificantes.

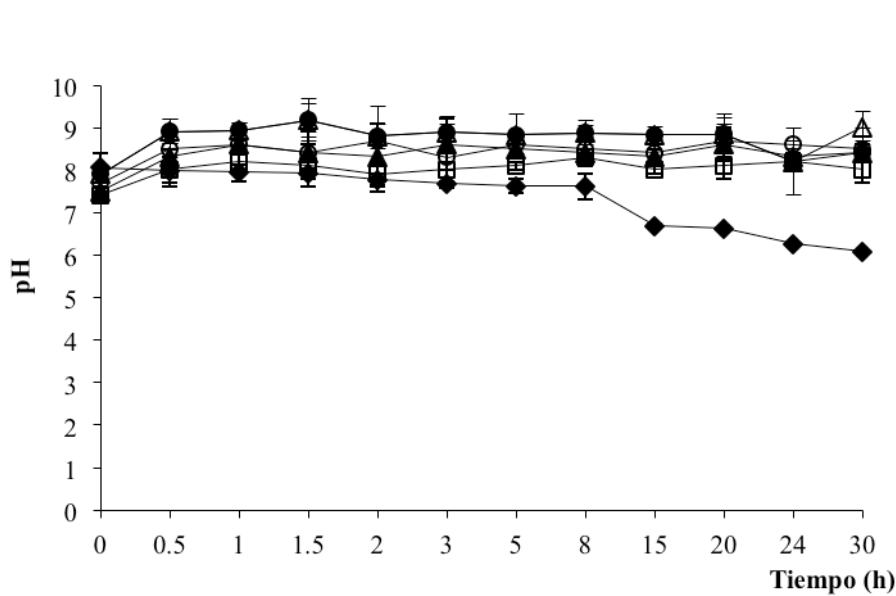
Primeramente, se realizó una cinética nitrificante con una concentración inicial de sulfato de  $83.2 \pm 2.6$  mg S-SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>/L ya que en todos los casos fue el producto final de la oxidación de sulfuro y estuvo presente en casi todo el tiempo que duraron los cultivos nitrificantes en lote con sulfuro (Figura 25). Se encontró que el sulfato no tuvo un efecto negativo sobre el proceso respiratorio nitrificante ya que los valores de las variables de respuesta ( $E_{NH_4^+} = 100.0 \pm 3.5$  %,  $Y_{NO_3^-} = 0.86 \pm 0.07$ ,  $q_{NH_4^+} = 0.093 \pm 0.004$  mg N/mg proteína microbiana.h y  $q_{NO_3^-} = 0.085 \pm 0.006$  mg N/mg proteína microbiana.h) se mantuvieron cercanos a los valores obtenidos en el ensayo control nitrificante ( $E_{NH_4^+} = 100.0 \pm 2.1$  %,  $Y_{NO_3^-} = 0.90 \pm 0.01$ ,  $q_{NH_4^+} = 0.095 \pm 0.005$  mg N/mg proteína microbiana.h y  $q_{NO_3^-} = 0.088 \pm 0.004$  mg N/mg proteína microbiana.h). De esta forma, se mostró que el sulfato no fue el causante del efecto inhibitorio observado.



**Figura 25.** Perfil de consumo de amonio (◆), 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 (○).

Por otro lado, se observó un incremento en el valor de pH de  $7.5 \pm 0.4$  a  $8.6 \pm 0.3$  en los primeros treinta minutos de cultivo debido a la adición de sulfuro (Na<sub>2</sub>S.9H<sub>2</sub>O) en los cultivos

en lote (Ecuaciones 51 y 52) (Figura 26). Después de ese tiempo, el valor de pH permaneció constante a lo largo de los cultivos. Sin embargo, se descartó que este aumento en el valor de pH fuera el causante del efecto negativo registrado ya que se ha reportado que a estos valores de pH se puede realizar satisfactoriamente el proceso nitrificante (*Tang y col., 2009*).



**Figura 26.** Valores de pH durante las cinéticas en lote a diferentes concentraciones de sulfuro: 0 (◆), 3.1 (□), 6.4 (▲), 13.5 (●), 52.0 (Δ) y 112.0 (●) mg S-HS-/L.

Se verificó también que bajo las condiciones experimentales de los ensayos en lote no existiera limitación de oxígeno. De acuerdo a la estequiometría, de 0.8 a 2.3 mmol de  $O_2$  fueron requeridos para oxidar completamente el amonio ( $108 \pm 7$  mg  $N-NH_4^+/L$ ) a nitrato y el sulfuro (3.1 a 112.0 mg S-HS-/L) a sulfato. De acuerdo a las mediciones de oxígeno disuelto en los cultivos, se determinó que se encontraba una mayor concentración de  $O_2$  disponible en los cultivos en lote correspondiendo a 2.4 mmol de  $O_2$  (espacio de cabeza y fase líquida). Adicionalmente, un ensayo control con 112.0 mg S-HS-/L fue realizado con una inyección adicional intermedia de  $O_2$  después de 3 h de haber iniciada la cinética. En este ensayo, no se observó ninguna diferencia significativa en los perfiles cinéticos de la nitrificación en comparación con los realizados sin adición intermedia de oxígeno. En ambos casos, el consumo de amonio inició después de 40 h y con una velocidad específica similar, esto confirmó que no hubo limitación de oxígeno en los ensayos en lote. Lo anterior confirma que el sulfuro fue el responsable de la inhibición de la nitrificación.

## VI.2.6 Constantes cinéticas de los procesos amonio y nitrito oxidantes sin y con sulfuro como inhibidor

Los resultados anteriores podrían sugerir un efecto inhibitorio del sulfuro sobre las enzimas nitrificantes (AMO, HAO y NOR) como lo reportaron *Juliette y col. (1993)* para distintos tioéteres y *Sears y col. (2004)* para el sulfuro sobre la AMO. Sin embargo, la información al respecto es todavía muy limitada. De acuerdo con *Bejarano y col. (2013)* quienes compilaron los trabajos publicados en la literatura sobre la inhibición de la nitrificación por sulfuro, la mayoría de los estudios fueron enfocados al estudio de la primera etapa de la nitrificación, la amonio oxidación, y muy poca información es disponible sobre los efectos en la nitrito oxidación. La AMO es la enzima más comúnmente identificada como la enzima inhibida por los inhibidores de la nitrificación y diversos mecanismos inhibitorios han sido reportados en la literatura para esta enzima. De acuerdo con *McCarty (1999)*, la AMO puede oxidar una amplia gama de sustratos y más de cuarenta compuestos han sido reportados como posibles sustratos de esta enzima. Se considera que los efectos inhibitorios de la mayoría de estos compuestos son debido a una competición por el sitio activo de la enzima (inhibición competitiva) pero se ha reportado también efectos de inhibición tipo no-competitiva (*Keener y Arp, 1993*). Otros compuestos, tal como el acetileno, son oxidados por la AMO a productos altamente reactivos, los cuales inactivan la enzima, causando una inhibición irreversible (*Hyman y Wood, 1985*). Una amplia gama de compuestos azufrados tal como la tiourea inhiben la nitrificación, probablemente por enlace con el cobre del sitio activo u otros metales tales como el hierro y el zinc que han sido también reportados como participando en la actividad de la AMO (*Juliette y col., 1993; McCarty, 1999; Gilch y col., 2009*). El papel de los metales: cobre, hierro, molibdeno, manganeso y zinc en la actividad de la NOR ha sido también reportado, sugiriendo que la NOR podría ser inhibida de la misma manera (*Meincke y col., 1992*). Sin embargo, la información sobre los mecanismos de inhibición de la NOR es todavía muy limitada. Los resultados de *Sears y col. (2004)* indicaron que el sulfuro provocaría una inhibición reversible sobre la amonio oxidación y se sugirió que la inhibición no fuera del tipo competitiva. Sin embargo, se desconoce el tipo de inhibición reversible involucrada (competitiva, no-competitiva, acompetitiva, mixta). Se sabe todavía muy poco acerca de la inhibición de la nitrificación por el sulfuro y hace falta una mayor investigación para poder entender mejor los mecanismos involucrados en la inhibición de los procesos amonio y nitrito oxidantes por el sulfuro. Por lo tanto, en la siguiente parte de este

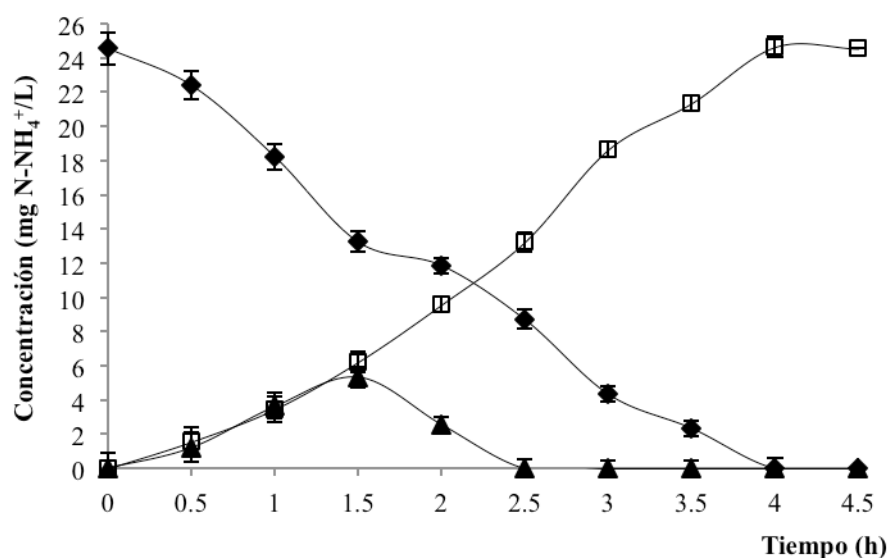


trabajo, se investigó el tipo de inhibición que causa el sulfuro sobre estos procesos. Para ese propósito, las constantes cinéticas ( $K_s$ : constante de afinidad y  $q_{max}$ : velocidad específica máxima de consumo de sustrato), así como las constantes de inhibición ( $K_i$ ), se determinaron a partir de datos experimentales obtenidos en cultivos en lote independientes con amonio o nitrito como sustrato.

### VI.2.6.1 Cultivo control amonio oxidante

Primero, se llevaron a cabo cultivos amonio oxidantes control sin sulfuro utilizando biomasa proveniente del reactor en continuo en régimen estacionario y amonio como sustrato. El objetivo fue establecer las cinéticas del proceso respiratorio amonio oxidante, para calcular las variables de respuesta: eficiencia, rendimientos, velocidades volumétricas y específicas de consumo de amonio y producción de nitrato.

Como se puede observar en la Figura 27, el amonio fue consumido en su totalidad, teniendo como producto principal nitrato después de 4 h de incubación. Se presentó la formación transitoria de nitrito, mismo que desapareció después de 2.5 h. De acuerdo con lo anterior se calcularon las variables de respuesta (Tabla 21).



**Figura 27.** Perfiles de consumo de amonio (◆) y formación de nitrito (▲) y nitrato (□) en los cultivos en lote amonio oxidantes a 25 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L.

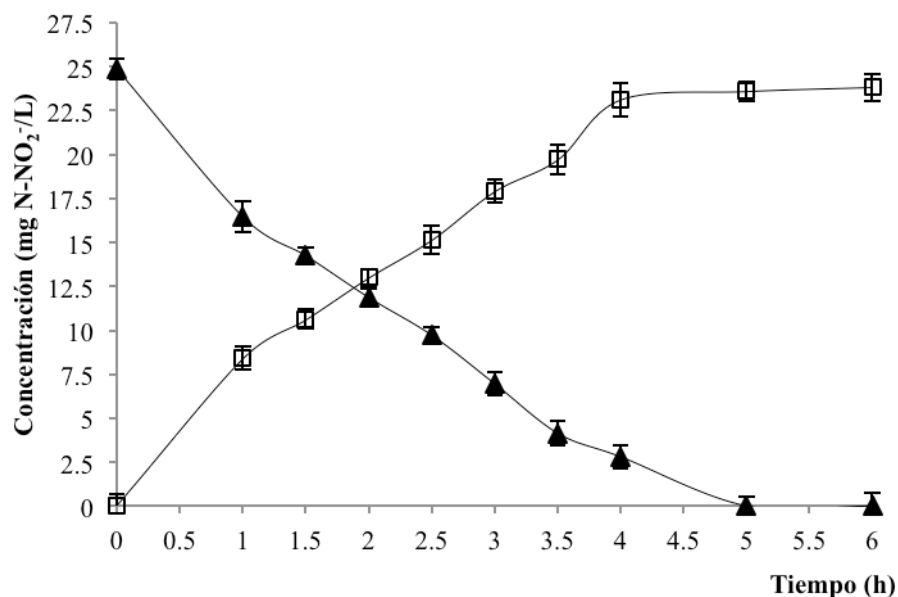
**Tabla 21.** Variables de respuesta del proceso respiratorio amonio oxidante a 25 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L.

Variables	Promedio
E <sub>NH4+</sub> (%)	100.0 ± 2.3
Y <sub>NO3-</sub> (mg N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /mg N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> consumido)	0.98 ± 0.04
Y <sub>NO2-</sub> (mg N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /mg N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> consumido)	0
q <sub>NH4+</sub> (mg N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /mg proteína microbiana·h)	0.127 ± 0.010
q <sub>NO3-</sub> (mg N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /mg proteína microbiana·h)	0.130 ± 0.014

Después de 4 h de incubación, se obtuvo una eficiencia de consumo de amonio del 100 % y un rendimiento de nitrato cercano a 1. Los resultados mostraron que las condiciones experimentales utilizadas en los cultivos en lote fueron adecuadas para llevar a cabo el proceso respiratorio amonio oxidante con altos valores de eficiencia y rendimiento de formación de nitrato.

### VI.2.6.2 Cultivo control nitrito oxidante

De la misma forma, se llevaron a cabo cultivos nitrito oxidantes control sin sulfuro utilizando biomasa proveniente del reactor en continuo y nitrito como sustrato. Como se puede observar en la Figura 28, el nitrito fue consumido en su totalidad, teniendo como producto principal nitrato después de 5 h. De acuerdo con lo anterior se calcularon las variables de respuesta (Tabla 22).



**Figura 28.** Perfiles de consumo de nitrito (▲) y formación de nitrato (□) en los cultivos en lote nitrato oxidantes a 25 mg N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/L.

**Tabla 22.** Variables de respuesta del proceso respiratorio nitrato oxidante control a 25 mg N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/L.

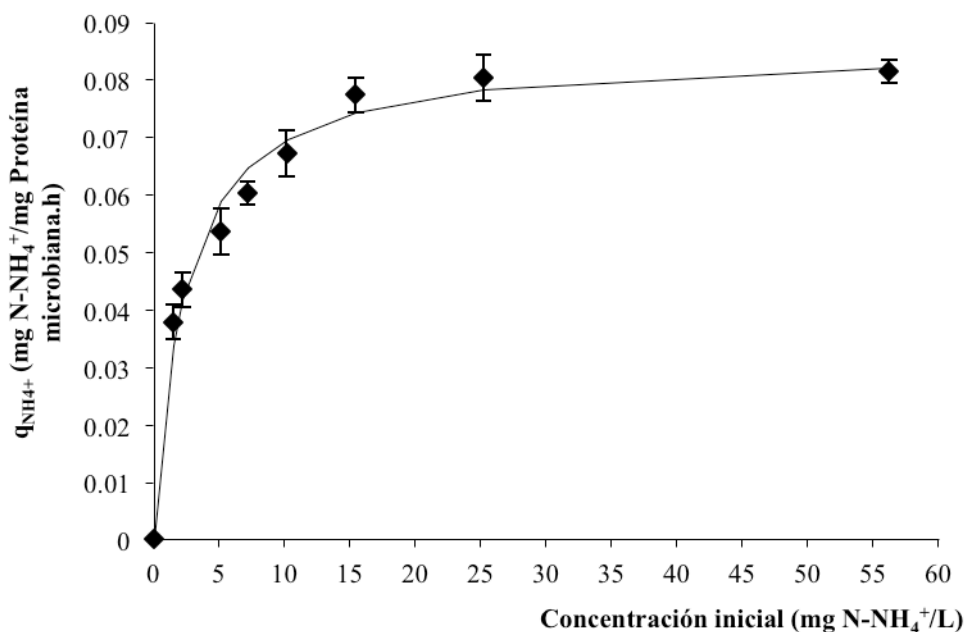
Variables	Promedio
$E_{NO_2^-}$ (%)	100.0 ± 2.3
$Y_{NO_3^-}$ (mg N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /mg N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> consumido)	0.99 ± 0.06
$q_{NO_2^-}$ (mg N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /mg proteína microbiana·h)	0.117 ± 0.010
$q_{NO_3^-}$ (mg N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /mg proteína microbiana·h)	0.108 ± 0.011

Después de 5 h de incubación, se obtuvo una eficiencia de consumo de nitrito del 100 % y un alto rendimiento de nitrato. Los resultados mostraron que las condiciones experimentales utilizadas en los cultivos en lote fueron adecuadas para llevar a cabo el proceso respiratorio nitrato oxidante con altos valores de eficiencia y rendimiento de formación de nitrato.

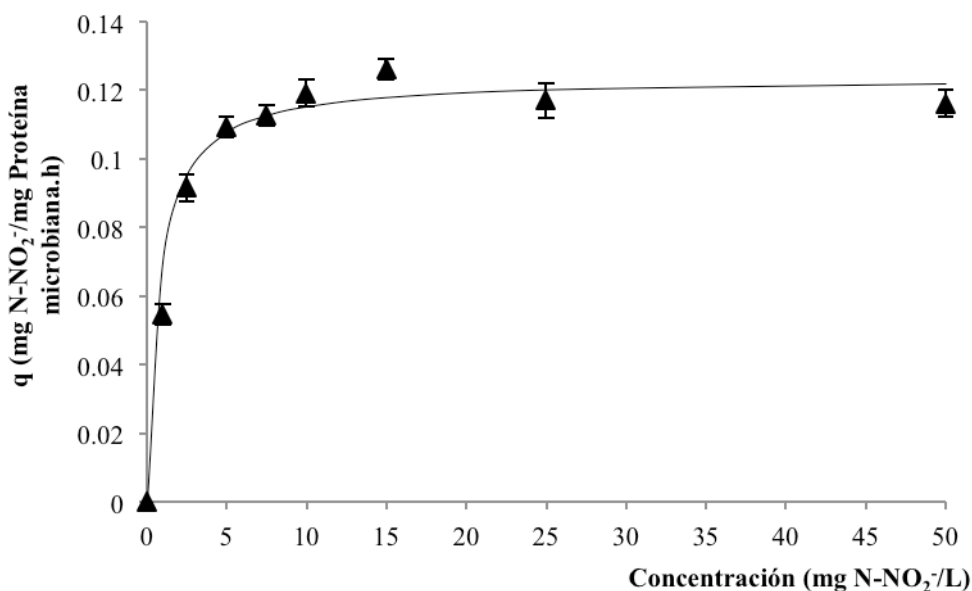
### VI.2.6.3 Constantes cinéticas de la nitrificación sin sulfuro

Posteriormente, se realizaron ensayos en lote con el objetivo de determinar las constantes cinéticas ( $K_s$  y  $q_{max}$ ) del lodo nitrificante para ambas rutas metabólicas: amonio y nitrito oxidación. Las cinéticas de consumo de amonio y nitrito se realizaron dentro de un intervalo de concentraciones de 1 a 57 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> o N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/L. Las velocidades específicas de

consumo de sustrato se determinaron mediante una regresión lineal ( $R^2 > 0.986$ ) para cada concentración de sustrato evaluada (Figuras 29 y 30).



**Figura 29.** Curva de Monod de la amonio oxidación (◆) a diferentes concentraciones iniciales de amonio (0 a 57 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L). La línea sólida (—) es el mejor ajuste a los datos experimentales mediante la ecuación de Monod.



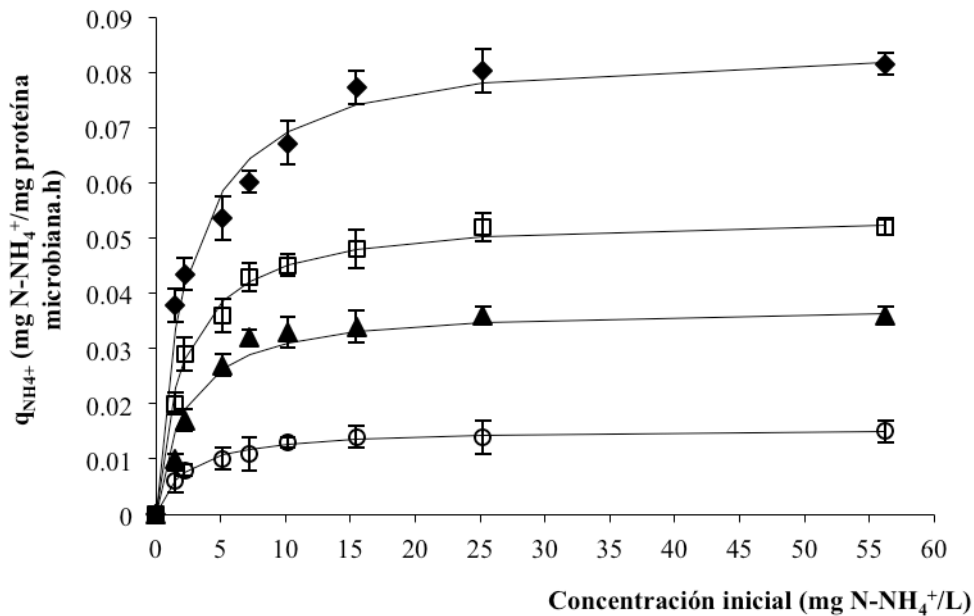
**Figura 30.** Curva de Monod de la nitrito oxidación (▲) a diferentes concentraciones iniciales de nitrito (0 a 50 mg N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/L). La línea sólida (—) es el mejor ajuste a los datos experimentales mediante la ecuación de Monod.

Las constantes cinéticas de Monod ( $K_s$  y  $q_{max}$ ) se determinaron por un método no lineal usando el paquete Sigma plot 10 (Systat Software Inc., 2010). El modelo de Monod describió satisfactoriamente los datos experimentales en ambos casos ( $R^2 > 0.98$ ). Los valores

obtenidos fueron  $K_{sNH_4^+} = 2.41 \pm 0.11$  mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L y  $q_{maxNH_4^+} = 0.086 \pm 0.008$  mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/mg proteína microbiana.h para la amonio oxidación y  $K_{sNO_2^-} = 0.74 \pm 0.03$  mg N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/L y  $q_{maxNO_2^-} = 0.124 \pm 0.001$  mg N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/mg proteína microbiana.h para la nitrito oxidación. Los resultados indican que el lodo nitrificante presenta una mayor afinidad para el nitrito como sustrato así como una mayor velocidad específica máxima de oxidación de nitrito.

#### VI.2.6.4 Constantes cinéticas de la nitrificación en presencia de sulfuro

La Figura 31 presenta las curvas de Monod de la amonio oxidación a diferentes concentraciones de sulfuro adicionado (2.5, 3.5 y 5.0 mg S-HS<sup>-</sup>/L).

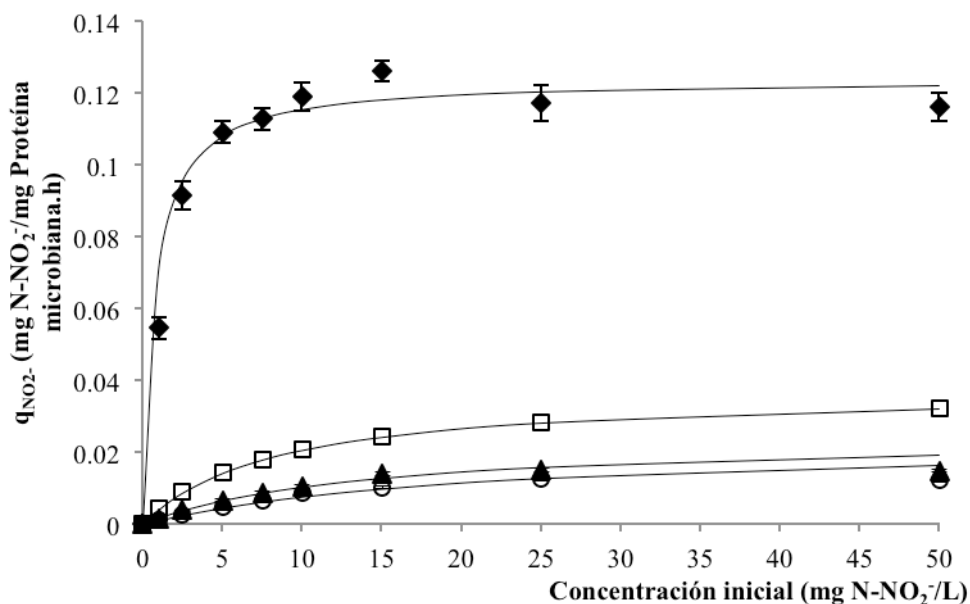


**Figura 31.** Curvas de Monod de la amonio oxidación a diferentes concentraciones iniciales de sulfuro: 0 (◆), 2.5 (□), 3.5 (▲) y 5.0 (○) mg S-HS<sup>-</sup>/L. Las líneas sólidas (—) son las curvas del mejor ajuste de los datos experimentales usando la ecuación de Monod en el caso de los ensayos sin sulfuro y para los ensayos con adición de sulfuro.

Como se puede observar en la Figura 31, la presencia de sulfuro ocasionó una disminución en la velocidad del proceso amonio oxidante. Estos resultados muestran claramente que el sulfuro a 2.5, 3.5 y 5.0 mg S/L tuvo un efecto inhibitorio sobre la amonio oxidación, disminuyendo la velocidad específica máxima del proceso de 36, 53 y 76 %, respectivamente (Tabla 23).

De la misma forma, un claro efecto inhibitorio del sulfuro sobre la nitrito oxidación fue también observado (Figura 32). A 2.5, 3.5 y 5.0 mg S/L, la  $q_{maxNO_2^-}$  disminuyó de 70, 80 y 82

%, respectivamente (Tabla 23). Estos porcentajes de disminución en la velocidad fueron mayores que los obtenidos para la amonio oxidación a las mismas concentraciones iniciales en sulfuro. Esto muestra de nuevo que el proceso nitrito oxidante es más sensible a la presencia de sulfuro que el proceso amonio oxidante.



**Figura 32.** Curvas de Monod de la nitrito oxidación a diferentes concentraciones iniciales de sulfuro: 0 (◆), 2.5 (□), 3.5 (▲) y 5.0 (●) mg S-HS/L. Las líneas sólidas (—) son las curvas del mejor ajuste de los datos experimentales usando la ecuación de Monod en el caso de los ensayos sin sulfuro y para los ensayos con adición de sulfuro.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

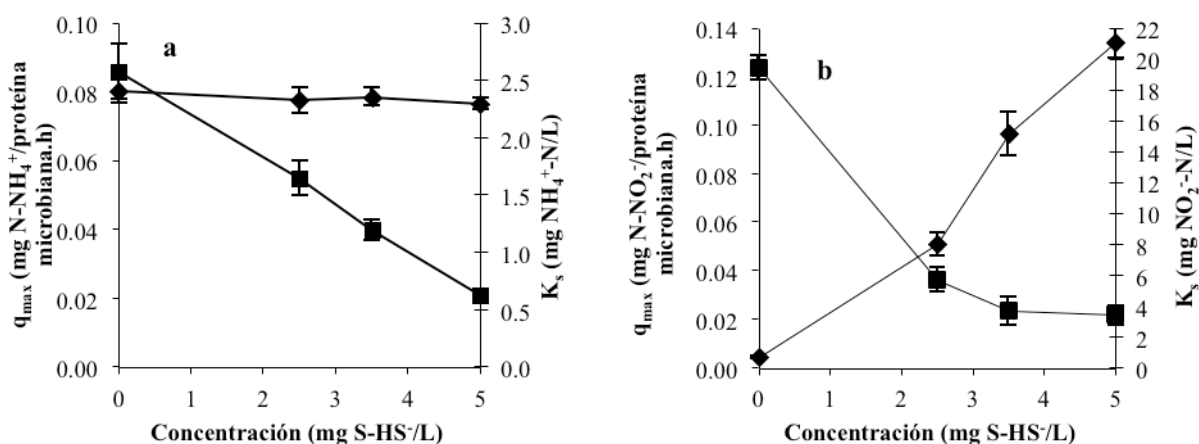
**Tabla 23.** Constantes cinéticas de Monod de los procesos amonio oxidante y nitrito oxidante. Valores con la misma letra, en la misma columna, significa que no hubo diferencia significativa entre ellos ( $p < 0.021$ ) y valores sin letra significa que existe una diferencia significativa entre ellos ( $p > 0.31$ ).

Amonio oxidación		
Concentración (mg S-HS <sup>-</sup> /L)	$K_{s,NH_4^+}$ (mg N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /L)	$q_{max,NH_4^+}$ (mg N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /mg proteína microbiana.h)
0	$2.41 \pm 0.11$ <sup>(a)</sup>	$0.086 \pm 0.008$
$2.5 \pm 0.5$	$2.33 \pm 0.11$ <sup>(a)</sup>	$0.055 \pm 0.005$
$3.5 \pm 0.5$	$2.36 \pm 0.08$ <sup>(a)</sup>	$0.040 \pm 0.003$
$5.0 \pm 0.5$	$2.30 \pm 0.05$ <sup>(a)</sup>	$0.021 \pm 0.002$

Nitrito oxidación		
Concentración (mg S-HS <sup>-</sup> /L)	$K_{s,NO_2^-}$ (mg N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /L)	$q_{max,NO_2^-}$ (mg N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /mg proteína microbiana.h)
0	$0.74 \pm 0.03$	$0.124 \pm 0.001$
$2.5 \pm 0.5$	$8.05 \pm 0.73$	$0.037 \pm 0.005$
$3.5 \pm 0.5$	$15.21 \pm 1.40$	$0.024 \pm 0.006$ <sup>(b)</sup>
$5.0 \pm 0.5$	$21.15 \pm 1.10$	$0.022 \pm 0.004$ <sup>(b)</sup>

Las variaciones en las constantes cinéticas aparentes se ilustran en la Figura 33.



**Figura 33.** Variación de las constantes cinéticas:  $K_s$  (◆) y  $q_{max}$  (■) de la amonio oxidación (a) y nitrito oxidación (b) a diferentes concentraciones iniciales de sulfuro (0, 2.5, 3.5 y 5.0 mg S-HS<sup>-</sup>/L).

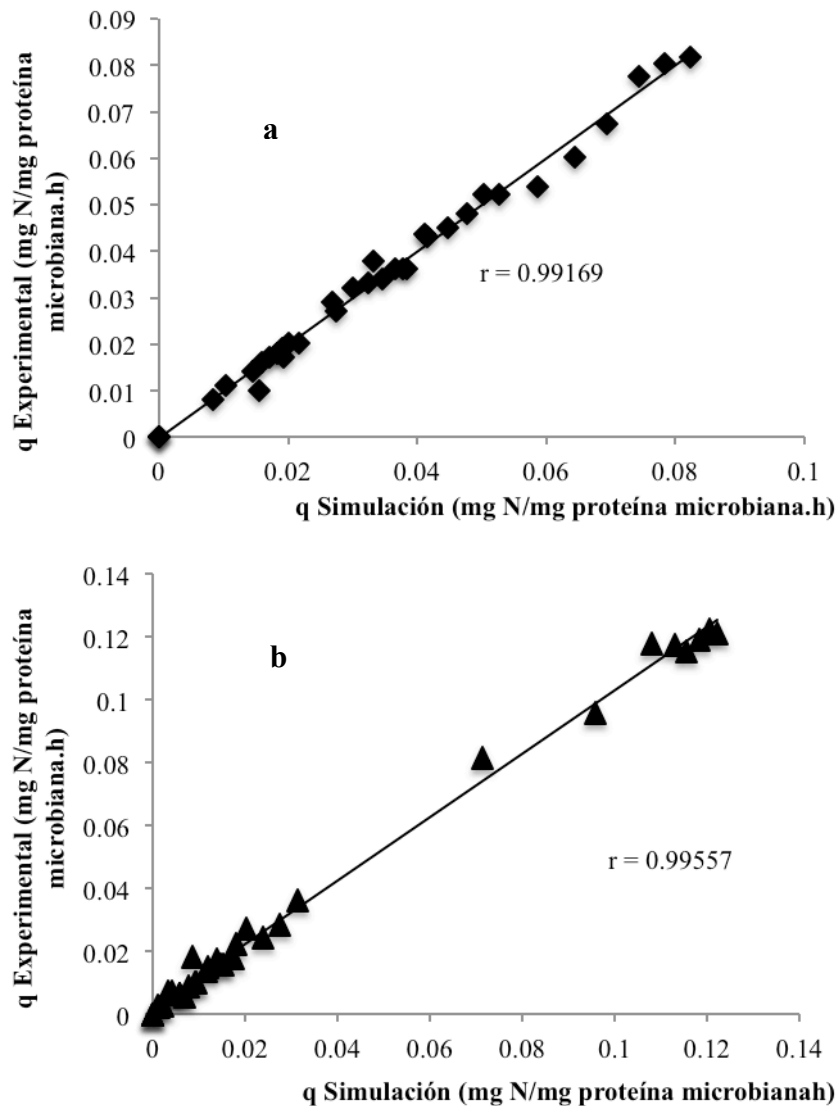
Dentro del mismo intervalo de concentración de sulfuro,  $K_{sNH_4^+}$  se mantuvo constante mientras que  $K_{sNO_2^-}$  aumentó significativamente. En ambas rutas, la velocidad específica máxima fue disminuyendo con la concentración en sulfuro, siendo la nitrito oxidación más inhibida que la amonio oxidación. Estos resultados aportan evidencias de que el sulfuro afectó de diferente manera a los procesos amonio y nitrito oxidantes, modificando diferentemente las constantes cinéticas características de cada ruta. Los resultados indicaron que la inhibición sobre la amonio oxidación fue de tipo no-competitiva (Ecuación 53) ya que la  $q_{maxNH_4^+}$  se vio significativamente disminuida y la  $K_{sNH_4^+}$  se mantuvo constante mientras que la inhibición sobre la nitrito oxidación mostró un comportamiento de tipo mixta (Ecuación 54) ya que  $q_{maxNO_2^-}$  disminuyó y  $K_{sNO_2^-}$  aumentó. El modelo de Monod se ajustó adecuadamente a los datos experimentales para la amonio oxidación ( $R^2 > 0.981$ ) (Figura 31). De igual manera, el modelo de Monod se ajustó adecuadamente a los datos experimentales de la nitrito oxidación ( $R^2 > 0.978$ ) (Figura 32). La Figura 34 muestra la correlación de los datos experimentales con los datos obtenidos por el modelo de inhibición para la amonio oxidación como para la nitrito oxidación, mostrando un buen coeficiente de correlación ( $r > 0.99$ ) en ambos procesos.

$$q_{NH_4^+} = \frac{\left( \frac{q_{maxNH_4^+}}{1 + \frac{I}{K_{i,NH_4^+}}} \right) C_{NH_4^+}}{Ks_{NH_4^+} + C_{NH_4^+}} \quad (53)$$

$$q_{NO_2^-} = \frac{\left( \frac{q_{maxNO_2^-}}{1 + \frac{I}{K_{i,NO_2^-}}} \right) C_{NO_2^-}}{\left( Ks_{NO_2^-} \left( 1 + \frac{I}{K'_{i,NO_2^-}} \right) \right) + C_{NO_2^-}} \quad (54)$$

Donde: I es la concentración de sulfuro (mg S/L),  $K_i$  es la constante de inhibición no-competitiva (mg S/L) y  $K'_i$  es la constante de inhibición competitiva (mg S/L).





**Figura 34.** Correlación lineal de los datos experimentales con respecto a los datos ajustados por el modelo para la amonio (a) y nitrito (b) oxidación.

Se determinaron las constantes de inhibición con la ayuda de un software (Sigma Plot 10), obteniéndose una  $K_{i,NH_4^+}$  de  $2.54 \pm 0.12$  mg S/L, una  $K_{i,NO_2^-}$  de  $1.03 \pm 0.06$  mg S/L y una  $K'_{i,NO_2^-}$  de  $0.22 \pm 0.03$  mg S/L. Estos resultados confirman que el sulfuro ejerció un mayor efecto inhibitorio sobre la nitrito oxidación que sobre la amonio oxidación, pero también que el efecto del sulfuro sobre la nitrito oxidación fue más del tipo competitivo que del tipo no-competitivo ( $K'_{i,NO_2^-} < K_{i,NO_2^-}$ ).

Si se comparan los valores de  $K_i$  de sulfuro obtenidos en el presente estudio con los reportados en la literatura para la inhibición de la nitrificación por otros compuestos, el sulfuro puede ser considerado como un fuerte inhibidor de la nitrificación.

Por ejemplo, el valor de  $K_i$  para la inhibición de la amonio oxidación por anilina fue

reportado de 3.3 mg/L (*Khin y col., 2002*). *Park y Bae (2009)* reportaron una  $K_i$  de 0.8 mg/L para la inhibición de la nitrato oxidación por  $\text{NH}_3$  y una  $K_i$  de 0.08-0.3 mg/L para la inhibición de la nitrato oxidación por ácido nitroso. Los mismos autores reportaron una  $K_i$  de 4.9-27.2 mg/L para la inhibición de la amonio oxidación por  $\text{NH}_3$  y una  $K_i$  de 0.6 mg/L para la inhibición de la amonio oxidación por ácido nitroso.

*Noophan y col. (2004)* realizaron experimentos en lote para evaluar el efecto de la hidroxilamina (intermediario de la ruta amonio oxidante) sobre la nitrato oxidación y observaron que en un intervalo de concentraciones de 0.35-5.5 mg N/L, la hidroxilamina inhibió por completo el proceso. También determinaron una constante de inhibición ( $K_i$ ) de 0.277 mg/L de hidroxilamina.

Varios compuestos han sido reportados como inhibidores específicos de cada proceso oxidativo de la nitrificación, como por ejemplo, la cianida es un inhibidor conocido del proceso amonio oxidante. *Kim y col. (2008)* han reportado que a una concentración de 0.2 mg/L, la cianida inhibió por completo la oxidación de amonio. La alitiourea es otro inhibidor específico de la amonio oxidación, la cual detuvo el proceso a una concentración de 10.14 mg/L (*Ginestet y col., 1998*).

La azida es un compuesto inhibitorio específico de la nitrato oxidación, la cual a una concentración de 16.3  $\mu\text{g N}_3^-/\text{L}$  detuvo por completo la oxidación de nitrato a nitrato (*López-Fiuza y col., 2002*). Por otro lado, el clorato ha sido también reportado como un inhibidor específico de la nitrato oxidación, el cual a una concentración de 0.25 mg/L detuvo el proceso por completo (*Belser y Mays, 1980*).

El sulfuro no está reportado como inhibidor específico de la nitrificación y de acuerdo a los resultados del presente estudio, las concentraciones a las cuales el sulfuro provoca inhibición son mayores que las de los inhibidores específicos reportados, sin embargo puede ser considerado como un fuerte inhibidor de la amonio y nitrato oxidación por los valores bajos de  $K_i$  obtenidos.

En este trabajo, se descartó que el efecto del sulfuro sobre la nitrificación fuera debido a otras variables, tales como el valor de pH, la concentración de oxígeno, o la concentración de sulfato formado por la oxidación química del sulfuro. Los resultados podrían sugerir que el sulfuro inhibe la nitrificación a nivel enzimático, ya que los datos experimentales tuvieron un buen ajuste con los modelos de inhibición enzimática. Una posible explicación de la inhibición por el sulfuro es la disminución de la disponibilidad de metales divalentes del medio con los cuales puede precipitar, pudiendo ser éstos cofactores de las enzimas

nitrificantes. Sin embargo, *Sears y col. (2004)* realizaron ensayos con un exceso de cofactores disueltos en el medio, como el cobre y el hierro entre otros, en presencia de sulfuro, y observaron que aún en exceso de estos cofactores, el efecto inhibitorio del sulfuro permaneció. En estudios realizados con CS<sub>2</sub>, se reportó en base a sus características químicas que podría reaccionar con los aminoácidos terminales de la enzima AMO y de esta forma afectar su actividad (*Hyman y col., 1990; Singh y Verma, 2007*). No hay información suficiente del efecto del sulfuro o de algunos otros compuestos azufrados sobre la enzima NOR en cultivos axénicos de bacterias nitrito oxidantes.

Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que el sulfuro afecte los procesos amonio y nitrito oxidantes a otro nivel, como el transporte de sustrato a través de la membrana celular de estas bacterias. Se ha reportado que el transporte de amonio a bajas concentraciones se realiza a través de canales iónicos y no por proteínas transportadoras (*Martinelle y col., 1996*). Mientras que para el nitrito se ha reportado que existen diversos mecanismos de transporte a través de la membrana celular, uno de ellos es mediante proteínas transportadoras (*Moir y Wood, 2001*). Quizá por eso se afecta mayormente el proceso nitrito oxidante ya que el sulfuro puede estar afectando a estas proteínas y a su vez a la enzima NOR. Sin embargo, está claro que para entender mejor los mecanismos de inhibición involucrados, sería necesario hacer una evaluación más específica del efecto del sulfuro con cultivos axénicos, extractos celulares y/o enzimas purificadas.

Una contribución relevante del presente trabajo es haber evidenciado y caracterizado con constantes cinéticas el efecto inhibitorio del sulfuro sobre ambos procesos oxidativos de la nitrificación: la amonio oxidación y la nitrito oxidación. Se evidenció que el proceso nitrito oxidante fue el más afectado por la presencia del sulfuro con respecto al proceso amonio oxidante. Por lo tanto, es importante controlar la concentración de sulfuro en reactores biológicos para evitar la acumulación de nitrito ya que se ha reportado que a altas concentraciones de nitrito, éste puede inhibir la nitrito oxidación y por lo tanto detener la formación de nitrato (*Silva y col., 2011*). Esto podría evitarse mediante la alimentación de sulfuro a bajas concentraciones o aumentar el tiempo de residencia hidráulico en reactores o plantas de tratamiento de aguas residuales. Aunque si lo que se desea hacer es un acoplamiento de la nitrificación y desnitrificación a partir de nitrito, como los procesos ya conocidos como: CANON, OLAND y SHARON, la adición de sulfuro podría ser una buena estrategia para obtener mayoritariamente nitrito de la oxidación de amonio (*Peng y Zhu, 2006; Erguder y col., 2008*).

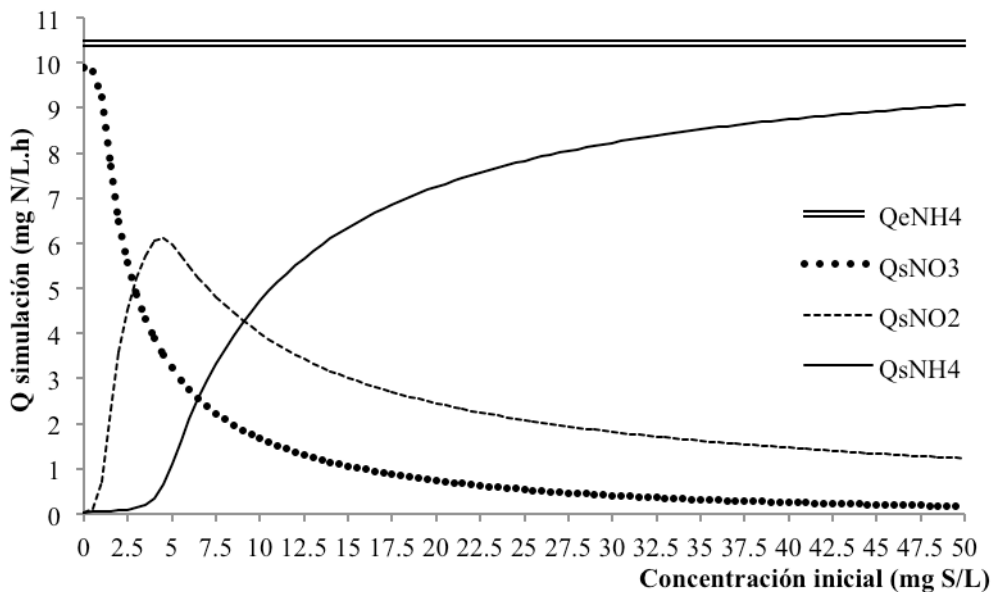
### VI.2.7 Simulación del comportamiento de un lodo nitrificante en un reactor en continuo alimentado con amonio y sulfuro

El modelo de inhibición y las constantes cinéticas fueron usados para predecir el efecto de la adición de sulfuro en un reactor en continuo sobre el comportamiento de un lodo nitrificante nunca antes expuesto a sulfuro. Se consideró un reactor nitrificante en continuo de tanque agitado de 6 L en estado estacionario tal como el reactor usado como fuente de inóculo en el presente trabajo y se utilizaron las mismas condiciones experimentales descritas en el apartado de materiales y métodos. El programa Solver (Excel 2011) fue utilizado para obtener las velocidades volumétricas (Ecuación 55) de salida de amonio, nitrito y nitrato simuladas (Figura 35).

$$Q = q \cdot X \quad (55)$$

Donde:  $Q$  es la velocidad volumétrica de consumo de sustrato o formación de producto (mg N/L.h),  $q$  es la velocidad específica de consumo de sustrato o formación de producto (mg N/mg de biomasa.h) y  $X$  es la concentración celular (mg/L).

En la ecuación 55, se sustituyeron las ecuaciones 53 y 54 en el valor de  $q$  para la amonio oxidación y nitrito oxidación, respectivamente.



**Figura 35.** Simulación de la nitrificación en un reactor en continuo alimentado con amonio y sulfuro.  $Q_e$ : velocidad volumétrica de entrada,  $Q_s$ : velocidad volumétrica de salida.

Se consideró que la velocidad volumétrica de entrada de amonio se mantuvo constante y que a cada concentración de sulfuro, el reactor alcanzó el régimen estacionario. La simulación muestra (Figura 35) que la nitrato oxidación fue primeramente inhibida, afectada a bajas concentraciones de sulfuro, obteniendo que hasta 5 mg S/L, la eficiencia de eliminación de amonio fue mayor que 89 %, mientras que el nitrito fue acumulándose y la formación de nitrato fue disminuyendo. A concentraciones de sulfuro mayores que 5 mg S/L, el amonio residual también fue acumulándose, mientras que el nitrito y nitrato fueron los productos de la amonio oxidación, mostrando que ambos procesos amonio y nitrito oxidantes fueron afectados. De acuerdo a la simulación, la concentración máxima de sulfuro que puede tolerar el lodo nitrificante en el reactor en continuo es de 1 mg S/L, manteniendo la eficiencia de consumo de amonio de 100 %, el rendimiento de formación de nitrato mayor que 0.89 g N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/g N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> consumido y el rendimiento de producción de nitrito menor que 0.07 g N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/g N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> consumido.

REACTOR DE LOTES  
SECUENCIADOS

---

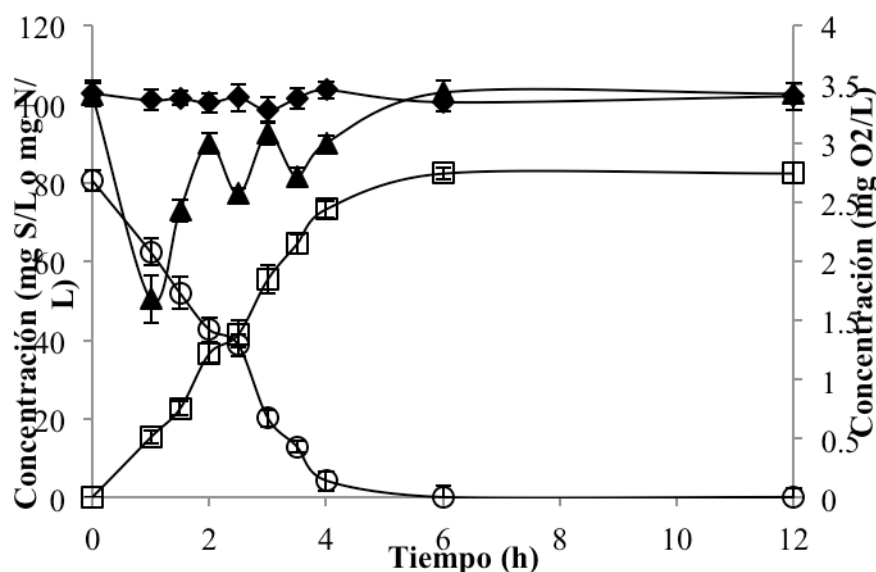
---

### VI.3 Reactor SBR

Se prosiguió a evaluar la nitrificación y la oxidación de sulfuro en un reactor de lotes secuenciados (reactor SBR por sus siglas en inglés, Sequencing Batch Reactor) alimentado con amonio y sulfuro. Se escogió este tipo de reactor ya que se ha reportado que puede ser una alternativa para tratar efluentes contaminados con amonio y compuestos inhibitorios (Mace y Mata-Alvarez, 2002). Se ha observado que a través de los ciclos de operación de este tipo de reactor, la inhibición de la nitrificación puede verse disminuida a través de una adaptación metabólica del lodo (Texier y Gomez, 2007). Esto podría permitir alimentar el reactor con una mayor concentración de sulfuro que en un reactor en continuo sin que se vea afectada la nitrificación. Por lo tanto, es de interés evaluar el comportamiento fisiológico y cinético de la biomasa nitrificante cuando está expuesta de manera repetitiva a sulfuro en un reactor SBR.

#### VI.3.1 Pruebas abióticas en el reactor SBR

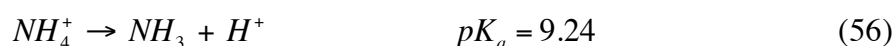
Con la finalidad de evaluar la oxidación química del sulfuro bajo las condiciones experimentales utilizadas en el SBR, se realizaron pruebas sin biomasa y se establecieron las cinéticas de oxidación del sulfuro. De manera simultánea, se dio seguimiento a la concentración de amonio y OD (Figura 36).



**Figura 36.** Perfiles de oxidación de sulfuro (○), amonio (◆) y producción de sulfato (□) en ensayos abióticos y perfil de oxígeno disuelto (▲) en el SBR.

Después de 6 h, todo el sulfuro fue oxidado, teniendo como producto principal el sulfato. No se registró la formación de tiosulfato durante este periodo de tiempo. La velocidad de oxidación del sulfuro fue de  $19.3 \pm 2.5$  mg S-HS<sup>-</sup>/L.h. De acuerdo a la ecuación de la oxidación del sulfuro hasta sulfato (Ecuación 50), la relación estequiométrica de HS<sup>-</sup>/O<sub>2</sub> es de 0.5. Al inicio del ciclo de operación del reactor, se tuvo 80 mg S-HS<sup>-</sup>/L (0.0048 mol de HS<sup>-</sup>) y 3.5 mg O<sub>2</sub>/L (0.02 mol O<sub>2</sub>), dando una relación HS<sup>-</sup>/O<sub>2</sub> de 0.24 por lo cual podemos decir que hubo un exceso de oxígeno, lo cual pudo favorecer la oxidación del sulfuro hasta sulfato. Esto nos indica que en reactores aireados se puede dar también la oxidación química del sulfuro presente en el influente, como se observó previamente en los ensayos en lote. Esto podría dejar pensar que las concentraciones en sulfuro en reactores nitrificantes irían disminuyendo rápidamente por oxidación química y que los efectos del sulfuro sobre la nitrificación podrían ser menores. Sin embargo, en el estudio previo en lote, se llegó a la conclusión de que aún en presencia de oxidación química del sulfuro que reduce la concentración del inhibidor y el tiempo de exposición de la biomasa nitrificante al sulfuro, el efecto inhibitorio del sulfuro sobre el proceso nitrificante puede ser significativo. Por lo tanto, es necesario evaluar la nitrificación en el reactor SBR alimentado con sulfuro a diferentes concentraciones para cuantificar el efecto inhibitorio del sulfuro a través de los ciclos de operación.

Respecto a la concentración de amonio, ésta se mantuvo constante a un valor de  $102.6 \pm 3.1$  mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L (Figura 36). Este resultado nos permite concluir que no hubo pérdida de amonio por reacción química con los componentes del medio, adsorción en la unidad experimental o volatilización en forma de NH<sub>3</sub> bajo las condiciones experimentales utilizadas. En particular, cabe mencionar que el valor de pH del medio de cultivo fue de  $7.6 \pm 0.3$  mientras que el valor de pK<sub>a</sub> del par amonio/amoniaco es de 9.24 (Ecuación 56) (Harris, 2003).

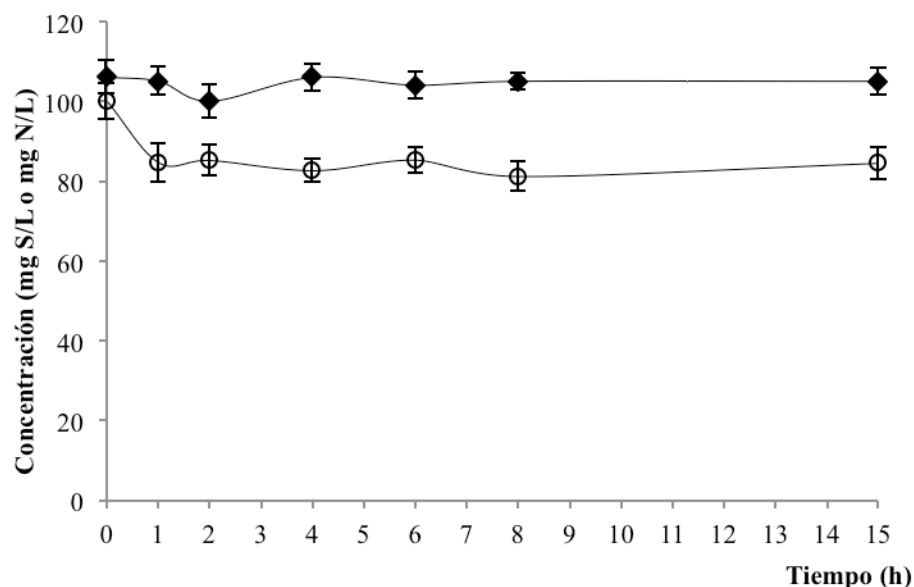


Por otro lado, la concentración de OD en el reactor se mantuvo en un intervalo de 1.5 a 3.5 mg/L. Se observó la disminución en la concentración de OD en paralelo a la oxidación del sulfuro a sulfato, sin embargo gracias a la aireación continua del reactor se alcanzó de nuevo una concentración de OD de 3.5 mg/L.



### VI.3.2 Ensayos cinéticos con biomasa estéril en el SBR

Posteriormente, se dio seguimiento a las concentraciones en amonio y sulfuro en el reactor alimentado con medio mineral e inoculado con biomasa estéril, en ausencia de oxígeno y a un valor de pH de  $7.9 \pm 0.3$  (Figura 37).



**Figura 37.** Perfiles de concentración de sulfuro (●) y amonio (◆) en ausencia de oxígeno en el SBR con biomasa estéril.

Durante la primera hora de ensayo, se observó una disminución del 17 % en la concentración inicial de sulfuro. Esto se puede explicar debido a que una parte del sulfuro disuelto ( $\text{HS}^-$ ) pasó a su estado gaseoso ( $\text{H}_2\text{S}$  no ionizada), cuando se alcanzó el equilibrio químico (Ecuaciones 51 y 52). De acuerdo a la ecuación de Henderson-Hasselbalch (Ecuación 9) y al valor de pH de  $7.9 \pm 0.3$ , se estimó que el 20 % del sulfuro se encontraría en forma de  $\text{H}_2\text{S}$ . Después de una hora, la concentración de sulfuro disuelto se mantuvo constante a un valor de  $82.4 \pm 3.2$  mg S/L.

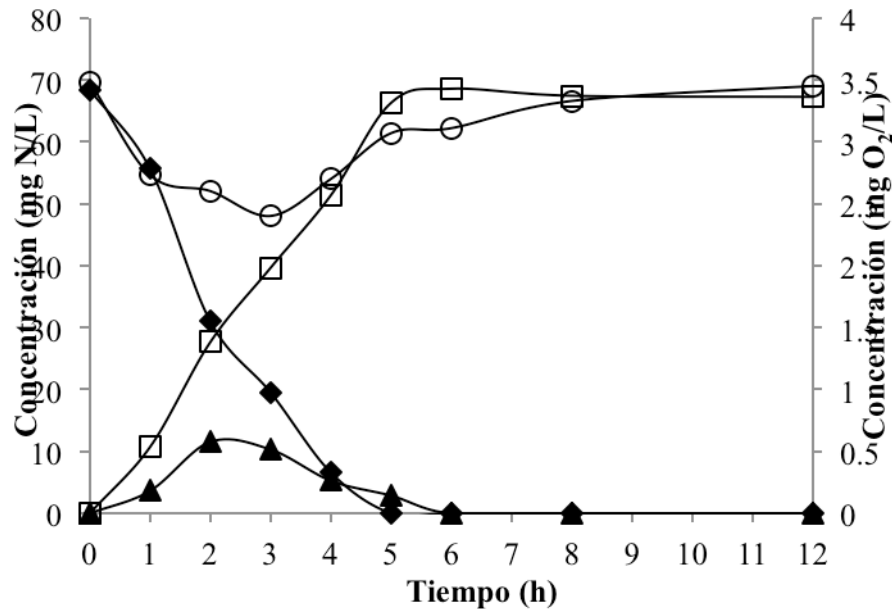
La concentración de amonio se mantuvo constante a un valor promedio de  $102.0 \pm 3.5$  mg N- $\text{NH}_4^+$ /L durante todo el periodo del ensayo.

No se presentó la formación de ningún producto azufrado o nitrogenado. Con base en los resultados obtenidos, se consideró que la adsorción de sulfuro y amonio sobre la biomasa y/o el sistema no fue significativa.

### VI.3.3 Cinética nitrificante en el SBR

Se llevó a cabo una cinética nitrificante control sin sulfuro utilizando biomasa proveniente del reactor en continuo en régimen estacionario. El objetivo fue establecer las cinéticas del proceso respiratorio nitrificante y dar seguimiento al oxígeno disuelto, además de calcular las variables de respuesta: eficiencia, rendimientos, velocidades específicas de consumo de amonio y producción de nitrato.

Como se puede observar en la Figura 38, el amonio fue consumido en su totalidad, teniendo como producto principal nitrato. Se presentó la formación transitoria de nitrito, mismo que desapareció después de 8 h. De acuerdo con lo anterior se calcularon las variables de respuesta al final del ciclo (12 h) (Tabla 24).



**Figura 38.** Perfiles de oxidación de amonio (◆), formación de nitrito (▲) y nitrato (□) y concentración de oxígeno disuelto (○) en el SBR nitrificante.

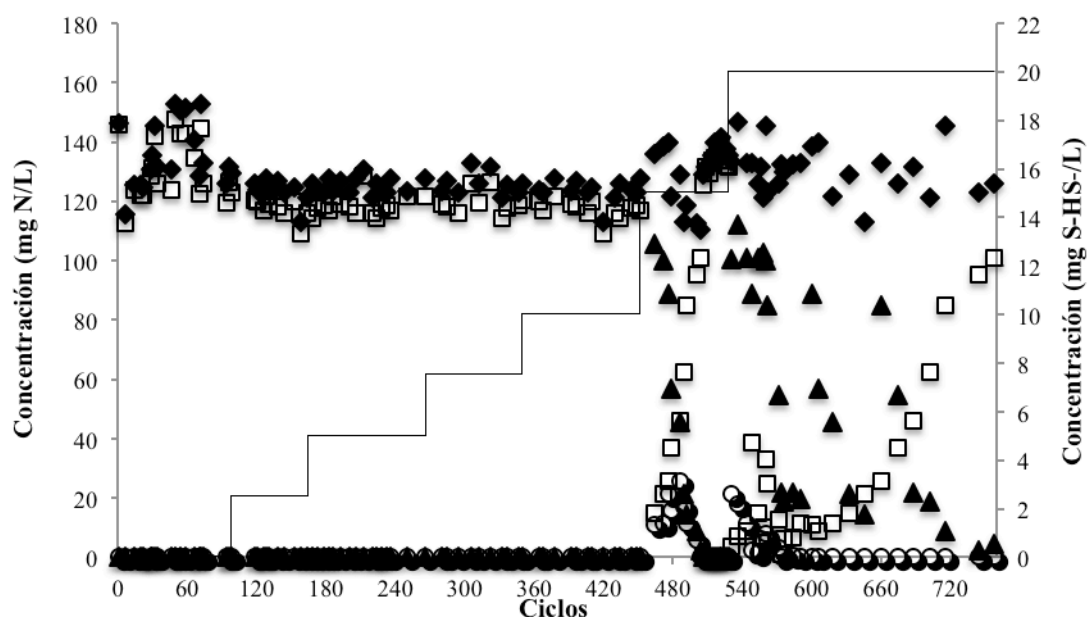
**Tabla 24.** Variables de respuesta del proceso respiratorio nitrificante en ausencia de sulfuro en el SBR.

Variables	Promedio
$E_{\text{NH}_4^+}$ (%)	$100.0 \pm 3.1$
$Y_{\text{NO}_3^-}$ (mg N- $\text{NO}_3^-$ /mg N- $\text{NH}_4^+$ consumido)	$0.99 \pm 0.06$
$Y_{\text{NO}_2^-}$ (mg N- $\text{NO}_2^-$ /mg N- $\text{NH}_4^+$ consumido)	0
$q_{\text{NH}_4^+}$ (mg N- $\text{NH}_4^+$ /mg proteína microbiana.h)	$0.096 \pm 0.010$
$q_{\text{NO}_3^-}$ (mg N- $\text{NO}_3^-$ /mg proteína microbiana.h)	$0.089 \pm 0.010$

Después de 12 h, 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 el reactor SBR fueron adecuadas para llevar a cabo el proceso respiratorio nitrificante con altos valores de eficiencia y rendimiento de formación de nitrato. En particular, se puede concluir que bajo estas condiciones experimentales no existió limitación de oxígeno y la nitrificación se realizó satisfactoriamente.

### VI.3.4 Efecto del sulfuro sobre el proceso nitrificante en el reactor SBR

En la Figura 39, se muestra el perfil de las concentraciones de los compuestos nitrogenados en el influente y efluente al final de cada periodo de reacción del SBR a través de los ciclos de operación (volumen de operación de 2 L, ciclos de 12 horas, temperatura de  $30 \pm 3^\circ\text{C}$ , velocidad de agitación de 200 rpm, pH  $7.6 \pm 0.3$ , concentración de oxígeno de  $3.5 \pm 0.2$  mg  $\text{O}_2$ /L y concentración celular de  $385 \pm 41$  mg proteína microbiana/L) sobre un periodo de más de un año. La Tabla 25 presenta los datos de eficiencia y rendimientos.



**Figura 39.** Perfiles de la nitrificación con respecto al número de ciclos de operación del SBR alimentado con sulfuro a 0, 2.5, 5.0, 7.5, 10, 15 y 20 mg S/L (–): amonio entrante (◆), amonio residual (○), nitrito (▲) y nitrato (□).

**Tabla 25.** Eficiencia y rendimientos del proceso nitrificante en el SBR. Los valores indicados corresponden a los promedios de todos los valores obtenidos en cada periodo de evaluación a una concentración de sulfuro ensayada.

Ciclos	Concentración (mg S-HS <sup>-</sup> /L)	E <sub>NH4+</sub> (%)	Y <sub>NO2-</sub>	Y <sub>NO3-</sub>
			(mg N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /mg N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> consumido)	(mg N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /mg N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> consumido)
1 – 98	0	100.0 ± 5.7	0.00 ± 0.00	0.96 ± 0.02
99 – 158	2.5	100.0 ± 3.5	0.00 ± 0.00	0.95 ± 0.01
159 – 266	5.0	100.0 ± 6.3	0.00 ± 0.00	0.95 ± 0.03
267 – 350	7.5	100.0 ± 2.9	0.00 ± 0.00	0.95 ± 0.01
351 – 452	10.0	100.0 ± 4.1	0.00 ± 0.00	0.95 ± 0.02
453 – 528	15.0	95.1 ± 6.7	0.20 ± 0.31	0.75 ± 0.32
529 – 758	20.0	97.6 ± 4.2	0.44 ± 0.31	0.21 ± 0.22

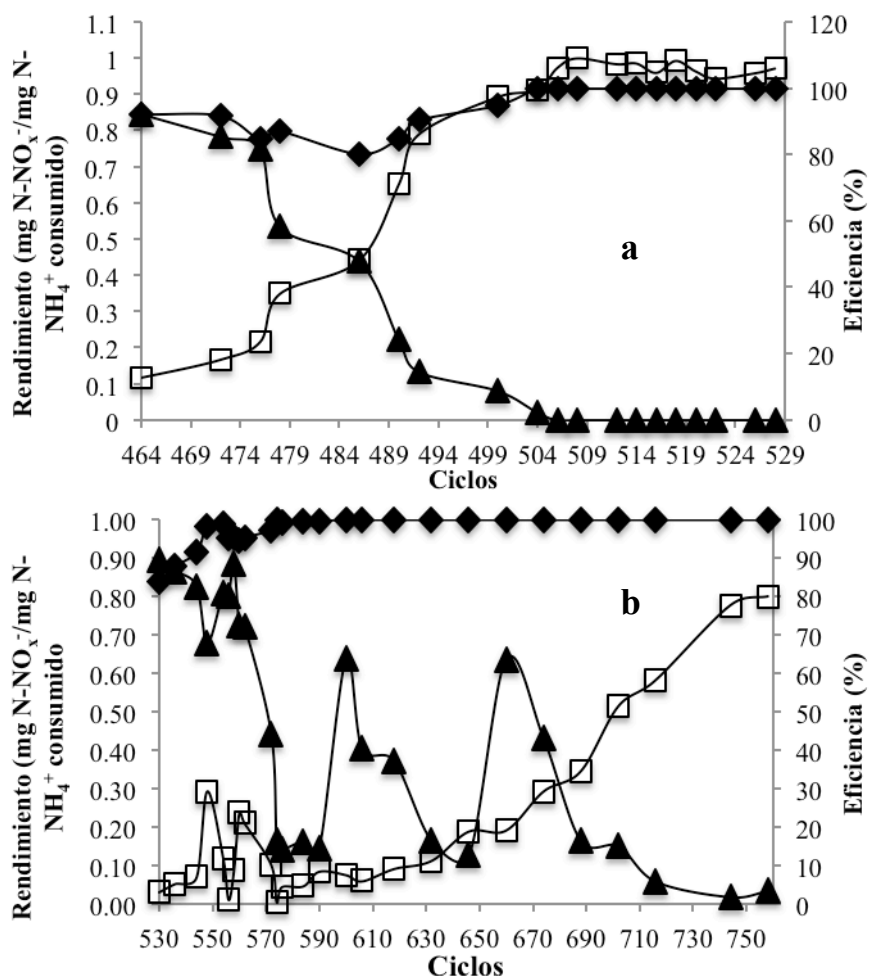
Estos resultados muestran que, hasta 10 mg S/L (20 mg S/L.d), la actividad nitrificante del lodo en el reactor se encontró estable con altos valores de eficiencia y rendimiento de formación de nitrate. Esto se obtuvo con una concentración celular de  $385 \pm 41$  mg proteína microbiana/L en el SBR. De acuerdo con la simulación realizada previamente en un reactor en continuo de 6 L y una concentración celular de  $550 \pm 50$  mg proteína microbiana/L alimentado con una carga en amonio ( $249.7 \pm 14.3$  mg N/L.d) similar a la del SBR ( $270 \pm 10$

mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L.d), la concentración máxima de sulfuro que se podría alimentar al reactor en continuo sin verse afectada la nitrificación (eficiencia y rendimiento de nitrato altos) sería solamente de 1 mg S/L (10 mg S/L.d). Está claro que en términos de comparación, sería necesario realizar un estudio también en el reactor en continuo alimentándolo con amonio y sulfuro en forma continua y tener una evaluación de la nitrificación a través de los días de operación. Sin embargo, los resultados parecen indicar que el lodo nitrificante toleraría una mayor concentración de sulfuro en el SBR que en el reactor en continuo. En estudios anteriores en reactores de lotes secuenciados en donde un lodo nitrificante fue expuesto a diferentes compuestos inhibitorios, se observó que al pasar los ciclos de operación el lodo nitrificante fue más tolerante a estos compuestos (disminución de la inhibición), permitiendo alcanzar concentraciones mayores de exposición (*Téllez-Pérez y col., 2013; Zepeda y col., 2013; Silva y col., 2014*).

A concentraciones mayores en sulfuro de 15 y 20 mg S/L, la mayoría del amonio entrante fue consumido, sin embargo se observó una acumulación de nitrito, y en consecuencia una disminución en el rendimiento de formación de nitrato de 22 y 78 %, respectivamente. Estos resultados coinciden con los resultados obtenidos en el estudio previo en cultivos en lote donde se evidenció que el proceso nitrito oxidante es más sensible a la presencia de sulfuro que el proceso amonio oxidante, registrándose una acumulación de nitrito en el sistema.

Es importante recalcar que los valores de eficiencia y rendimientos de la Tabla 25 representan el promedio de todos los datos de cada periodo de evaluación a una concentración definida de sulfuro. Sin embargo, es interesante observar en la Figura 39 para los periodos de evaluación a 15 mg S/L (ciclos de 453 a 528) y a 20 mg S/L (ciclos de 529 a 758) que la acumulación de nitrito en el reactor va disminuyendo y la producción de nitrato aumentando a través de los ciclos. Al inicio de estos mismos periodos de evaluación, se observó también una acumulación de amonio, la cual fue disminuyendo a lo largo de los ciclos de operación.

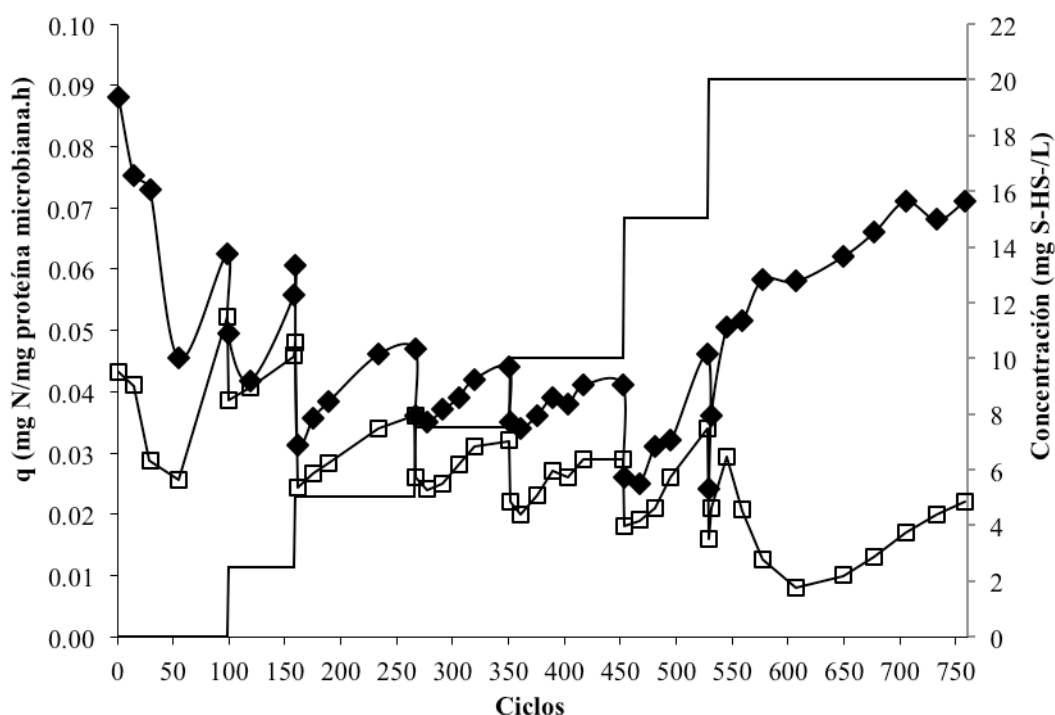
En la Figura 40, se muestran los rendimientos de formación de nitrito y nitrato, así como también la eficiencia de consumo de amonio durante las etapas de alimentación de sulfuro a 15 mg S-HS<sup>-</sup>/L (a) y 20 mg S-HS<sup>-</sup>/L (b).



**Figura 40.** Perfiles de eficiencia de consumo de amonio (◆) y rendimientos de formación de nitrito (▲) y nitrato (□) a través de los ciclos de operación en las etapas de adición de 15 (a) y 20 (b) mg S-HS/L.

Como se puede observar a través de los ciclos de operación del reactor SBR a 15 y 20 mg S/L, el valor de la eficiencia se mantuvo por arriba de 80.3 % mientras que el rendimiento de nitrito fue disminuyendo y el rendimiento de nitrato aumentando. Estos resultados indican que el lodo recuperó su actividad nitrificante a pesar de la alimentación del reactor con sulfuro de hasta 20 mg S/L (equivalente a 40 mg S/L.d), obteniendo en el último ciclo una eficiencia de consumo de amonio del 100 % y un rendimiento de formación de nitrato de aproximadamente 0.8. Esto es evidencia de que bajo un sistema de operación de lotes secuenciados, la biomasa nitrificante mejoró su capacidad metabólica para oxidar el amonio a nitrato a través de los ciclos de operación, lo cual sugiere que el uso de lodos nitrificantes en reactores SBR puede ser una buena alternativa para tratar efluentes con amonio y compuestos inhibitorios como el sulfuro.

En la Figura 41, se muestra el perfil de las velocidades específicas conforme fueron avanzando los ciclos de operación del reactor. Es importante hacer notar que, a través de purgas regulares del reactor, se mantuvo constante la concentración celular en el SBR a un valor promedio de  $385 \pm 41$  mg proteína microbiana/L en todo el periodo de evaluación con sulfuro. Por lo tanto, se pueden asociar los cambios en las velocidades específicas a cambios cinéticos y no relacionados con la concentración en biomasa. Sin embargo, en el reactor control del ciclo 1 al ciclo 98, no se controló la concentración en biomasa, la cual fue en aumento y contribuyó a una disminución de los valores de velocidades específicas a través de los ciclos en este periodo. Al purgar la biomasa al final de este periodo justo antes de añadir sulfuro por primera vez al reactor (ciclo 98), las velocidades aumentaron como consecuencia de la disminución en la concentración celular.

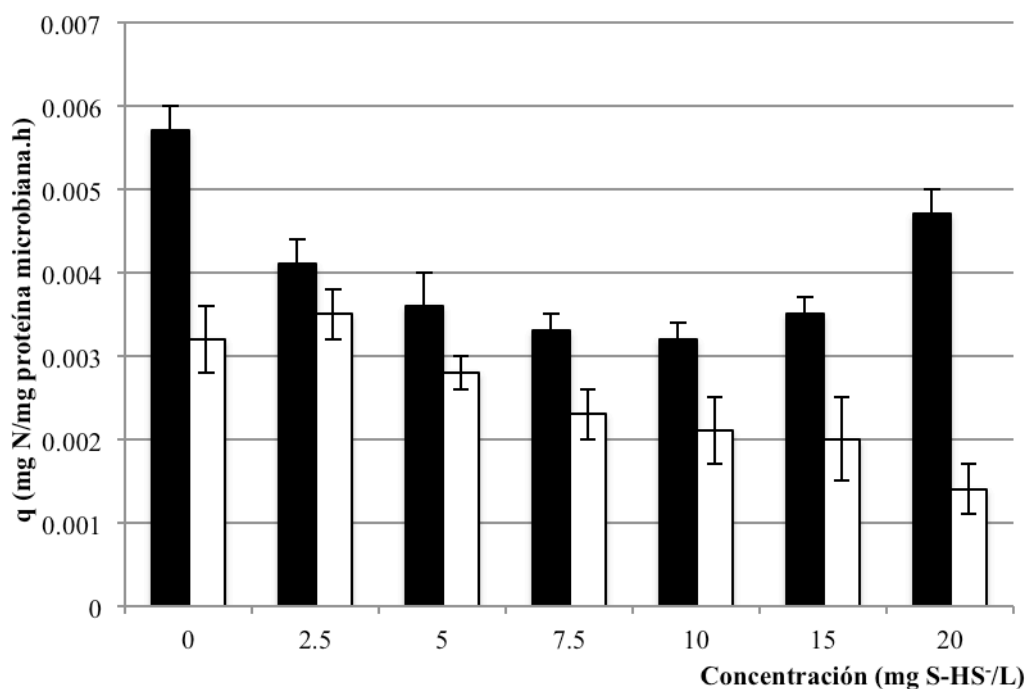


**Figura 41.** Velocidades específicas de consumo de amonio (◆) y formación de nitrato (□) con respecto al número de ciclos de operación del SBR alimentado con sulfuro a 0, 2.5, 5.0, 7.5, 10, 15 y 20 mg S/L (–).

Se observó que las velocidades específicas de consumo de amonio y formación de nitrato al comienzo de cada etapa de adición de una nueva concentración de sulfuro se vieron fuertemente disminuidas, confirmando el efecto inhibitorio del sulfuro sobre los procesos amonio y nitrito oxidantes. Sin embargo, al paso de los ciclos de operación, estas velocidades aumentaron de nuevo. Esta disminución del efecto inhibitorio del sulfuro sobre la nitrificación a través de los ciclos de operación mostró que el lodo presentó una adaptación metabólica en

el SBR permitiéndole oxidar el amonio a nitrato cada vez más rápido a pesar de la alimentación con sulfuro. Estos resultados muestran también que a pesar de que el lodo presentó una estabilidad fisiológica (valores constantes de eficiencia y rendimientos) a través de los ciclos hasta 10 mg S/L (ciclo 452) (Tabla 25), no presentó una estabilidad cinética (Figura 40). Estas variaciones en las velocidades pueden estar relacionadas con cambios en la composición microbiológica del lodo, la síntesis y/o cinética de enzimas nitrificantes o la velocidad de transporte de sustratos (Kjeldal y col., 2014; Lu y col., 2014; Silva y col., 2014). Es relevante seguir evaluando el comportamiento fisiológico y cinético de consorcios microbianos en reactores biológicos y tratar de relacionarlo con la dinámica poblacional y la expresión de los genes de las enzimas involucradas en el proceso.

En la Figura 42 y la Tabla 26, se presenta el valor promedio de las velocidades específicas de consumo de amonio y formación de nitrato en el reactor en cada una de las etapas de adición de sulfuro.



**Figura 42.** Promedio de velocidades específicas de consumo de amonio (■) y formación de nitrato (□) a diferentes concentraciones iniciales de sulfuro en el SBR.

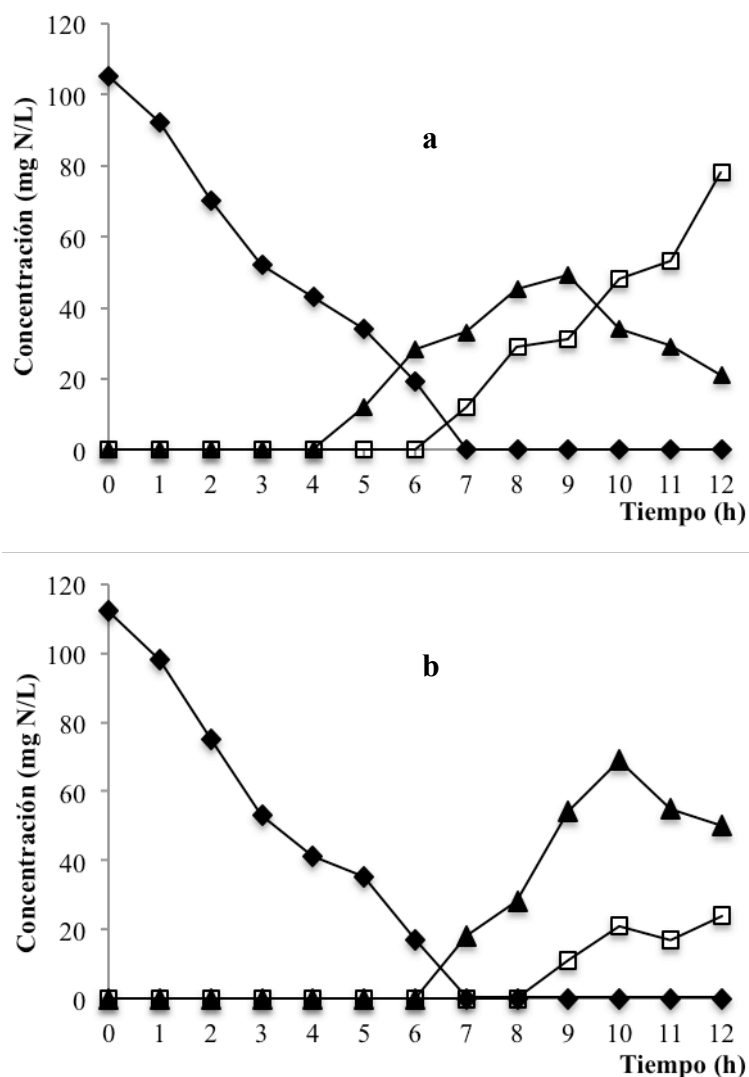


**Tabla 26.** Velocidades específicas de consumo de amonio y formación de nitrato en el SBR a través de los ciclos de operación a diferentes concentraciones iniciales de sulfuro (0, 2.5, 5.0, 7.5, 10, 15 y 20 mg S-HS<sup>-</sup>/L).

Ciclos	Concentración (mg S-HS <sup>-</sup> /L)	$q_{\text{NH}_4^+}$	$q_{\text{NO}_3^-}$
		(mg N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /mg proteína microbiana.h)	(mg N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /mg proteína microbiana.h)
1 – 98	0	0.0057 ± 0.0003	0.0032 ± 0.0004
99 – 158	2.5	0.0041 ± 0.0003	0.0035 ± 0.0003
157 – 266	5.0	0.0036 ± 0.0004	0.0028 ± 0.0002
267 – 350	7.5	0.0033 ± 0.0002	0.0023 ± 0.0003
351 – 452	10.0	0.0032 ± 0.0002	0.0021 ± 0.0004
453 – 528	15.0	0.0035 ± 0.0002	0.0020 ± 0.0005
529 – 758	20.0	0.0047 ± 0.0003	0.0014 ± 0.0003

A pesar de la disminución en la inhibición observada a través de los ciclos, en la mayoría de los casos, las velocidades de la nitrificación no alcanzaron los valores obtenidos al inicio en el reactor control sin adición de sulfuro (Figura 41). Esto es probablemente debido a que no se dejó un periodo suficientemente largo en cada etapa de adición de sulfuro a una concentración dada. Es destacable observar cómo la velocidad de consumo de amonio se vio disminuida al adicionar sulfuro a una concentración inicial creciente de hasta 10 mg S/L pero que ésta aumentó a 15 y 20 mg S/L (Figura 42). Al final del periodo de adición de 20 mg S/L, sólo se vio disminuida un 19 % (Tabla 26). Por otro lado, la velocidad de formación de nitrato se vio disminuida un 55 % a 20 mg S/L. Contrariamente a la tendencia de la  $q_{\text{NH}_4^+}$  en aumentar a lo largo de los ciclos a 15 y 20 mg S/L, la  $q_{\text{NO}_3^-}$  fue disminuyendo de manera regular a partir de 2.5 mg S/L de sulfuro. Esto indica que el lodo mostró una mejor adaptación metabólica amonio oxidante que nitrito oxidante. Estos resultados evidencian que el sulfuro, bajo las condiciones experimentales utilizadas en el SBR, siguió ejerciendo una inhibición en la nitrificación pero sugieren que es posible manejar unas condiciones de operación (mayor tiempo de residencia hidráulica, mayor suministro y control del oxígeno disuelto) que permitirían una mejor adaptación metabólica del lodo al inhibidor.

En la Figura 43, se presentan los perfiles cinéticos de consumo de amonio y formación de nitrito y nitrato durante las etapas de adición de sulfuro al reactor a 15 (ciclos 464–529) y 20 mg S/L (ciclos 530–750).



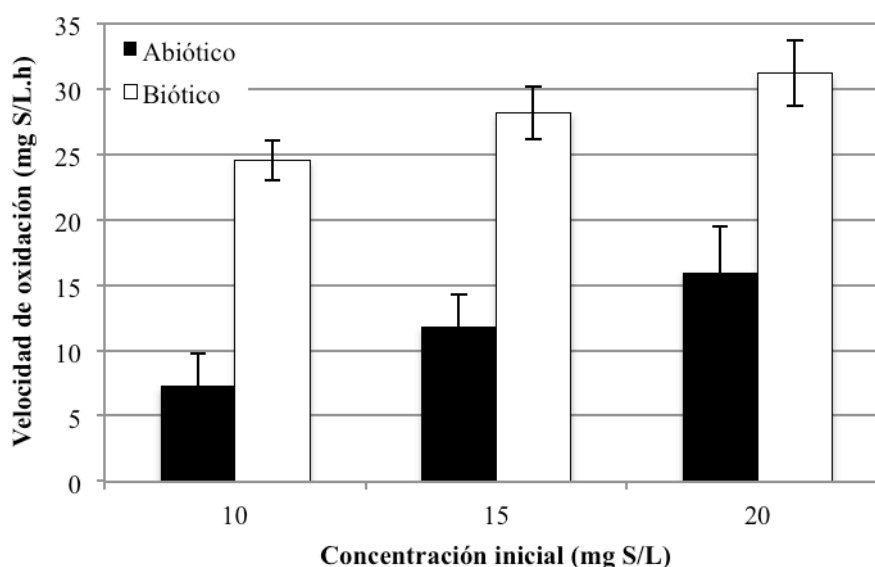
**Figura 43.** Cinéticas de consumo de amonio (◆) y formación de nitrito (▲) y nitrato (□) en las etapas de adición de sulfuro al reactor SBR a concentraciones de 15 mg S-HS<sup>-</sup>/L (ciclos 474) (a) y 20 mg S-HS<sup>-</sup>/L (ciclos 540) (b).

Aunque el amonio fue consumido en su totalidad durante las primeras 7 h, se registró una fase de retardo en la formación de nitrito de entre 4 y 6 h comparando con el cultivo control nitrificante en el SBR (Figura 38). La formación de nitrito y nitrato no correspondió al amonio total consumido y el balance de nitrógeno quedó incompleto durante la mayor parte de la cinética. Esto podría deberse a que el sulfuro también afectó la etapa de conversión de hidroxilamina a nitrito, inhibiendo la actividad de la enzima hidroxilamina oxidoreductasa (HAO) y provocando la acumulación de hidroxilamina en el cultivo. Estos primeros resultados son relevantes y es de gran interés hacer una investigación más profunda al respecto para comprobar el efecto del sulfuro a mayores concentraciones sobre la HAO.

En esta parte experimental, se evidenció que a pesar del efecto inhibitorio del sulfuro sobre el proceso nitrificante, se pueden mantener valores altos de eficiencia de consumo en amonio y rendimiento de formación de nitrato en el SBR al controlar el tiempo necesario de los ciclos de operación. Se han reportado previamente resultados parecidos en reactores SBR nitrificantes pero con otros compuestos inhibitorios, tales como el *p*-hidroxibenzaldehido (Téllez-Pérez y col., 2013), el 2-clorofenol (Martínez, 2013), el *p*-cresol y sus intermediarios (Silva y col., 2014) y el *m*-cresol (Zepeda y col., 2014). Los diversos autores sugieren que el uso del sistema SBR puede constituir una alternativa atractiva para mantener un proceso estable nitrificante aún con la presencia de compuestos inhibitorios en el efluente a tratar. En el presente estudio, se mostró que es posible mantener una actividad nitrificante estable, eficaz y con alta conversión de amonio a nitrato hasta 20 mg S/L.d.

### VI.3.5 Oxidación del sulfuro en el reactor SBR nitrificante

Se realizaron cinéticas de oxidación del sulfuro dentro del reactor al inicio de cada periodo de adición a las concentraciones más altas ensayadas de 10, 15 y 20 mg S/L. La baja sensibilidad del método yodométrico no permitió realizar cinéticas con precisión a concentraciones de sulfuro menores que 10 mg S/L. Se realizaron también cinéticas abióticas a 10, 15 y 20 mg S/L. Los resultados de los ensayos bióticos y abióticos se comparan en la Figura 44 y la Tabla 27.



**Figura 44.** Velocidades de oxidación del sulfuro a diferentes concentraciones iniciales de sulfuro en cultivos abióticos (■) y bióticos (□) en el reactor SBR.

**Tabla 27.** Balance de azufre en el reactor SBR a diferentes concentraciones iniciales de sulfuro.

	$[S-HS^-]_i$ (mg S-HS <sup>-</sup> /L)	$[S-HS^-]_f$ (mg S-HS <sup>-</sup> /L)	$[S-SO_4^{2-}]_f$ (mg S-SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> /L)	$[S-S_2O_3^{2-}]_f$ (mg S-S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> /L)	$[S^0]_f$ (mg S <sup>0</sup> /L)
	12 ± 2.5	0	8.3 ± 1.4	0	0
Abiótico	16 ± 2.1	0	12.4 ± 3.1	0	0
	22 ± 1.9	0	17.2 ± 2.2	0	0
	10 ± 1.1	0	7.9 ± 0.8	0	0
Biótico	15 ± 1.8	0	10.0 ± 2.9	3.0 ± 0.9	0
	20 ± 2.7	0	10.8 ± 0.5	6.0 ± 1.2	0

i: al inicio del ciclo; f: al final del ciclo de 12 h.

En los ensayos abióticos, todo el sulfuro fue oxidado en menos de 2 h, en su mayoría a sulfato, confirmando que hubo oxidación química en ausencia de lodo en el reactor como fue previamente observado en el presente trabajo en varias ocasiones. Como se puede observar en la Figura 44, las velocidades volumétricas abióticas de oxidación del sulfuro tuvieron un comportamiento de una cinética de primer orden (Ecuación 57). Una regresión lineal ( $R^2 > 0.99$ ) arrojó un valor estimado de  $k$  de 0.87 1/h.

$$Q_{HS^-} = k[S-HS^-] \quad (57)$$

Donde:  $Q_{HS^-}$ : Velocidad volumétrica de oxidación de sulfuro (mg S/L.h);  $k$ : Constante de velocidad (1/h) y  $[S-HS^-]$ : Concentración de sulfuro (mg S/L).

Como se puede observar en la Figura 44, se registró un aumento significativo ( $p < 0.038$ ) en la velocidad volumétrica de oxidación de sulfuro al estar presente el lodo con respecto a las velocidades volumétricas de los ensayos abióticos. En los ensayos bióticos, los productos finales fueron el sulfato y el tiosulfato. Los resultados obtenidos indican que la biomasa presentó una actividad sulfuro oxidante con un aumento en su velocidad a través de los ciclos de operación. Esto es probablemente debido a la constante y prolongada alimentación de sulfuro al reactor SBR. La adaptación metabólica del lodo en oxidar biológicamente el sulfuro a través de los ciclos de operación contribuyó probablemente a que el sulfuro estuviera en contacto por menos tiempo y a menor concentración con la biomasa nitrificante y así limitar la inhibición de la nitrificación. Esto concuerda con los resultados previos del estudio cinético en el SBR donde se mostró una disminución del efecto inhibitorio a lo largo de los ciclos.

Se considera generalmente que la población microbiana en lodos puede cambiar en su estructura y su diversidad en reactores biológicos cuando la composición del influente cambia, tal como cuando se introduce un compuesto tóxico o inhibitorio al reactor (*LaPara y col., 2002; Huang y col., 2008*). Sin embargo, también se ha observado que un cambio en la composición del influente no necesariamente conlleva un cambio poblacional y recientemente, se ha comprobado que la flexibilidad metabólica de una misma especie puede permitir también el consumo de varios sustratos a través de varias rutas metabólicas (*Silva y col., 2014*). Como ejemplo, recientemente, *Kjeldal y col. (2014)* mostraron que la cepa amonio oxidante, *Nitrosomonas eutropha* C91, al ser expuesta al *p*-cresol, fue capaz de sintetizar proteínas relacionadas con la oxidación del *p*-cresol, incluyendo una *p*-cresol deshidrogenasa. Sería de gran interés profundizar el estudio utilizando técnicas moleculares para tratar de relacionar la respuesta fisiológica del lodo nitrificante expuesto al sulfuro en el SBR con cambios en la población microbiana (poblaciones amonio, nitrito y sulfuro oxidantes) y su capacidad enzimática.

# BIBLIOGRAFÍA

---

---

## Bibliografía

1. Bejarano O.D.I., Thalasso F., Cuervo L.FdM. y Texier, A-C. (2013). Inhibitory effect of sulfide on the nitrifying respiratory process. *J Chem Technol Biotechnol.* **88**: 1344–1349.
2. Belser L.W. y Mays E.L. (1980). Specific inhibition of nitrite oxidation by chlorate and its use in assessing nitrification in soils and sediments. *Appl Environ Microbiol.* **39**: 505–510.
3. Beristain-Cardoso R., Texier A.-C., Razo-Flores E., Méndez-Pampín R. y Gómez J. (2009). Biotransformation of aromatic compounds from wastewaters containing N and/or S, by nitrification/denitrification: a review. *Rev Environ Sci Biotechnol.* **8**: 325–342.
4. Beristain-Cardoso R., Gómez J. y Méndez-Pampín R. (2010). The behavior of nitrifying sludge in presence of sulfur compounds using a floating biofilm reactor. *Biores Technol.* **101**: 8593–8598.
5. Carvallo L., Carrera J. y Chamy R. (2002). Nitrifying activity monitoring and kinetic parameters determination in a biofilm airlift reactor by respirometry. *Biotechnol Lett.* **24**: 2063–2069.
6. Chen K.Y. y Morris J.C. (1972). Kinetics of oxidation of aqueous sulfide by oxygen. *Environ Sci Technol.* **6**: 529–37.
7. Chen H., Liu S., Yang F., Xue Y. y Wang T. (2009). The development of simultaneous partial nitrification, ANAMMOX and denitrification (SNAD) process in a single reactor for nitrogen removal. *Biores. Technol.* **100**: 1548–554 .
8. Eiroa M., Kennes C. y Veiga M.C. (2004). Formaldehyde biodegradation and its inhibitory effect on nitrification. *J Chem Technol Biotechnol.* **79**: 499–504.
9. Erguder T.H., Boon N., Vlaeminck S.E. y Verstrate W. (2008). Partial nitrification achieved by pulse sulfide doses in a sequential batch reactor. *Environ Sci Technol.* **42**: 8715–8720.
10. Gilch S., Meyer O. y Schmidt I. (2009). A soluble form of ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea*. *J. of Biol. Chem.* **390**: 863–873.
11. Ginestet P., Audic J.M., Urbain V. y Block J.C. (1998). Estimation of nitrifying bacterial activities by measuring oxygen uptake in the presence of the metabolic inhibitors allylthiourea and azide. *Appl Environ Microbiol.* **64**: 2266–2268.
12. González-Sánchez A. y Revah S. (2007). The effect of chemical oxidation on the biological sulfide oxidation by an alkaliphilic sulfoxidizing bacterial consortium. *Enzyme Microbiol Technol.* **40**: 292–298.

13. Grunditz C., Gumaelius L. y Dalhammar G. (1998). Comparison of inhibition assays using nitrogen removing bacteria: Application to industrial wastewater. *Water Res.* **32**: 2995–3000.
14. Harris D.C. (2003). Análisis Químico Cuantitativo. 3ra edición. Editorial: Reverté. Apéndice G. pp. AP-13.
15. Hellinga C., Schellen A.A.J.C., Mulder J.M. y van Loodsrecht M.C.M. (1998). The SHARON process: an innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich wastewaters. *Water Sci. Technol.* **37**: 135–142.
16. Hernández L. (2005) Estudio del proceso respiratorio y estructura de un lodo desnitrificante en presencia de acetato y tolueno en un SBR. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México.
17. Huang A., Chen H., Chen L., Dai Y., y Zhao J. (2008). Effects of Cd(II) and Cu(II) on microbial characteristics in 2-chlorophenol-degradation anaerobic bioreactors. *J. Environ. Sci.* **20**: 745–752.
18. Hyman M.R. y Wood P.M. (1985). Suicidal inactivation and labelling of ammonia mono-oxygenase by acetylene. *Biochem. J.* **227**: 719–725.
19. Hyman M.R., Kim C.Y. y Arp D.J. (1990). Inhibition of Ammonia Monooxygenase in *Nitrosomonas europaea* by Carbon Disulfide. *J of Bacteriol.* **172**: 4775–4782.
20. Juliette L., Hyman M. y 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**: 3718–727.
21. Keener W.K. y Arp D.J. (1993). Kinetic studies of ammonia monooxygenase inhibition in *Nitrosomonas europaea* by hydrocarbons and halogenated hydrocarbons in an optimized whole-cell assay. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 2501–2510.
22. Keener W.K. y Arp D.J. (1994). Transformations of aromatic compounds by *Nitrosomonas europaea*. *Appl Environ Microbiol.* **60**: 1914–1920.
23. Khin T., Gheewala S.H. y Annachhatre A.P. (2002). Modeling of nitrification inhibition with aniline in suspended-growth processes. *Water Environ. Res.* **74**: 531–540.
24. Kim D.J., Lee D.I., Cha G.C. y Keller J. (2008). Analysis of Free Ammonia Inhibition of Nitrite Oxidizing Bacteria Using a Dissolved Oxygen Respirometer. *Environ. Eng. Res.* **13**: 125–130.
25. Kjeldal H., Pell L., Pommerening-Roser A y Nielsen J.L. (2014). Influence of *p*-cresol on the proteome of the autotrophic nitrifying bacterium *Nitrosomonas eutropha* C91. *Arch.*



- Microbiol.* **196**: 497–511.
26. Kuai L.P. y Verstraete W. (1998). Ammonium removal by the oxygen-limited autotrophic nitrification-denitrification system. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 4500–4506.
27. LaPara T.M., Nakatsu C.H., Pantea L.M. y Alleman J.E. (2002). Stability of the bacterial communities supported by a seven-stage biological process treating pharmaceutical wastewater as revealed by PCR-DGGE. *Water Res.* **36**: 638–646.
28. Lieu P.K., Homan H., Kurogl A., Kawagoshi Y., Fujii T. y Furukawa K. (2006). Characterization of sludge from single-stage nitrogen removal using anammox and partial nitrification (SNAP). *Jpn. J. Water Treat. Biol.* **42**: 53–64.
29. López-Fiuza J., Buys B., Mosquera-Corral A., Omil R. y Méndez R. (2002). Toxic effects exerted on methanogenic, nitrifying and denitrifying bacteria by chemicals used in a milk analysis laboratory. *Enz Microb Technol.* **31**: 976–985.
30. Lu H., Chandran K. y Stensel D. (2014) Microbial ecology of denitrification in biological wastewater treatment. *Water Res.* **64**: 237–254.
31. McCarty G.W. (1999). Modes of action of nitrification inhibitors. *Biol. Fertil. Soils* **29**: 1–9.
32. Mace S. y Mata-Alvarez J. (2002) Utilization of SBR technology for wastewater treatment: An overview. *Ind. Eng. Chem. Res.* **41**: 5539–5553.
33. Martinelle K., Westlund A. y Haggstrom L. (1996). Ammonium ion transport – a cause of cell death. *Cytotechnology.* **22**:251–254.
34. Martínez M.A. (2013). Evaluación del efecto del 2-clorofenol en la nitrificación utilizando un reactor de lote secuenciado (SBR). Tesis de Especialidad. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México.
35. Meincke M., Bock E., Kastrau D. y Kroneck P.M.H. (1992). Nitrite oxidoreductase from *Nitrobacter hamburgensis*: redox centers and their catalytic role. *Arch. Microbiol.* **158**: 127–131.
36. Moir J.W.B. y Wood N.J. (2001). Nitrate and nitrite transport in bacteria. *CMLS, Cell Mol Life Sci.* **58**: 215–224.
37. Nielsen A.H., Vollertsen J. y Hvitved-Jacobsen T. (2006). Kinetics and stoichiometry of aerobic sulfide oxidation in wastewater from sewers-effects of pH and temperature. *Water Environ Res.* **78**: 275–283.
38. Noophan P., Figueroa L.A., Munakata-Marr J. (2004). Nitrite oxidation inhibition by hydroxylamine: experimental and model evaluation. *Water Sci. and Technol.* **50**: 295–

- 304.
39. O'Brien D.J y Brikner F.B. (1977). Kinetics of oxygenation of reduced sulfur species in aqueous solution. *Environ Sci Technol.* **11**: 1114–1120.
40. Park S. y Bae W. (2009). Modeling kinetics of ammonium oxidation and nitrite oxidation under simultaneous inhibition by free ammonia and free nitrous acid. *Process Biochem.* **44**: 631–640.
41. Peng Y. y Zhu G. (2006). Biological nitrogen removal with nitrification and denitrification via nitrite pathway. *Appl Microbiol Biotechnol.* **73**: 15–26.
42. Pérez J.E. (2010). Efecto del 2-clorofenol sobre la nitrificación. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México.
43. Pynaert K., Smets B.F., Beheydt, D. y Verstraete, W. (2004). Start-up of autotrophic nitrogen removal reactors via sequential biocatalyst addition. *Environ. Sci. Technol.* **38**: 1228–1235.
44. Sears K., Alleman J.E. Barnard J.L. y Oleszkiewicz J.A. (2004). Impacts of reduced Sulfur components on active and resting ammonia oxidizers. *J Ind. Microbiol Biotechnol.* **31**: 369–378.
45. Silva C.D., Gómez J., Houbroun E., Cuervo-López F.M. y Texier A.-C. (2010). *p*-Cresol biotransformation by a nitrifying consortium. *Chemosphere.* **75**: 1387–1391.
46. Silva C.D., Cuervo-López F.M., Gómez J. y Texier A-C. (2011). Nitrite effect on ammonium and nitrite oxidizing processes in a nitrifying sludge. *World J Microbiol Biotechnol.* **27**: 1241–1245.
47. Silva C.D., Beristain-Montiel L., Cuervo-López F.M., y Texier A-C. (2014). *p*-Cresol mineralization and bacterial population dynamics in a nitrifying sequential batch reactor. *J. of Environ. Sci.* **26**: 1885–1893.
48. Singh S.N. y Verma A. (2007). The potential of nitrification inhibitors to manage the pollution effect of nitrogen fertilizers in agricultural and other soils: a review. *Environ Pract.* **9**: 266–279.
49. Tang B., Liu Y., Peng C., Wang S., Zhao K. y Peng Y. (2009). Determination effect of influent salinity and inhibition time on partial nitrification in a sequencing batch reactor treating saline sewage. *Water Environ.* **246**: 556–566.
50. Téllez-Pérez S.K., Silva C.D. y Texier A.C. (2013). Simultaneous ammonium and *p*-hydroxybenzaldehyde oxidation in a sequencing batch reactor. *Rev. Mex. Ing. Quim.* **12**: 97–104.

51. Texier A.-C. y Gómez J. (2004). Settleability and kinetics of a nitrifying sludge in a sequencing batch reactor. *Can J Microbiol.* **50**: 943–949.
52. Texier A.-C. y Gómez J. (2007). Simultaneous nitrification and *p*-cresol oxidation in a nitrifying sequencing batch reactor. *Water Research.* **41**: 315–322.
53. Zepeda A., Texier A.-C. y Gómez J. (2007). Batch nitrifying cultures in presence of mixtures of benzene, toluene, and *m*-xylene. *Environ Technol.* **28**: 355–360.
54. Zepeda A., Ben-Youssef C., Rincón S., Cuervo-López F. y Gómez J. (2013). Complete and simultaneous removal of ammonium and *m*-cresol in a nitrifying sequencing batch reactor. *Biodegradation.* **24**: 377–385.
55. Zhou Z., Xing C., An Y., Hu D., Qiao W. y Wang L. (2014). Inhibitory effects of sulfide on nitrifying biomass in the anaerobic–anoxic–aerobic wastewater treatment process. *J Chem Technol Biotechnol.* **89**: 214–219.

CONCLUSIONES  
Y  
PERSPECTIVAS

---

---

## VII. Conclusiones y perspectivas

Los resultados obtenidos en cultivos en lote del presente estudio muestran que es posible la eliminación completa de amonio mediante el proceso de nitrificación a bajas concentraciones de sulfuro (3.1 mg S/L). Sin embargo, la adición de sulfuro en un intervalo de concentraciones de 3.1 a 112.0 mg S/L causó un efecto inhibitorio sobre el proceso respiratorio nitrificante, reduciendo las velocidades específicas de oxidación de amonio y formación de nitrato. Se determinó un valor de  $CI_{50}$  para el proceso de amonio oxidación de  $2.6 \pm 0.3$  mg S/L y para el proceso de nitrito oxidación de  $1.2 \pm 0.2$  mg S/L, mostrándose que el proceso nitrito oxidante fue más sensible al efecto inhibitorio del sulfuro. A concentraciones de sulfuro adicionado mayores que 3.1 mg S/L, se propició la acumulación de nitrito en los cultivos, disminuyendo el rendimiento en nitrato. Los resultados obtenidos sugieren que la oxidación química de sulfuro a sulfato en reactores aerobios puede contribuir a una eliminación significativa de sulfuro bajo condiciones nitrificantes, sin embargo, se demostró que aún a bajas concentraciones de sulfuro y tiempos cortos de exposición, se mantuvieron los efectos inhibitorios del sulfuro sobre los procesos amonio y nitrito oxidantes.

Se evidenció que el sulfuro afecta al proceso amonio oxidante siguiendo una inhibición no competitiva (constante de inhibición:  $K_{iNH_4^+}$  de  $2.54 \pm 0.12$  mg S/L) y al proceso nitrito oxidante a través de una inhibición mixta (constante de inhibición no competitiva:  $K_{iNO_2^-}$  de  $1.03 \pm 0.06$  mg S/L y constante de inhibición competitiva:  $K_{i'NO_2^-}$  de  $0.22 \pm 0.03$  mg S/L). Los resultados confirman que el sulfuro es un fuerte inhibidor de los procesos amonio y nitrito oxidantes, siendo la nitrito oxidación más sensible. Por lo tanto, su presencia debe de ser controlada en reactores nitrificantes en sistemas de tratamiento de aguas residuales para evitar la acumulación de nitrito. Utilizando las constantes cinéticas y los modelos de inhibición, se realizó una simulación del efecto de la adición de sulfuro a un reactor nitrificante en continuo y en régimen estacionario y se determinó que una concentración máxima de sulfuro de 1 mg S/L podría ser alimentada sin que se viera afectada la eficiencia de consumo de amonio ni el rendimiento de formación de nitrato.

En un reactor de lotes secuenciados (SBR) alimentado con amonio (125 mg N/L) y sulfuro (2.5-20.0 mg S/L), se observó que las velocidades específicas de la nitrificación se vieron fuertemente disminuidas, sin embargo, se observó que el efecto inhibitorio del sulfuro

disminuyó a través de los ciclos de operación. El lodo presentó una adaptación metabólica en el SBR permitiéndole oxidar el amonio a nitrato cada vez más rápido a pesar de la alimentación con sulfuro. Se comprobó en el SBR que el proceso nitrito oxidante fue el más sensible al efecto inhibitorio. Los resultados del estudio cinético también sugirieron que el sulfuro podría haber afectado la etapa de conversión de hidroxilamina a nitrito del proceso amonio oxidante, inhibiendo la actividad de la enzima hidroxilamina oxidorreductasa (HAO) y provocando la acumulación de hidroxilamina en el cultivo. Se mostró que a pesar del efecto inhibitorio del sulfuro sobre la nitrificación en el SBR, fue posible mantener una actividad nitrificante estable, eficaz y con alta conversión de amonio a nitrato hasta 20 mg S/L (equivalente a 40 mg S/L.d). Se observó también una adaptación metabólica del lodo en oxidar biológicamente el sulfuro con un aumento en la velocidad de la capacidad sulfuro oxidante a través de los ciclos de operación. Los resultados sugieren que el uso de lodos nitrificantes estables fisiológicamente en reactores SBR puede ser una alternativa para tratar efluentes con amonio y compuestos inhibitorios como el sulfuro, así como para propiciar capacidades metabólicas adicionales a la de la nitrificación como la oxidación de sulfuro a sulfato.

Los resultados del presente trabajo pueden sugerir que el sulfuro tuviera un efecto inhibitorio a nivel de las enzimas nitrificantes (AMO, HAO y NOR), sin embargo, sería necesario evaluar los procesos amonio, hidroxilamina y nitrito oxidantes por separado en cultivos axénicos para determinar específicamente el efecto del sulfuro sobre cada actividad enzimática. En el presente trabajo, se sugiere que el uso de reactores SBR puede ser una alternativa para tratar efluentes con amonio y compuestos inhibitorios como el sulfuro ya que se demostró que este sistema propicia la disminución de la inhibición sobre la nitrificación a través de los ciclos de operación y puede favorecer otras capacidades metabólicas del lodo como el proceso sulfuro oxidante y obtener la eliminación simultánea de varios contaminantes. Sería de gran interés profundizar el estudio utilizando técnicas moleculares para tratar de relacionar la respuesta fisiológica del lodo nitrificante expuesto al sulfuro en el SBR con cambios en la población microbiana (poblaciones amonio, nitrito y sulfuro oxidantes) y su capacidad enzimática.

# ARTÍCULOS

---

---

## VIII. Artículos científicos productos de la tesis doctoral

## Research Article



Received: 26 July 2012

Revised: 24 September 2012

Accepted: 10 October 2012

Published online in Wiley Online Library: 12 December 2012

(wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/jctb.3982

## Inhibitory effect of sulfide on the nitrifying respiratory process

Diego Iván Bejarano Ortiz,<sup>a</sup> Frédéric Thalasso,<sup>b</sup> Flor de María Cuervo López<sup>a</sup> and Anne-Claire Texier<sup>a\*</sup>

### Abstract

**BACKGROUND:** Biological wastewater treatment by nitrification is widely used; however information on inhibition of nitrification by sulfide is still scarce. The aim of this study was to evaluate the inhibitory effect of different initial sulfide concentrations on ammonium and nitrite oxidizing processes.

**RESULTS:** In the absence of sulfide, nitrification was completed after 24 h with an ammonium consumption efficiency ( $E_{\text{NH}_4^+}$ ) of  $100.0 \pm 2.1\%$  and an ammonium to nitrate conversion yield ( $Y_{\text{NO}_3^-}$ ) of  $0.90 \pm 0.01 \text{ g NO}_3^- \text{-N g}^{-1} \text{ NH}_4^+ \text{-N}$  consumed. At sulfide concentrations lower than  $13.5 \pm 0.7 \text{ mg HS}^- \text{-S L}^{-1}$ ,  $E_{\text{NH}_4^+}$  was maintained at 100% after 60 h. At sulfide concentrations ranging from 3.1 to  $112.0 \text{ mg HS}^- \text{-S L}^{-1}$ , the  $Y_{\text{NO}_3^-}$  decreased from 0.9 to 0.3 due to an accumulation of nitrite, whereas specific rates decreased by 51 to 92% for  $\text{NH}_4^+$  consumption and by 77 to 97% for  $\text{NO}_3^-$  production. The  $\text{IC}_{50}$  value (concentration causing 50% inhibition) for ammonium and nitrite oxidation was  $2.6 \pm 0.3$  and  $1.2 \pm 0.2 \text{ mg HS}^- \text{-S L}^{-1}$ , respectively.

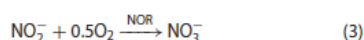
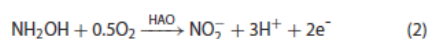
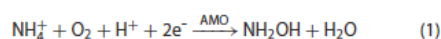
**CONCLUSION:** Sulfide provoked an inhibitory effect on both ammonium and nitrite oxidizing processes, nitrite oxidation being the most affected step. This information is relevant for wastewater treatment, indicating that the presence of sulfide in effluents even at low concentration might strongly alter the nitrifying activity of activated sludge and provoke nitrite accumulation.

© 2012 Society of Chemical Industry

**Keywords:** inhibition; nitrification; respiratory process; sulfide

### INTRODUCTION

Many industries (textile, tannery, food processing, pulp and paper, rubberlatex, explosive manufacturing, pesticides, petroleum refinery, etc.) discharge nitrogen-rich wastewaters. Ammonium concentrations reported in the industrial sector are in a range from 30 to  $45000 \text{ mg NH}_4^+ \text{-N L}^{-1}$ .<sup>1</sup> Ammonium contamination causes eutrophication and toxicity problems in the aquatic ecosystem.<sup>2</sup> Biological nitrogen removal from wastewaters can be performed by two coupled respiratory processes, one aerobic and another anaerobic known as nitrification and denitrification, respectively.<sup>3,4</sup> Nitrification is the oxidation of ammonium to nitrate and denitrification is the reduction of nitrate to molecular nitrogen. The nitrifying process corresponds to two coupled and successive respiratory pathways: the ammonium and nitrite oxidizing processes. The ammonium oxidation process is mediated by two enzymes; the ammonium monooxygenase (AMO), which catalyzes the oxidation of ammonium to hydroxylamine ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ) (Equation (1)) and the hydroxylamine oxidoreductase (HAO), which catalyzes the oxidation of  $\text{NH}_2\text{OH}$  to nitrite (Equation (2)).<sup>5</sup> The nitrite oxidation process is catalyzed by the nitrite oxidoreductase (NOR) (Equation (3)).



Nitrification is very sensitive to several known inhibitors, including metals, inorganic and organic compounds.<sup>2,6</sup> Sulfide can be present in combination with ammonium in industrial wastewater. Indeed, ammonium and sulfide have been found together in waste streams generated by petroleum refineries,<sup>7</sup> tanneries<sup>8</sup> and food processing plants,<sup>9</sup> among others. Additionally, ammonium and sulfate are commonly found in both industrial and municipal wastewaters, and sulfate can be reduced to sulfide in anaerobic pre-treatment steps or under anaerobic conditions in sewer systems.<sup>10</sup> As described by Sears *et al.*<sup>11</sup> there are various processing scenarios in wastewater treatment systems that might contribute to sulfide formation and to the exposure of nitrifying sludge to sulfide.

Studies on the effect of soluble sulfide on the nitrifying respiratory process are still limited (Table 1). In general, it has been observed that sulfide has a negative impact on nitrification, reducing the ammonium consumption efficiency, the nitrate production yield or the volumetric and specific rates of nitrification

\* Correspondence to: Anne-Claire Texier, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Depto. Biotecnología-CBS, Av. San Rafael Atlixco, No. 186, Col. Vicentina, D.F., México. E-mail address: actx@xanum.uam.mx

<sup>a</sup> Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Depto. Biotecnología-CBS, Av. San Rafael Atlixco, No. 186, Col. Vicentina, D.F., México

<sup>b</sup> Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV-IPN), Depto. Biotecnología y Bioingeniería, Av. IPN, 2508, San Pedro Zacatenco, C.P. 07360, D.F., México



Table 1. Effect of sulfide on the activity of nitrifying sludge					
Sulfide concentration (mg L <sup>-1</sup> )	Inoculum	Reactor	Dissolved oxygen (mg L <sup>-1</sup> )	Main effects	References
1.7–18	Nitrifying biofilm 3.5 g VSS L <sup>-1</sup> + 0.5 g IVS L <sup>-1</sup>	Batch	4.5–5.5	Decrease in the specific rates of NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> consumption and NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> formation.	Beristain-Cardoso <i>et al.</i> (2010)
1.3–82.5	Nitrifying sludge 2.7 ± 0.06 g VSS L <sup>-1</sup>	Sequential Batch Reactor	6.5–7.9	Increase in the NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N to (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N + NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N) accumulation ratio.	Erguder <i>et al.</i> (2008)
0.5–3.6	Nitrifying sludge 1 g VSS L <sup>-1</sup>	Batch	2–6	Decrease in the volumetric rate of NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> consumption.	Sears <i>et al.</i> (2004)
0.5–206 0.5–2.6	Not reported	Moving bed biofilm reactors	5–8	Decrease in the volumetric rate of NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> consumption.	Æsøy <i>et al.</i> (1998)
323	Mixed populations of nitrifying and denitrifying bacteria	Aerated activated sludge reactor	> 6	Decrease in the NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> consumption efficiency.	Becker <i>et al.</i> (1997)
1.9 or 3.2	Estuarine sediments	Batch	4.8–6.4	Decrease in the specific rates of NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> and NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> formation.	Joye and Hollibaugh (1995)
7.2	Not reported	Activated sludge reactor; Fluidized bed reactor; Packed-bed reactor	4–6	Decrease in the NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> consumption efficiency.	Martienssen <i>et al.</i> (1995)
2.0–5.4	Not reported	Sewage treatment works	6–8	Decrease in the NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> consumption efficiency.	Bentzen <i>et al.</i> (1995)

VSS: Volatile Suspended Solids; IVS: Immobilized Volatile Solids

processes.<sup>12–16</sup> It is important to note that very few studies evaluated the complete nitrifying respiratory process (oxidation of ammonium to nitrate) using the necessary response variables as a whole: ammonium consumption efficiency, nitrite and nitrate production yields and specific rates of ammonium consumption and nitrate production. This information can be useful for characterizing the ammonium and nitrite oxidizing processes in nitrifying sludge in the presence of sulfide. In spite of the fact that the nitrite oxidizing bacteria are generally considered as the most sensitive to variations of the environmental conditions leading to an undesired nitrite accumulation in bioreactors for wastewaters treatment, studies on sulfide effects on the nitrite oxidizing process are scarce.<sup>17</sup> Moreover, there is still little information on the oxidation of sulfide under nitrifying conditions.

Various possible explanations of how sulfide can affect nitrification are reported in the literature. Chemical and biological oxidation of sulfide can compete for dissolved oxygen and inhibit the nitrification processes by limiting the oxygen availability.<sup>18,19</sup> The addition of sulfide in nitrifying cultures might also cause inhibition at the enzymatic level, mainly on the AMO.<sup>11</sup> Sulfide precipitation with metals could decrease their availability in the medium and inhibit the activity of the nitrification enzymes. For instance, it is known that copper plays a role as a co-factor at the active site of AMO.<sup>20</sup> Moreover, it has been previously shown that the AMO was able to oxidize the sulfur atom of organic sulfur compounds such as thioethers to their corresponding sulfoxides,

which would then lead to competitive inhibition.<sup>21</sup> However, information on inhibition of nitrification by sulfide is still partial and more research is required to understand better the involved mechanisms.

Considering that biological wastewater treatment by nitrification is widely used and that many wastewaters contain ammonium and sulfide, it is of interest to further investigate the inhibitory effect of sulfide on nitrification processes. The aim of this study was to evaluate the inhibitory effect of different initial sulfide concentrations on ammonium and nitrite oxidizing processes by using a stable physiologically nitrifying sludge that was never previously exposed to sulfide and response variables such as efficiency, yields and specific rates of the respiratory process. The oxidation of sulfide under nitrifying conditions was also investigated.

## EXPERIMENTAL

### Nitrifying inoculum

The sludge used for batch nitrification experiments was obtained from a nitrification continuous stirred tank reactor (CSTR) under steady-state. The working volume of the CSTR was 6 L and the hydraulic retention time 3.5 d. The reactor was operated at 30 °C, pH 7.8 ± 0.3 and 200 rpm. Dissolved oxygen concentration was maintained at 4.0 ± 0.5 mg L<sup>-1</sup> by continuous aeration. The detailed operating conditions and culture medium composition of the CSTR were previously described by Silva *et al.*<sup>22</sup>

### Batch experiments

All experiments were performed in 160 mL serum bottles with a lithoautotrophic medium (100 mL) as follows ( $\text{g L}^{-1}$ ):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0.24),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (0.19),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.28),  $\text{MgSO}_4$  (0.20),  $\text{NaCl}$  (0.20),  $\text{NaHCO}_3$  (1.75) and  $\text{CaCl}_2$  (0.01). All reactants were analytical grade. Initial  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NaHCO}_3$  concentrations were  $100 \pm 5 \text{ mg N L}^{-1}$  and  $250 \pm 10 \text{ mg C L}^{-1}$ , respectively. The initial pH value was  $8.0 \pm 0.4$  and the initial volatile suspended solids (VSS) concentration was  $320 \pm 16 \text{ mg L}^{-1}$ . Serological bottles were sealed with rubber stoppers and aluminum crimp caps. Headspace and liquid phases were saturated with oxygen. Oxygen (99.6% purity, Praxair, Mexico) was bubbled through the medium for 3 min and flushed through the bottle's 60 mL headspace for 3 min upon closure. Cultures were then maintained at  $30^\circ\text{C}$  and orbitally shaken at 300 rpm. Control assays were conducted with no sulfide, with no inoculum (abiotic control) or with no oxygen and with sterilized inoculum ( $121^\circ\text{C}$  for 15 min). Sulfide was added from a standard solution of  $\text{Na}_2\text{S}_9\text{H}_2\text{O}$  ( $1 \text{ g S L}^{-1}$ ) at initial concentrations of  $3.1 \pm 0.2$ ,  $6.4 \pm 0.5$ ,  $13.5 \pm 0.7$ ,  $52.0 \pm 2.6$  and  $112.0 \pm 2.5 \text{ mg S L}^{-1}$ . In order to evaluate the effect of sulfate on nitrification, additional tests with an initial sulfate concentration of  $83.2 \pm 2.6 \text{ mg SO}_4^{2-} \text{ L}^{-1}$  were performed. All batch cultures were carried out at least in duplicate. Each bottle was an independent experimental unit, which was sacrificed after sampling. Samples were filtered ( $0.45 \mu\text{m}$ ) and analyzed for ammonium, nitrite, nitrate, sulfide, thiosulfate, and sulfate. The response variables used for evaluating the physiological behavior of the sludge were ammonium consumption efficiency ( $E_{\text{NH}_4^+}$ ,  $(\text{g NH}_4^+-\text{N consumed g}^{-1} \text{ NH}_4^+-\text{N initial}) \times 100$ ), nitrite production yield ( $Y_{\text{NO}_2^-}$ ,  $\text{g NO}_2^--\text{N g}^{-1} \text{ NH}_4^+-\text{N consumed}$ ), nitrate production yield ( $Y_{\text{NO}_3^-}$ ,  $\text{g NO}_3^--\text{N g}^{-1} \text{ NH}_4^+-\text{N consumed}$ ), and specific rates of  $\text{NH}_4^+-\text{N}$  consumption ( $q_{\text{NH}_4^+}$ ) and  $\text{NO}_3^--\text{N}$  production ( $q_{\text{NO}_3^-}$ ) ( $\text{mg N mg}^{-1} \text{ VSS h}^{-1}$ ). Specific rates were determined on the slope observed on linear regressions. In all cases, the coefficient of determination ( $R^2$ ) was higher than 0.98. The values obtained in assays represented mean values and the  $\pm$  standard deviation from independent samples. Statistical analyses (ANOVA) were conducted using the computation package SPSS (SPSS, an IBM Company).

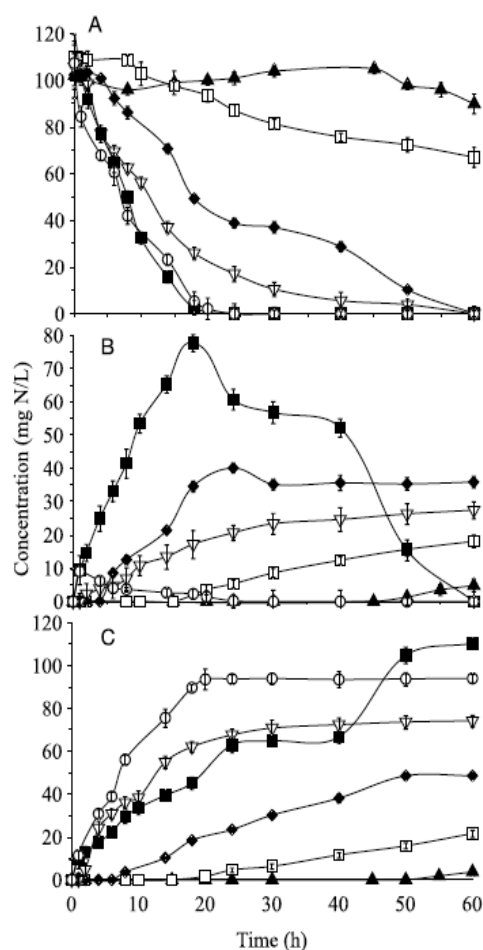
### Analytical methods

Ammonium concentration was determined with a selective electrode (Phoenix electrode company). Nitrite and nitrate concentrations were determined by HPLC (Perkin Elmer Series 200) using an ion exchange column (IC-Pak Anion HC,  $4.6 \times 150 \text{ mm}$ , Waters) and a UV detector at 214 nm as previously described by Silva *et al.*<sup>22</sup> Sulfide concentration in aqueous phase was determined by an iodometric method.<sup>23</sup> Sulfate and thiosulfate concentrations were determined by HPLC with an ion exchange column (IonoSpher A,  $4.6 \times 250 \text{ mm}$ , Varian) and a UV-visible detector at 308 nm. VSS were determined according to Standard Methods, APHA.<sup>24</sup> Dissolved oxygen and pH were determined by selective electrodes. Standard curves were drawn in triplicates for each analytical method. In all cases, the variation coefficient was less than 7%.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Nitrifying inoculum

The sludge used to inoculate batch cultures was obtained from a nitrification CSTR fed at a constant ammonium loading rate of  $116.0 \pm 9.2 \text{ mg NH}_4^+-\text{N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ . The output of  $\text{NH}_4^+-\text{N}$  rate was



**Figure 1.** Nitrification process with sulfide added at different initial concentrations ( $\text{mg HS}^-\text{L}^{-1}$ ): 0 (control) (○),  $3.1 \pm 0.2$  (■),  $6.4 \pm 0.5$  (◇),  $13.5 \pm 0.7$  (▽),  $52.0 \pm 2.6$  (□) and  $112.0 \pm 2.5$  (▲). A: Ammonium consumption; B: Nitrite formation and C: Nitrate formation.

negligible while the  $\text{NO}_3^--\text{N}$  production rate was  $108.7 \pm 10.1 \text{ mg N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ . Nitrification was in steady state as the nitrate production rates of the continuous reactor remained constant. Nitrite was not detected in the CSTR. Under the operating conditions applied,  $E_{\text{NH}_4^+}$  was  $99.0 \pm 1.6\%$  and  $Y_{\text{NO}_3^-}$  of  $0.95 \pm 0.03 \text{ g NO}_3^--\text{N g}^{-1} \text{ NH}_4^+-\text{N consumed}$ . These results showed that the sludge used as inoculum in batch assays was physiologically stable and performing nitrifying activity with high levels of efficiency and nitrate yield.

### Control tests

Control tests done with sterilized biomass and with no oxygen showed that loss of sulfide and ammonium from the bottles due to volatilization or adsorption was negligible. Control tests done with no sulfide showed that, after 24 h, complete removal of ammonium was observed with  $E_{\text{NH}_4^+}$  of  $100.0 \pm 2.1\%$  and  $Y_{\text{NO}_3^-}$  of  $0.90 \pm 0.01$  (Fig. 1 and Table 2). Thus, the nitrification process proceeded successfully under the batch experimental conditions

**Table 2.** Nitrogen balance, ammonium consumption efficiencies ( $E_{\text{NH}_4^+}$ ) and nitrite and nitrate production yields ( $Y_{\text{NO}_2^-}$  and  $Y_{\text{NO}_3^-}$ ) of the nitrifying process at different initial concentrations of added sulfide. Values were determined after 60 h of culture, except for the control test with no sulfide where values were calculated after 24 h

Treatment	Input-N ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Output-N ( $\text{mg L}^{-1}$ )				$E_{\text{NH}_4^+}$ (%) <sup>a</sup>	$Y_{\text{NO}_2^-}$ <sup>b</sup>	$Y_{\text{NO}_3^-}$ <sup>c</sup>
Added sulfide ( $\text{mg HS}^- \text{S L}^{-1}$ )	$\text{NH}_4^+-\text{N}$	$\text{NH}_4^+-\text{N}$	$\text{NO}_2^--\text{N}$	$\text{NO}_3^--\text{N}$				
0	107.3 ± 3.4	0.0 ± 1.2	0.0 ± 0.8	97.0 ± 2.1	100.0 ± 2.1	0.0 ± 0.1	0.90 ± 0.01	
3.1 ± 0.2	121.5 ± 4.2	0.0 ± 1.5	0.0 ± 1.1	110.0 ± 1.3	100.0 ± 3.0	0.0 ± 0.1	0.90 ± 0.01	
6.4 ± 0.5	105.8 ± 3.0	0.0 ± 1.1	27.5 ± 2.0	74.0 ± 3.1	100.0 ± 1.6	0.26 ± 0.03	0.70 ± 0.01	
13.5 ± 0.7	102.5 ± 2.3	0.0 ± 2.1	36.0 ± 3.1	49.0 ± 2.7	100.0 ± 2.4	0.35 ± 0.02	0.48 ± 0.01	
52.0 ± 2.6	110.2 ± 3.2	67.0 ± 3.4	18.0 ± 1.4	21.6 ± 3.0	39.0 ± 2.1	0.42 ± 0.04	0.50 ± 0.01	
112.0 ± 2.5	102.0 ± 2.8	90.0 ± 2.4	7.2 ± 0.5	3.7 ± 0.4	11.7 ± 1.0	0.60 ± 0.05	0.30 ± 0.01	

<sup>a</sup>  $E_{\text{NH}_4^+} = (\text{g NH}_4^+-\text{N consumed g}^{-1} \text{NH}_4^+-\text{N initial}) \times 100$   
<sup>b</sup>  $Y_{\text{NO}_2^-} = \text{g NO}_2^--\text{N g}^{-1} \text{NH}_4^+-\text{N consumed}$   
<sup>c</sup>  $Y_{\text{NO}_3^-} = \text{g NO}_3^--\text{N g}^{-1} \text{NH}_4^+-\text{N consumed}$

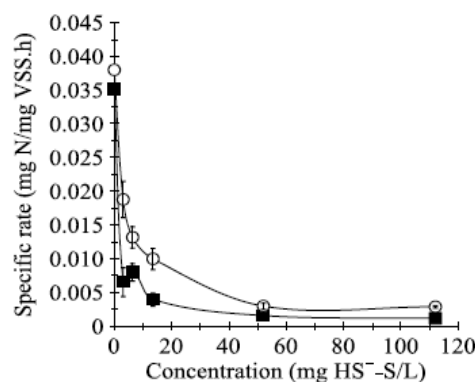
used. It was verified that the initial dissolved oxygen concentration of  $6.1 \pm 0.3 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$  dropped to  $3.0 \pm 0.5 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$  at the end of the 60 h assays. Specific rates for ammonium oxidation and nitrate formation were  $0.038 \pm 0.004$  and  $0.035 \pm 0.004 \text{ mg N mg}^{-1} \text{ VSS h}^{-1}$ , respectively. These values were used as references for comparing them with the values obtained when sulfide was added and calculating the percentages of decrease for nitrification specific rates.

#### Effect of sulfide on nitrification

Figure 1 and Table 2 show the main results observed when sulfide was added to batch assays. At  $3.1 \pm 0.2$ ,  $6.4 \pm 0.5$ ,  $13.5 \pm 0.7$ ,  $52.0 \pm 2.6$  and  $112.0 \pm 2.5 \text{ mg HS}^- \text{S L}^{-1}$ , the ammonium consumption started after 1, 2, 4, 10 and 45 h, respectively. Despite an increased lag phase, at sulfide concentration of up to  $13.5 \pm 0.7 \text{ mg S L}^{-1}$ , ammonium was totally consumed in less than 60 h with efficiency close to 100% (Fig. 1(A) and Table 2). These results showed that ammonium oxidation can efficiently occur at sulfide concentrations lower than  $13.5 \text{ mg S L}^{-1}$ . At higher concentrations ( $52.0 \pm 2.6$  and  $112.0 \pm 2.5 \text{ mg S L}^{-1}$ ),  $E_{\text{NH}_4^+}$  significantly decreased and residual ammonium remained in the cultures, after 60 h of culture.

At  $3.1 \pm 0.2 \text{ mg S L}^{-1}$ , all the consumed ammonium was oxidized to nitrate resulting in  $Y_{\text{NO}_3^-}$  close to one. However, at higher sulfide concentrations ( $6.4 \pm 0.5$  and  $13.5 \pm 0.7 \text{ mg S L}^{-1}$ ), in spite of high ammonium removal efficiency, nitrate was not the sole product of ammonium oxidation and nitrite was accumulating (Figs 1(B) and 1(C)). These results showed that nitrite oxidation was affected. At the highest sulfide concentrations tested ( $52.0 \pm 2.6$  and  $112.0 \pm 2.5 \text{ mg S L}^{-1}$ ), both ammonium and nitrite oxidizing processes were affected with lower values for both  $E_{\text{NH}_4^+}$  and  $Y_{\text{NO}_3^-}$  (Table 2).

Specific rates for ammonium oxidation and nitrate production are shown in Fig. 2. The addition of sulfide provoked a drastic decrease in the values of both ammonium and nitrite oxidation rates. Percentages of decrease varied from 51 to 92% for  $q_{\text{NH}_4^+}$  and from 77 to 97% for  $q_{\text{NO}_3^-}$ . These results showed the inhibitory effect of sulfide on both ammonium and nitrite oxidizing processes. However,  $q_{\text{NO}_3^-}$  was more affected by sulfide than  $q_{\text{NH}_4^+}$ . A statistical difference was indeed observed between  $q_{\text{NH}_4^+}$  and  $q_{\text{NO}_3^-}$  for all sulfide concentrations ranging from  $3.1$  to  $112.0 \text{ mg S L}^{-1}$  ( $\alpha < 0.038$ ). In addition,  $\text{IC}_{50}$  values were determined, defined as the concentration of sulfide at which the specific rates of ammonium consumption and/or nitrate formation decreased by

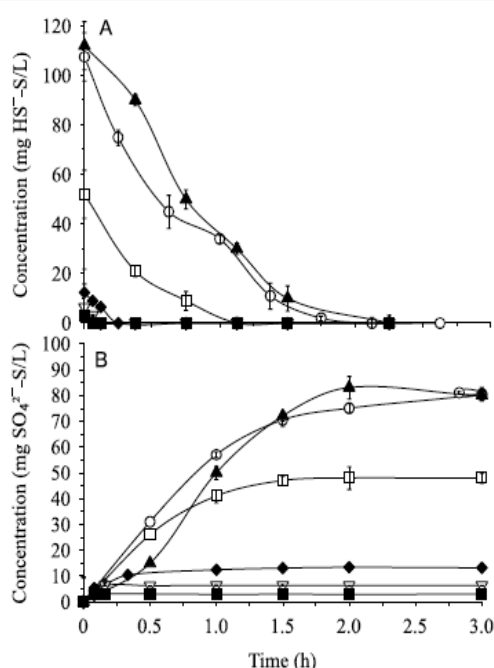


**Figure 2.** Specific rates of ammonium consumption ( $q_{\text{NH}_4^+}$ ,  $\circ$ ) and nitrate formation ( $q_{\text{NO}_3^-}$ ,  $\blacksquare$ ) in nitrifying batch cultures at different initial concentrations of added sulfide.

50%.  $\text{IC}_{50}$  values for ammonium and nitrite oxidation were  $2.6 \pm 0.3$  and  $1.2 \pm 0.2 \text{ mg HS}^- \text{S L}^{-1}$ , respectively. To the best of our knowledge, this is the first time that  $\text{IC}_{50}$  values have been determined for both ammonium and nitrite oxidizing processes with suspended nitrifying biomass, physiologically stable. Beristain-Cardoso *et al.*<sup>25</sup> have previously reported an  $\text{IC}_{50}$  value of  $13 \text{ mg S}^{2-} \text{L}^{-1}$  for ammonium oxidation, five times higher than the  $\text{IC}_{50}$  found in the present work. In the study of Beristain-Cardoso *et al.*<sup>25</sup> the use of a nitrifying biofilm previously fed with thiosulfate in a continuous reactor and showing the metabolic capacity for oxidizing thiosulfate and sulfide to sulfate might explain the higher tolerance of the sludge to sulfide. In the present study, the nitrifying sludge used as inoculum was suspended biomass not previously exposed to sulfide or any other sulfur compound.

In order to confirm that the inhibition observed was due to sulfide addition, several potential external effects were discarded. First, during nitrification assays, pH increased in the first 2 h from  $8.0 \pm 0.4$  to  $8.8 \pm 0.3$  in all cases due to sulfide addition (as  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ) into the cultures. After 2 h, pH did not change significantly. This pH increase was discarded as a potential cause of inhibition as it has been previously reported that nitrification can successfully occur in a pH range from 6 to 9.<sup>26</sup> Second, as will be shown hereafter, sulfide was oxidized to sulfate. To discard a potential inhibitory effect of sulfate on nitrification,





**Figure 3.** Sulfide oxidation in abiotic assays (○) and in nitrifying batch cultures at different initial concentrations (mg HS<sup>-</sup>-S L<sup>-1</sup>): 3.1 ± 0.2 (■), 6.4 ± 0.5 (▽), 13.5 ± 0.7 (◆), 52.0 ± 2.6 (□) and 112.0 ± 2.5 (▲). A: Sulfide oxidation; B: Sulfate formation.

nitrifying tests with an initial sulfate concentration of 83.2 ± 2.6 mg S L<sup>-1</sup> were performed and showed no effect of sulfate ( $E_{\text{NH}_4^+} = 100 \pm 3.5\%$  and  $Y_{\text{NO}_3^-} = 0.86 \pm 0.07$ ), compared with control with no sulfate. Third, it was also verified that, under the experimental conditions tested, no oxygen limitation occurred. According to the stoichiometry, 0.8 to 2.3 mmol O<sub>2</sub> were required for a complete oxidation of ammonium (108 ± 7 mg NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N L<sup>-1</sup>) to nitrate and sulfide (3.1 to 112.0 mg HS<sup>-</sup>-S L<sup>-1</sup>) to sulfate. According to O<sub>2</sub> measurements, a higher O<sub>2</sub> content was available in both headspace and liquid phases, corresponding to 2.4 mmol O<sub>2</sub>. Additionally, control experiments with 112 mg HS<sup>-</sup>-S L<sup>-1</sup> were performed with an intermediary headspace flushing with 99.6% oxygen, 3 h after experiment start-up. No difference in the kinetic profiles for ammonium consumption was observed, compared to experiments done with no extra oxygen addition. In both cases, the ammonium consumption started after 40 h at similar specific rates, confirming that there was no limitation for oxygen.

The results obtained show that nitrite oxidation is a process more sensitive to sulfide than ammonium oxidation. Therefore, the presence of sulfide in the effluents might cause a nitrite accumulation during nitrification. In fact, Erguder *et al.*<sup>27</sup> proposed sulfide dosing in a nitrifying sequential batch reactor as a tool to inhibit nitrite oxidation and impose partial nitrification. However, in a traditional wastewater treatment system coupling nitrification and denitrification processes, nitrite accumulation is undesirable in nitrifying reactors.<sup>28</sup> The information on the effect of sulfide on the nitrite oxidizing process is very limited and it is still unclear why nitrite oxidation is more sensitive to sulfide than ammonium oxidation. In suspended nitrifying cultures, sulfide might affect differently AMO, HAO and NOR activities. In biofilm nitrifying

**Table 3.** Sulfur mass balance in nitrifying batch cultures after 60 h (mg S L<sup>-1</sup>)

Input-S (mg L <sup>-1</sup> )	Output-S (mg L <sup>-1</sup> )		
	HS <sup>-</sup> -S	S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> -S	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> -S
3.1 ± 0.2	0	0	3.1 ± 0.3
6.4 ± 0.5	0	0	6.4 ± 0.6
13.5 ± 0.7	0	0	12.8 ± 0.5
52.0 ± 2.6	0	0	46.0 ± 2.9
112.0 ± 2.5	0	5.2 ± 0.6	80.0 ± 1.8

cultures, Beristain-Cardoso *et al.*<sup>25</sup> suggested that the elemental sulfur formed by partial oxidation of sulfide might decrease nitrite transport within the biofilm. However, more investigation is still required to understand better how the nitrifying pathways are affected.

#### Sulfide oxidation in the nitrifying cultures

Kinetic profiles of sulfide oxidation in the nitrifying cultures are presented in Fig. 3. In any case, sulfide was rapidly and totally oxidized in less than 3 h and sulfate was the main end product. At initial concentrations from 3.1 to 52.0 mg HS<sup>-</sup>-S L<sup>-1</sup>, 96 ± 5% of the initial sulfide was recovered as sulfate (Table 3). At 112.0 mg HS<sup>-</sup>-S L<sup>-1</sup>, only 76% of initial sulfide concentration was converted to sulfate and thiosulfate. Other sulfide partial oxidation products, as polysulfides, sulfite or elemental sulfur were not discarded.

No significant difference was observed between the oxidation rate of sulfide in the microbial cultures at 112.0 mg HS<sup>-</sup>-S L<sup>-1</sup> and in abiotic controls done with no biomass; namely 49.4 ± 3.6 and 46.2 ± 2.8 mg HS<sup>-</sup>-S L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, respectively. That observation shows that even in the presence of nitrifying sludge, the oxidation of sulfide was mainly driven by chemical oxidation. Spontaneous chemical oxidation of sulfide by oxygen has been previously reported and several reports have shown the coexistence of chemical and biological sulfide oxidation in wastewater and biological reactors.<sup>29</sup> For instance, it has been shown that kinetics of both chemical and biological sulfide oxidation processes depend on several environmental factors such as pH, temperature, oxygen concentration, ionic strength and the presence of inhibitors or catalysts.<sup>18,30</sup> Similarly, it has been shown that the stoichiometry of sulfide oxidation is complex and may result in the formation of various products such as elemental sulfur, polysulfides, thiosulfate, sulfite, and sulfate.<sup>18,19</sup> The sulfide oxidizing capacity of the sludge and the rates of biological sulfide oxidation also depend on various factors, such as initial biomass concentration, sludge history, sludge origin, kind of sludge (biofilm or floc), and initial substrates concentration (sulfide, oxygen), among others. For instance, Beristain-Cardoso *et al.*<sup>25</sup> by using a microbial inoculum previously fed with ammonium and thiosulfate in a continuous reactor observed in batch assays that the sludge was able to consume thiosulfate by biochemical oxidation at a rate 56-fold higher than the chemical oxidation rate. Results from these authors also suggest that sulfide oxidation to sulfate was driven primarily by biological reaction. These results differ from those obtained in the present work where sulfide would be chemically oxidized. The fact that the nitrifying sludge used in the present study had never been exposed to sulfur compounds could partly explain the different metabolic capacities observed between these two nitrifying inocula. Chemical sulfide oxidation might be advantageous for nitrification by reducing the concentration of

the inhibiting sulfide in aerobic reactors, as previously proposed by González-Sánchez and Revah<sup>19</sup> for sulfide oxidation processes.

It is important to note that, under the experimental conditions used in the present study, in spite of the rapid oxidation of sulfide to sulfate, the time and concentrations of exposure of the sludge to sulfide were sufficient to highly inhibit the nitrifying activity for more than 60 h (Figs 1 and 3). This might suggest an inhibitory effect of sulfide on the nitrifying enzymes as reported by Juliette *et al.*<sup>21</sup> for the AMO and thioethers. However, more studies on AMO, HAO and NOR activities are required to describe the mechanisms involved. This information is relevant for wastewaters treatment, indicating that the presence of sulfide in effluents even at low concentrations might strongly alter the nitrifying activity of activated sludge and provoke nitrite accumulation.

## CONCLUSIONS

At 3.1 mg S L<sup>-1</sup>, the ammonium removal efficiency was maintained at 100% and the nitrate yield at 0.90 ± 0.01. This result shows that it is possible to completely eliminate ammonium by nitrification under low concentrations of sulfide. However, the addition of sulfide from 3.1 to 112.0 mg HS<sup>-</sup> S L<sup>-1</sup> caused an inhibitory effect on nitrification, reducing the specific rates of ammonium oxidation and nitrate formation. The IC<sub>50</sub> values determined for ammonium and nitrite oxidizing processes were 2.6 ± 0.3 and 1.2 ± 0.2 mg HS<sup>-</sup> S L<sup>-1</sup>, respectively. Nitrite oxidation was the most sensitive step and sulfide addition caused an accumulation of nitrite in the cultures. The negative effect on the nitrifying respiratory process was not due to the increase in pH value, accumulation of sulfate in the medium or oxygen limitation. In nitrifying cultures, sulfide was oxidized to sulfate by chemical oxidation. These results suggest that although the chemical oxidation of sulfide to sulfate in aerobic reactors might contribute to the main removal of sulfide from the wastewaters, sulfide kept a strong inhibitor for nitrification.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported financially by the Council of Science and Technology of Mexico (CONACYT) (Grant No. SEP-CONACYT-CB-2011-01-165174). Diego I. Bejarano Ortiz received a fellowship from CONACYT (211547).

## REFERENCES

- Tandukar M, Pavlostathis SG and Cervantes FJ, Autotrophic denitrification for the removal of nitrogenous and sulphurous contaminants from wastewaters. In *Environmental Technologies to Treat Nitrogen Pollution*, ed by Cervantes FJ. IWA Publishing, London, 319–371 (2009).
- Singh SN and Verma A, The potential of nitrification inhibitors to manage the pollution effect of nitrogen fertilizers in agricultural and other soils: a review. *Environ Pract* 9:266–279 (2007).
- Szpyrkowicz L and Kaul S, Biochemical removal of nitrogen from tannery wastewater: performance and stability of a full-scale plant. *J Chem Technol Biotechnol* 79:879–888 (2004).
- Beristain-Cardoso R, Texier AC, Razo-Flores E, Méndez-Pampín R and Gómez J, Biotransformation of aromatic compounds from wastewaters containing N and/or S, by nitrification/denitrification: a review. *Rev Environ Sci Biotechnol* 8:325–342 (2009).
- Arp DJ, Sayavedra-Soto LA and Hommes NG, Molecular biology and biochemistry of ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea*. *Arch Microbiol* 178:250–255 (2002).
- Çeçen F, Semerci N and Geyik AG, Inhibitory effects of Cu, Zn, Ni and Co on nitrification and relevance of speciation. *J Chem Technol Biotechnol* 85:520–529 (2010).
- Olmos A, Olguin P, Fajardo C, Razo E and Monroy O, Physicochemical characterization of spent caustic from the OXIMER process and sour waters from Mexican oil refineries. *Energy Fuels* 18:302–304 (2004).
- Durai G and Rajasimman M, Biological treatment of tannery wastewater – a review. *J Environ Sci Technol* 4:1–17 (2011).
- Omil F, Méndez R and Lema JM, Anaerobic treatment of saline wastewaters under high sulphide and ammonia content. *Bioresour Technol* 54:269–278 (1995).
- Zhan L, De Schryver P, De Gussem B, De Muynck W, Boon N and Verstraete W, Chemical and biological technologies for hydrogen sulfide emission control in sewer systems: a review. *Water Res* 42:1–12 (2008).
- Sears K, Alleman JE, Barnard JL and Oleszkiewicz JA, Impacts of reduced sulfur components on active and resting ammonia oxidizers. *J Ind Microbiol Biotechnol* 31:369–378 (2004).
- Æsøy A, Odegaard H, and Bentzen G, The effect of sulphide and organic matter on the nitrification activity in a biofilm process. *Water Sci Technol* 37:115–122 (1998).
- Becker M, Martiensen M, Fuhrmann B and Spohn U, Analyzing nitrogen and sulphide elimination from leachate by coulometric continuous flow titration. *ACTA Biotechnol* 17:39–50 (1997).
- Bentzen G, Smith AT, Bennett D, Webster NJ, Reinholt F, Sletholt E and Hobson J, 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* 31:293–302 (1995).
- Joye SB and Hollibaugh JT, Influence of sulfide inhibition of nitrification on nitrogen regeneration in sediments. *Science* 270:623–625 (1995).
- Martiensen M, Schulze R and Simon J, Capacities and limits of three different technologies for the biological treatment of leachate from solid waste landfill sites. *ACTA Biotechnol* 15:269–276 (1995).
- Bernet N and Spérandio M, Principles of nitrifying processes. In *Environmental Technologies to Treat Nitrogen Pollution*, ed by Cervantes FJ. IWA Publishing, London, 23–37 (2009).
- Nielsen AH, Vollertsen J and Hvitved-Jacobsen T, Kinetics and stoichiometry of aerobic sulfide oxidation in wastewater from sewers-effects of pH and temperature. *Water Environ Res* 78:275–283 (2006).
- González-Sánchez A and Revah S, The effect of chemical oxidation on the biological sulfide oxidation by an alkaliphilic sulfidoxidizing bacterial consortium. *Enzyme Microbiol Technol* 40:292–298 (2007).
- Ensign SA, Hyman RA and Arp DJ, In vitro activation of ammonia monooxygenase from *Nitrosomonas europaea* by copper. *J Bacteriol* 175:1971–1980 (1993).
- Juliette LY, Hyman MR and Arp DJ, Inhibition of ammonia oxidation in *Nitrosomonas europaea* by sulfur compounds: thioethers are oxidized to sulfoxides by ammonia monooxygenase. *Appl Environ Microbiol* 59:3718–3727 (1993).
- Silva CD, Gómez J, Houbbron E, Cuervo-López FM and Texier AC, *p*-Cresol biotransformation by a nitrifying consortium. *Chemosphere* 75:1387–1391 (2009).
- Bartlett JK and Skoog DA, Colorimetric determination of elemental sulfur in hydrocarbons. *Anal Chem* 26:1008–1011 (1954).
- Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20th edn. American Public Health Association, Washington DC, USA (1998).
- Beristain-Cardoso R, Gómez J and Méndez-Pampín R, The behavior of nitrifying sludge in presence of sulfur compounds using a floating biofilm reactor. *Bioresour Technol* 101:8593–8598 (2010).
- Tang B, Liu Y, Peng C, Wang S, Zhao K and Peng Y, Determination effect of influent salinity and inhibition time on partial nitrification in a sequencing batch reactor treating saline sewage. *Water Environ* 246:556–566 (2009).
- Erguder TH, Boon N, Vlaeminck SE and Verstrate W, Partial nitrification achieved by pulse sulfide doses in a sequential batch reactor. *Environ Sci Technol* 42:8715–8720 (2008).
- Silva CD, Cuervo-López FM, Gómez J and Texier AC, Nitrite effect on ammonium and nitrite oxidizing processes in a nitrifying sludge. *World J Microbiol Biotechnol* 27:1241–1245 (2011).
- Chen KY and Morris JC, Kinetics of oxidation of aqueous sulfide by oxygen. *Environ Sci Technol* 6:529–37 (1972).
- Ó'Brien DJ and Brikner FB, Kinetics of oxygenation of reduced sulfur species in aqueous solution. *Environ Sci Technol* 11:1114–1120 (1977).

## Kinetic constants for biological ammonium and nitrite oxidation processes under sulfide inhibition

D. I. Bejarano<sup>1</sup>, S. Huerta Ochoa<sup>1</sup>, F. Thalasso<sup>2</sup>, F. M. Cuervo López<sup>1</sup> and A.-C. Texier<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Depto. Biotecnología-CBS, Av. San Rafael Atlixco No 186, Col. Vicentina, D.F., México.

<sup>2</sup>Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV-IPN), Depto. Biotecnología y Bioingeniería, Av. IPN. 2508, San Pedro Zacatenco, C.P. 07360, D.F., México.

\*E-mail: [actx@xanum.uam.mx](mailto:actx@xanum.uam.mx)

### Abstract

Inhibition of ammonium and nitrite oxidation processes by sulfide was studied using sludge obtained from a steady-state nitrification reactor. In the absence of sulfide, the affinity constants of the sludge for ammonium ( $K_{S_{NH_4^+}}$ ) and nitrite ( $K_{S_{NO_2^-}}$ ) were found to be  $2.41 \pm 0.11$  mg  $NH_4^+$ -N/L and  $0.74 \pm 0.03$  mg  $NO_2^-$ -N/L while the maximum specific rates for ammonium ( $q_{max_{NH_4^+}}$ ) and nitrite ( $q_{max_{NO_2^-}}$ ) oxidation were  $0.086 \pm 0.008$  mg  $NH_4^+$ -N/mg microbial protein.h and  $0.124 \pm 0.001$  mg  $NO_2^-$ -N/mg microbial protein.h. Sulfide was shown to strongly inhibit both processes, decreasing the maximum specific rates. However, the kinetic constants ( $K_S$  and  $q_{max}$ ) for ammonium and nitrite oxidation processes were affected differently in presence of sulfide. Ammonium oxidation was well described by no-competitive inhibition with an inhibition constant ( $K_{i_{NH_4^+}}$ ) of  $2.54 \pm 0.12$  mg  $HS^-$ -S/L, whereas a mixed inhibition model fit well the experimental data for nitrite oxidation, obtaining a competitive inhibition constant ( $K_{i'_{NO_2^-}}$ ) of  $0.22 \pm 0.03$  mg  $HS^-$ -S/L and a no-competitive inhibition constant ( $K_{i_{NO_2^-}}$ ) of  $1.03 \pm 0.06$  mg  $HS^-$ -S/L. These results show that sulfide has greater inhibitory effect on nitrite oxidation than ammonium oxidation and its presence in nitrification systems should be controlled to prevent accumulation of nitrite during wastewater nitrification.

**Keywords:** Ammonium oxidation; inhibition; kinetic constants; nitrite oxidation; sulfide

### Introduction

The biological nitrogen removal is a process commonly used for removing ammonium in wastewater treatment plants (WWTP). This process includes two steps: nitrification and denitrification (Kuenen and Robertson, 1994). Nitrification and denitrification are biological processes, which play a fundamental role in the nitrogen cycle where nitrifying microorganisms transform ammonium to nitrate and denitrifying microorganisms reduce nitrate to molecular nitrogen. Nitrification is an aerobic process carried out by ammonium oxidizing bacteria (AOB) and nitrite oxidizing bacteria (NOB). In the first step of nitrification (ammonium oxidation process), AOB oxidize ammonium to nitrite while in the second step (nitrite oxidation process), nitrite is oxidized to nitrate by the NOB. Three enzymes are involved in nitrification: the ammonium monooxygenase (AMO) catalyzes the oxidation of



ammonium to hydroxylamine; the complex enzyme system hydroxylamine oxidoreductase (HAO) catalyzes the oxidation of hydroxylamine to nitrite; and the nitrite oxidoreductase (NOR) catalyzes the oxidation of nitrite to nitrate. AMO is located in the cytoplasmic membrane while HAO in the periplasmic space (Arp *et al.*, 2002). NOR is located in the cytoplasmic membrane of NOB (Spieck *et al.*, 1998). In the biological nitrogen removal process by nitrification and denitrification, the nitrifying step is generally considered to be the rate-limiting process because it can be inhibited by several factors (substrates concentration:  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{O}_2$ ; temperature; pH; inhibitory compounds) (Silva *et al.*, 2011).

In wastewater treatment systems, nitrifying biomass can be exposed to sulfide when it is known that nitrifiers are very sensitive to a variety of inhibitory compounds (Sears *et al.*, 2004; Singh and Verma 2007; Texier *et al.*, 2013). The occurrence of sulfide in sewer networks is of major concern because it is associated with problems of corrosion, malodorous odors and toxicity (Zhang *et al.*, 2008). Sulfide is frequently found in industrial wastewaters and it is also originated from sulfate reduction taking place within anaerobic regions in sewer systems (Nielsen *et al.*, 2006). Recently, Zhou *et al.* (2013) reported average concentrations of sulfide in the influent of three WWTP (Shanghai, China) varying from 3 to 13 mg  $\text{S}^{2-}/\text{L}$ . The inhibition of nitrification by sulfide has been investigated under several experimental conditions (Bejarano *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2013). Nevertheless, the majority of the studies were focused on the ammonium oxidation process and little information is available on the inhibitory effect of sulfide on the nitrite oxidation step. Previous results suggested that nitrification inhibition by sulfur compounds and sulfide might be due to effect on nitrifying enzymes (Juliette *et al.*, 1993; Sears *et al.*, 2004; Bejarano *et al.*, 2013). AMO, HAO and NOR activities might be inhibited by sulfide for various reasons, such as a limitation in dissolved oxygen due to sulfide oxidation processes or the limited availability in metallic co-factors because they can precipitate with sulfide, but also through direct effects on enzymes. The AMO is most commonly identified as the target enzyme for inhibitors of nitrification and diverse inhibitory mechanisms have been reported for this enzyme. According to McCarty (1999), the AMO has a broad substrate range for catalytic oxidation and over 40 compounds have been shown to be substrates of AMO. The inhibitory effects of many of these compounds are due to competition for the active site of the enzyme but no-competitive inhibition has been also reported (Keener and Arp, 1993). Other compounds, such as acetylene, are oxidized by AMO to highly reactive products that inactivate AMO and/or other enzymes causing an irreversible inhibition (Hyman and Wood, 1985). A broad range of S-containing compounds such as thiourea inhibit nitrification, probably by binding with copper within the active site of AMO or with other metals such as iron and zinc that have been also shown to be participating in AMO activity (Gilch *et al.*, 2009). The role of metals such as copper, iron, molybdenum, manganese and zinc in the activity of NOR has been also shown, suggesting that the NOR might be inhibited in the same way (Meincke *et al.*, 1992). However, the information on NOR inhibition mechanisms is still scarce. The knowledge on the inhibition by soluble sulfide of the nitrifying enzymes is very limited. Previous results from Sears *et al.* (2004) indicated that sulfide would provoke a reversible inhibition on ammonium oxidation. However, there are no experimental evidences of the type of reversible inhibition (competitive, no-competitive, and uncompetitive) and more research is needed to understand better the involved inhibitory mechanisms in ammonium and nitrite oxidation processes.

The aim of this study was to investigate the type of inhibition provoked by sulfide on ammonium and nitrite oxidation and compare the inhibitory constants ( $K_i$ ) for each process. The kinetic constants ( $K_S$  and  $q_{\max}$ ) as well as the inhibition constants for sulfide were

estimated from experimental results obtained in separated ammonium and nitrite consumption cultures.

## Materials and methods

### Inoculum

The biomass used during batch assays was obtained from a 6 L nitrification continuous stirred tank reactor (CSTR) under steady-state operation. The reactor was operated at 30°C, pH 7.0 ± 0.5, 200 rpm, with a hydraulic retention time of 3.5 d and a dissolved oxygen concentration of 4.0 ± 0.5 mg/L. The composition of the basal medium used for the CSTR has previously been reported (Silva *et al.*, 2009). At a constant ammonium loading rate of 248.9 ± 16.2 mg NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N/Ld, the nitrate production rate reached 236.3 ± 16.1 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N/Ld while the output of ammonium and nitrite rate was negligible. Under these operating conditions, nitrification was in steady-state with an ammonium removal efficiency of 99.4 ± 6.5% and a high nitrate production yield ( $Y_{NO_3} = 0.95 \pm 0.03$  g NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N/g NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N consumed).

### Batch experiments

All experiments were performed in 160 mL serological bottles with a lithoautotrophic medium (100 mL) as follows (g/L): KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.28), MgSO<sub>4</sub> (0.20), NaCl (0.20), NaHCO<sub>3</sub> (1.75) and CaCl<sub>2</sub> (0.01). For conducting ammonium oxidation assays, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.0004 – 0.012) and NH<sub>4</sub>Cl (0.0003 – 0.01) were added into the medium to give an initial NH<sub>4</sub><sup>+</sup> concentration varying between 1.5 and 50 mg N/L. For nitrite oxidation experiments, NaNO<sub>2</sub> (0.0007 – 0.025) was added in order to obtain an initial NO<sub>2</sub><sup>-</sup> concentration comprised from 1.5 to 50 mg N/L. The initial pH value was 7.5 ± 0.5. Inoculation took place by adding sludge previously stabilized in the CSTR at an initial microbial protein concentration of 65 ± 6 mg/L. Serological bottles were sealed with rubber stoppers and aluminum crimp caps. Headspace and liquid phases were saturated with oxygen (99.6% purity, Praxair, Mexico). Oxygen was bubbled through the medium for 3 min and flushed through the 60 mL headspace for 3 min upon closure. Different volumes of a Na<sub>2</sub>S.9H<sub>2</sub>O solution (1 g S/L) were added into the bottles to give the following initial sulfide concentrations: 2.5 ± 0.5, 3.5 ± 0.5 and 5.0 ± 0.5 mg S/L. Control cultures were also conducted in the absence of sulfide. Cultures were then incubated at 30°C in an orbital shaker at 300 rpm. All experimental treatments were carried out at least in duplicate. Each bottle was an independent experimental unit, which was sacrificed after sampling. Samples were filtered (0.45 μm) and analyzed for ammonium, nitrite and nitrate. Kinetic profiles of ammonium and nitrite uptake were established in all cases and the volumetric substrates consumption rates were determined on the slope observed on linear regressions. All coefficients of determination (R<sup>2</sup>) were higher than 0.98. With the microbial protein concentration known, the specific consumption rates of ammonium (q<sub>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></sub>) and nitrite (q<sub>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></sub>) were calculated and expressed as mg NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N/mg microbial protein.h and mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N/mg microbial protein.h, respectively. Statistical analyses (ANOVA, α = 0.05) were conducted using the computation package SPSS (SPSS, an IBM Company).

### Determination of kinetic constants

For the assays realized in the absence of sulfide as for those in the presence of sulfide as inhibitor, curves showing the evolution of the specific substrates consumption rates versus the initial substrates concentrations were established for ammonium oxidation and nitrite oxidation. The experimental data were described by the Monod model (Equations 1 and 2):



$$q_{NH_4^+} = \frac{q_{\max NH_4^+} C_{NH_4^+}}{K_{S_{NH_4^+}} + C_{NH_4^+}} \quad (1)$$

$$q_{NO_2^-} = \frac{q_{\max NO_2^-} C_{NO_2^-}}{K_{S_{NO_2^-}} + C_{NO_2^-}} \quad (2)$$

Where  $q$  and  $q_{\max}$  are the specific substrates ( $NH_4^+$  or  $NO_2^-$ ) consumption rate and its maximum value (mg N/mg microbial protein.h), respectively.  $K_{S_{NH_4^+}}$  and  $K_{S_{NO_2^-}}$  are the affinity constants (mg N/L) for ammonium and nitrite, respectively.  $C$  is the substrate concentration (mg N/L). In the presence of an inhibitor,  $q_{\max}$  and  $K_s$  values can vary respect to the control data (without inhibitor) and these variations reflect the type of inhibition (Park and Bae, 2009). The Monod kinetic constants ( $q_{\max}$  and  $K_s$ ) were determined by using the Sigma plot 10 computational package (Systat Software Inc., 2010). According to the variations of  $q_{\max}$  and  $K_s$  values with the sulfide concentration, models of enzymatic inhibition were tested to fit the experimental data (Sigma plot 10, Systat Software Inc., 2010). All the models considered described reversible inhibition (competitive, no-competitive, uncompetitive and mixed inhibition). The model for no-competitive inhibition was found to be the best fitting kinetic equation for describing ammonium oxidation inhibited by sulfide (Equation 3).

$$q_{NH_4^+} = \frac{\left( \frac{q_{\max NH_4^+}}{1 + \frac{C_I}{K_{i_{NH_4^+}}}} \right) C_{NH_4^+}}{K_{S_{NH_4^+}} + C_{NH_4^+}} \quad (3)$$

Where  $K_i$  is the inhibition constant for no-competitive inhibition (mg  $HS^-$ -S/L) and  $C_I$  the initial concentration of sulfide (mg  $HS^-$ -S/L).

In the case of nitrite oxidation inhibited by sulfide, the selected model was the mixed inhibition model (competitive and no-competitive inhibition) (Equation 4).

$$q_{NO_2^-} = \frac{\left( \frac{q_{\max NO_2^-}}{1 + \frac{C_I}{K_{i_{NO_2^-}}}} \right) C_{NO_2^-}}{\left( K_{S_{NO_2^-}} \right) \left( 1 + \frac{C_I}{K_{i'_{NO_2^-}}} \right) + C_{NH_4^+}} \quad (4)$$

Where  $K_i$  and  $K_i'$  correspond to the inhibition constants for no-competitive inhibition and competitive inhibition, respectively (mg  $HS^-$ -S/L).

Inhibition constants were determined from Equations 3 and 4 for characterizing the sulfide inhibition on ammonium and nitrite oxidation processes, respectively. In all cases, the fitted

data were compared with the experimental data, giving a good linear regression with coefficients of determination ( $R^2$ ) superior to 0.98.

### Analytical methods

Ammonium concentration was determined with a selective electrode (Phoenix electrode company). Nitrite and nitrate concentrations were determined by HPLC (Perkin Elmer Series 200) using an ion exchange column (IC-Pak Anion HC, 4.6×150 mm, Waters) and a UV detector at 214 nm as previously described by Silva *et al.* (2009). Sulfide concentration in aqueous phase was determined by an iodometric method (Bartlett and Skoog, 1954). Microbial protein concentration was determined by Lowry's method (Lowry *et al.*, 1951). Selective electrodes were used to determine dissolved oxygen concentration and pH value. Standard curves were drawn in triplicates for each analytical method. In all cases, the variation coefficient was less than 7%.

### Results and discussion

#### Ammonium and nitrite oxidation activity of the inoculum

Firstly, control assays with ammonium or nitrite as substrate were performed in the absence of sulfide to verify that the inoculum maintained its nitrifying activity under the batch experimental conditions used. Figure 1 shows the kinetic profiles obtained for ammonium and nitrite oxidation processes.

In the control assays with ammonium as substrate (Figure 1A), this compound was totally consumed and converted to nitrate within 4 h with a transient formation of nitrite. In the assays with nitrite as substrate (Figure 1B), this was completely oxidized to nitrate within 5 h. In both control cultures, the substrate consumption efficiency was close to 100%. The nitrate yield values were  $0.98 \pm 0.04$  mg  $\text{NO}_3^-$ -N/mg  $\text{NH}_4^+$ -N consumed in the ammonium consumption assays and  $0.99 \pm 0.06$  mg  $\text{NO}_3^-$ -N/mg  $\text{NO}_2^-$ -N consumed in the nitrite consumption cultures. Nitrate was the final product, showing that both ammonium and nitrite oxidation pathways were successfully carried out by the inoculum under the experimental conditions used in the batch cultures.

#### Inhibition of ammonium oxidation by sulfide

First, the Monod plot of ammonium oxidation was established without sulfide (Figure 2), giving a  $K_{S\text{NH}_4^+}$  of  $2.41 \pm 0.11$  mg  $\text{NH}_4^+$ -N/L and a  $q_{\text{maxNH}_4^+}$  of  $0.086 \pm 0.008$  mg  $\text{NH}_4^+$ -N/mg microbial protein.h ( $R^2 > 0.998$ ). Figure 2 also shows the Monod plots determined from the assays done with different initial sulfide concentrations ( $2.5 \pm 0.5$ ,  $3.5 \pm 0.5$  and  $5.0 \pm 0.5$  mg S/L) ( $R^2 > 0.981$ ). A clear inhibitory effect of sulfide on ammonium oxidation was observed through a significant decrease of  $q_{\text{NH}_4^+}$ .

#### Inhibition of nitrite oxidation by sulfide

The Monod plot of nitrite oxidation in absence of sulfide is shown in Figure 3.  $K_{S\text{NO}_2^-}$  was found to be of  $0.74 \pm 0.03$  mg  $\text{NO}_2^-$ -N/L and  $q_{\text{maxNO}_2^-}$  of  $0.124 \pm 0.001$  mg  $\text{NO}_2^-$ -N/mg microbial protein.h ( $R^2 > 0.995$ ). As for ammonium oxidation, a clear inhibitory effect of sulfide on nitrite oxidation was observed through a significant decrease of  $q_{\text{NO}_2^-}$  (Figure 3,  $R^2 > 0.978$ ). However, the inhibitory effect was more severe on nitrite oxidation than on ammonium oxidation (Table 1). At  $2.5 \pm 0.5$ ,  $3.5 \pm 0.5$  and  $5.0 \pm 0.5$  mg S/L of sulfide,  $q_{\text{max}}$  decreased by 36, 53 and 76%, respectively, for ammonium oxidation while it decreased by 70, 80 and 82%, respectively, for nitrite oxidation.

### Type of inhibition by sulfide on ammonium oxidation and nitrite oxidation

Variations in  $K_S$  and  $q_{\max}$  values for ammonium and nitrite oxidation processes are illustrated in Figure 4.

Results showed that in the presence of sulfide,  $q_{\max\text{NH}_4^+}$  decreased ( $P < 0.018$ ) while  $K_{S\text{NH}_4^+}$  remained constant ( $P > 0.837$ ) (Figure 4A). This type of inhibition was well described by the no-competitive inhibition model (Equation 3) ( $R^2 > 0.981$ ). In contrast, for the nitrite oxidation process,  $q_{\max\text{NO}_2^-}$  decreased ( $P < 0.011$ ) and  $K_{S\text{NO}_2^-}$  increased ( $P < 0.012$ ) (Figure 4B). This type of inhibition was well described by the mixed inhibition model (Equation 4) ( $R^2 > 0.978$ ). These results show that sulfide affects differently the ammonium and nitrite oxidation processes. Sulfide provoked a decrease of the rate of both biological processes but it affected also the affinity of the sludge for nitrite and did not for ammonium. The no-competitive inhibition constant ( $K_{i\text{NH}_4^+}$ ) was  $2.54 \pm 0.12$  mg  $\text{HS}^-$ -S/L for ammonium oxidation while  $K_{i\text{NO}_2^-}$  was  $1.03 \pm 0.06$  mg  $\text{HS}^-$ -S/L for nitrite oxidation. The competitive inhibition constant ( $K_i'$ ) of the mixed inhibition for nitrite oxidation was found to be of  $0.22 \pm 0.03$  mg  $\text{HS}^-$ -S/L. These results show that the inhibitory effect of sulfide on nitrite oxidation would be more of the competitive inhibition type than the no-competitive type, as shown by  $K_i'$  lower than  $K_i$ . These results suggest that sulfide might exert an inhibitory effect at the enzymatic level, affecting differently the nitrifying enzymes activities. If the  $K_i$  values obtained in the present study for sulfide are compared with those for other known inhibitory compounds of nitrification, it appears that sulfide can be considered as a strong inhibitor of the ammonium and nitrite oxidation processes. For instance, the  $K_i$  value of ammonium oxidation was 3.3 mg/L for aniline, one of the most important amines produced (Khin *et al.*, 2002). On the other hand, unionized free ammonia ( $\text{NH}_3$ ) and nitrous acid ( $\text{HNO}_2$ ) are known to be inhibitory compounds of the ammonium and nitrite oxidation processes (Anthonisen *et al.*, 1976; Vadivelu *et al.*, 2006a, b). Park and Bae (2009) reported that the  $K_i$  of nitrite oxidation was 46  $\mu\text{M}$  (0.8 mg/L) for  $\text{NH}_3$  and 1.7-6.8  $\mu\text{M}$  (0.08-0.3 mg/L) for nitrous acid, while the  $K_i$  of ammonium oxidation was 290-1600  $\mu\text{M}$  (4.9-27.2 mg/L) for  $\text{NH}_3$  and 12  $\mu\text{M}$  (0.6 mg/L) for nitrous acid.

### Conclusions

The results presented here show that relatively low sulfide concentrations have a strong inhibitory effect on ammonium ( $K_{i\text{NH}_4^+}$  of  $2.54 \pm 0.12$  mg S/L) and nitrite ( $K_{i\text{NO}_2^-}$  and  $K_i'$  of  $1.03 \pm 0.06$  and  $0.22 \pm 0.03$  mg S/L, respectively) oxidation processes, being the nitrite oxidation the most affected step. This could lead to nitrite accumulation during wastewater nitrification in aerobic reactors fed with ammonium and sulfide. Sulfide was shown to affect differently the ammonium oxidation (no-competitive inhibition model) and the nitrite oxidation (mixed inhibition model) processes, suggesting that sulfide exerted a different effect on AMO and NOR enzymes. To the best of our knowledge, this is the first time that the inhibition constants of sulfide were determined for separated ammonium and nitrite oxidation processes, giving valuable information for the operation and control of nitrification reactors receiving sulfide-containing influent.

### Acknowledgements

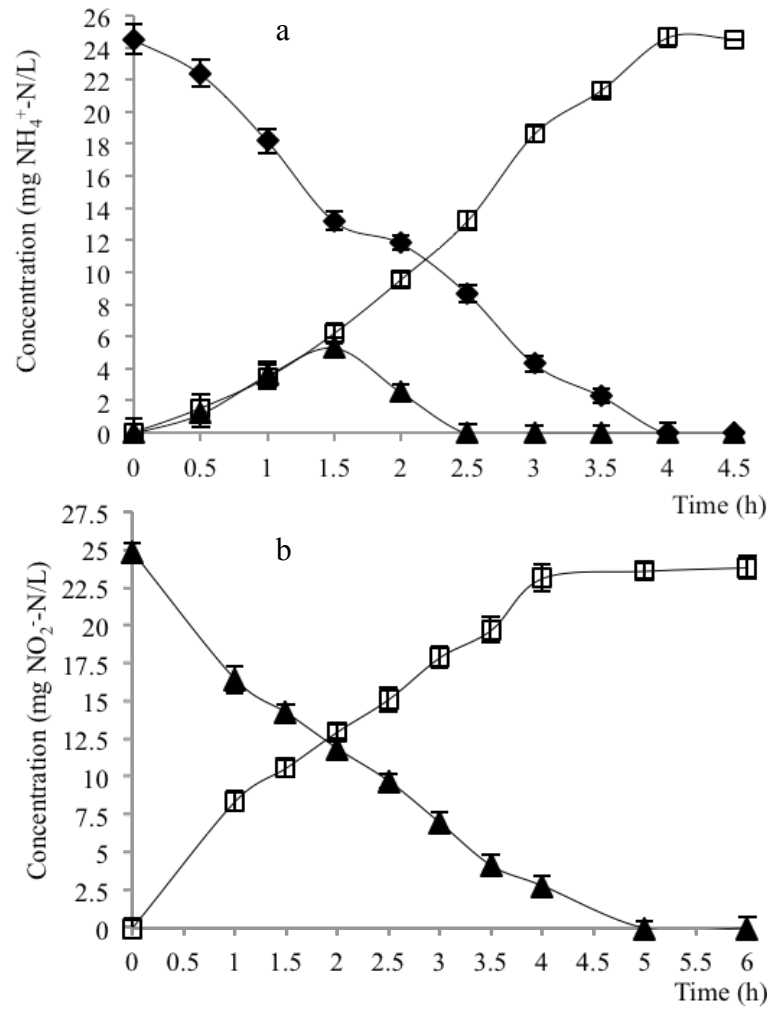
This work was supported by CONACYT (Grant No. SEP-CONACYT-CB-2011-01-165174).

### References

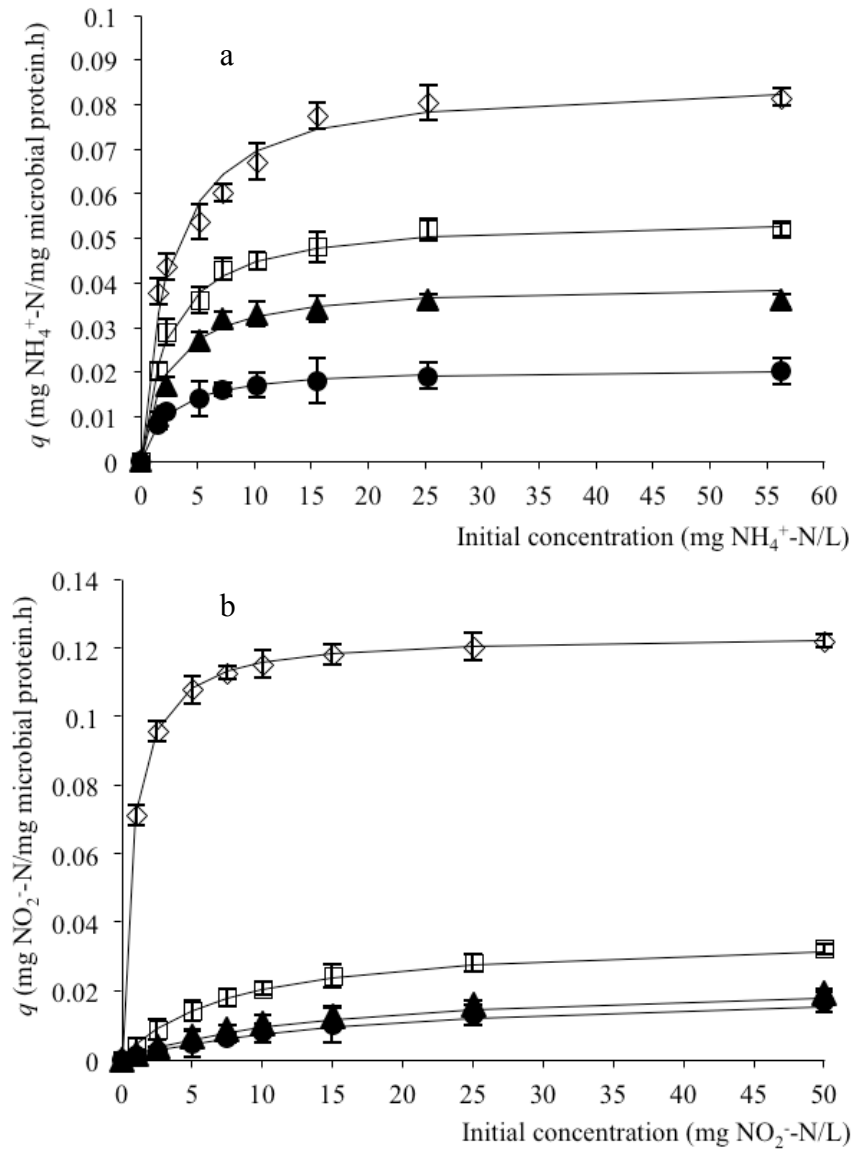
1. Anthonisen A.C., Loehr R.C., Prakasam T.B.S. and Srinath E.G. (1976). Inhibition of

- nitrification by ammonia and nitrous acid. *J. Water Pollut. Control. Fed.* 48: 835-852.
2. Arp D.J., Sayavedra-Soto L.A., Hommes N.G. (2002). Molecular biology and biochemistry of ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea*. *Arch. Microbiol.* 178: 250-255.
  3. Bartlett J.K. and Skoog D.A. (1954). Colorimetric determination of elemental sulfur in hydrocarbons. *Anal. Chem.* 26: 1008-1011.
  4. Bejarano Ortiz D.I., Thalasso F., Cuervo López F.M. and Texier A.-C. (2013). Inhibitory effect of sulfide on the nitrifying respiratory process. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 88: 1344-1349.
  5. Gilch S., Meyer O. and Schmidt I. (2009). A soluble form of ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea*. *Biol. Chem.* 390: 863-873.
  6. Hyman M.R. and Wood P.M. (1985). Suicidal inactivation and labelling of ammonia mono-oxygenase by acetylene. *Biochem. J.* 227: 719-725.
  7. Juliette L.Y., Hyman M.R. and Arp D.J. (1993). Inhibition of ammonia oxidation in *Nitrosomonas europaea* by sulfur compounds: thioethers are oxidized to sulfoxides by ammonia monooxygenase. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 3718-3727.
  8. Keener W.K. and Arp D.J. (1993). Kinetic studies of ammonia monooxygenase inhibition in *Nitrosomonas europaea* by hydrocarbons and halogenated hydrocarbons in an optimized whole-cell assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 2501-2510.
  9. Khin T., Gheewala S.H. and Annachhatre A.P. (2002). Modeling of nitrification inhibition with aniline in suspended-growth processes. *Water Environ. Res.* 74: 531-540.
  10. Kuenen J. G. and Robertson L.A. (1994). Combined nitrification-denitrification processes. *FEMS Microbiol. Rev.* 15: 109-117.
  11. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
  12. McCarty G.W. (1999). Modes of action of nitrification inhibitors. *Biol. Fertil. Soils.* 29: 1-9.
  13. Meincke M., Bock E., Kastrau D., Kroneck P.M.H. (1992). Nitrite oxidoreductase from *Nitrobacter hamburgensis*: redox centers and their catalytic role. *Arch. Microbiol.* 158: 127-131.
  14. Nielsen A. H., Vollertsen J. and Hvitved-Jacobsen T. (2006). Kinetics and stoichiometry of aerobic sulfide oxidation in wastewater from sewers-Effects of pH and temperature. *Water Environ. Res.* 78: 275-283.
  15. Park S. and Bae W. (2009). Modeling kinetics of ammonium oxidation and nitrite oxidation under simultaneous inhibition by free ammonia and free nitrous acid. *Proc. Biochem.* 44: 631-640.
  16. 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.
  17. Silva C.D., Gómez J., Houbroun E., Cuervo-López F.M. and Texier A.-C. (2009). *p*-Cresol biotransformation by a nitrifying consortium. *Chemosphere* 75: 1387-1391.
  18. Silva C.D., Cuervo-López F.M., Gómez J. and Texier A.-C. (2011). Nitrite effect on ammonium and nitrite oxidizing processes in a nitrifying sludge. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 27: 1241-1245.
  19. Singh S.N. and Verma A. (2007). The Potential of Nitrification Inhibitors to Manage the Pollution Effect of Nitrogen Fertilizers in Agricultural and Other Soils: A Review. *Environ. Pract.* 9:266-279.
  20. Spieck E., Ehrich S., Aamand J. and Bock E. (1998). Isolation and immunocytochemical location of the nitrite-oxidizing system in *Nitrospira moscoviensis*.

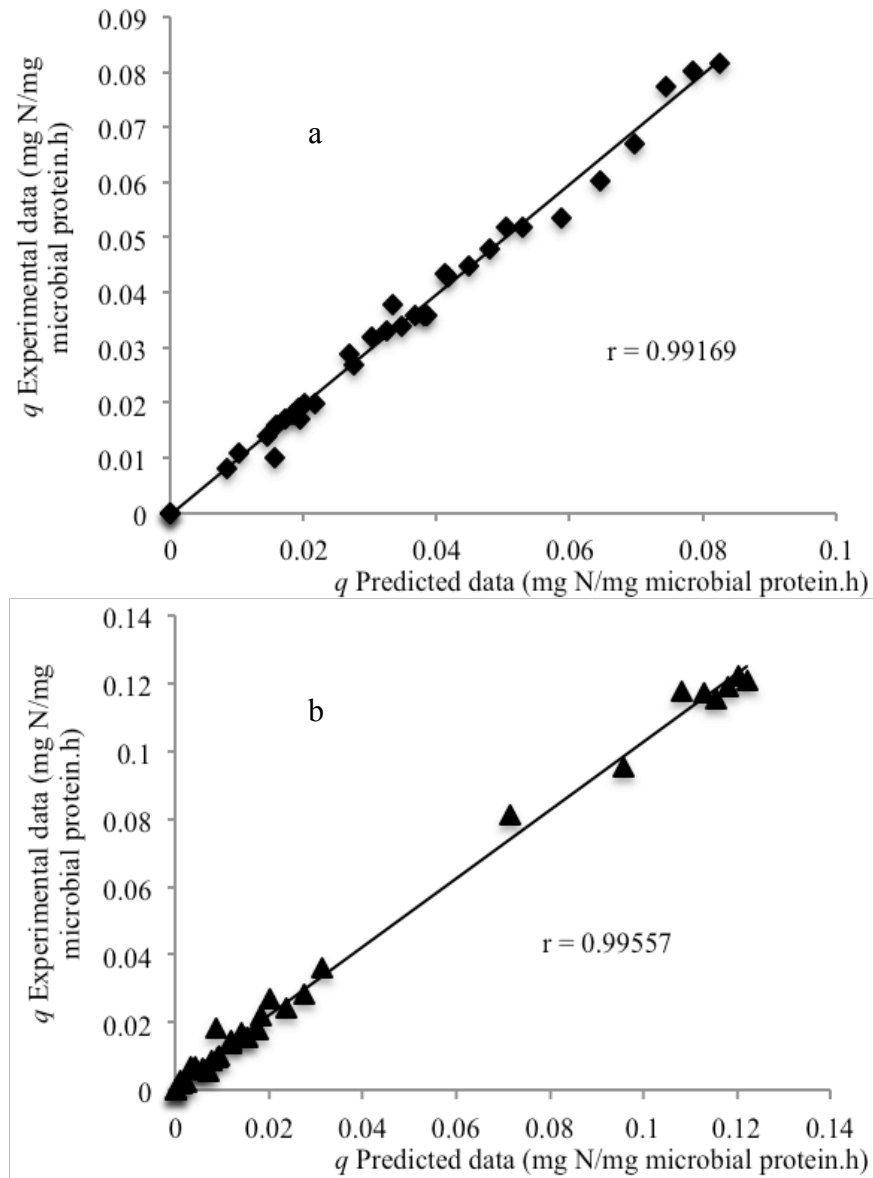
- Arch. Microbiol. 169: 225-230.
21. Texier A.-C., Gómez J. and Cuervo-López F. M. (2013). Inhibitory, toxic and structure effects of toluene on microbial consortia involved in wastewater treatment. *In: Toluene: Chemical Properties, Applications and Toxicology*, Ed. Marco C. Palminteri, Nova Science Publishers, Inc. New York.
  22. Vadivelu V.M., Yuan Z., Fux C. and Keller J. (2006a). The inhibitory effects of free nitrous acid on the energy generation and growth processes of an enriched *Nitrobacter* culture. *Environ. Sci. Technol.* 40: 4442-4448.
  23. Vadivelu V.M., Keller J. and Yuan Z. (2006b). Effect of free ammonia and free nitrous acid concentration on the anabolic and catabolic processes of an enriched *Nitrosomonas* culture. *Biotechnol. Bioeng.* 95: 830-839.
  24. Zhang L., De Schryver P., De Gussemé B., De Muynck W., Boon N., Verstraete W. (2008). Chemical and biological technologies for hydrogen sulfide emission control in sewer systems: a review. *Water Res.* 42: 1-12.
  25. Zhou Z., Xing C., An Y., Hu D., Qiao W. and Wang L. (2013). Inhibitory effects of sulfide on nitrifying biomass in the anaerobic–anoxic–aerobic wastewater treatment process. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 89: 214–219.



**Fig. 1.** Kinetic profiles of ammonium (a) and nitrite (b) oxidation processes in control batch cultures (no sulfide): ( $\blacklozenge$ )  $\text{NH}_4^+$ , ( $\blacktriangle$ )  $\text{NO}_2^-$  and ( $\square$ )  $\text{NO}_3^-$ .

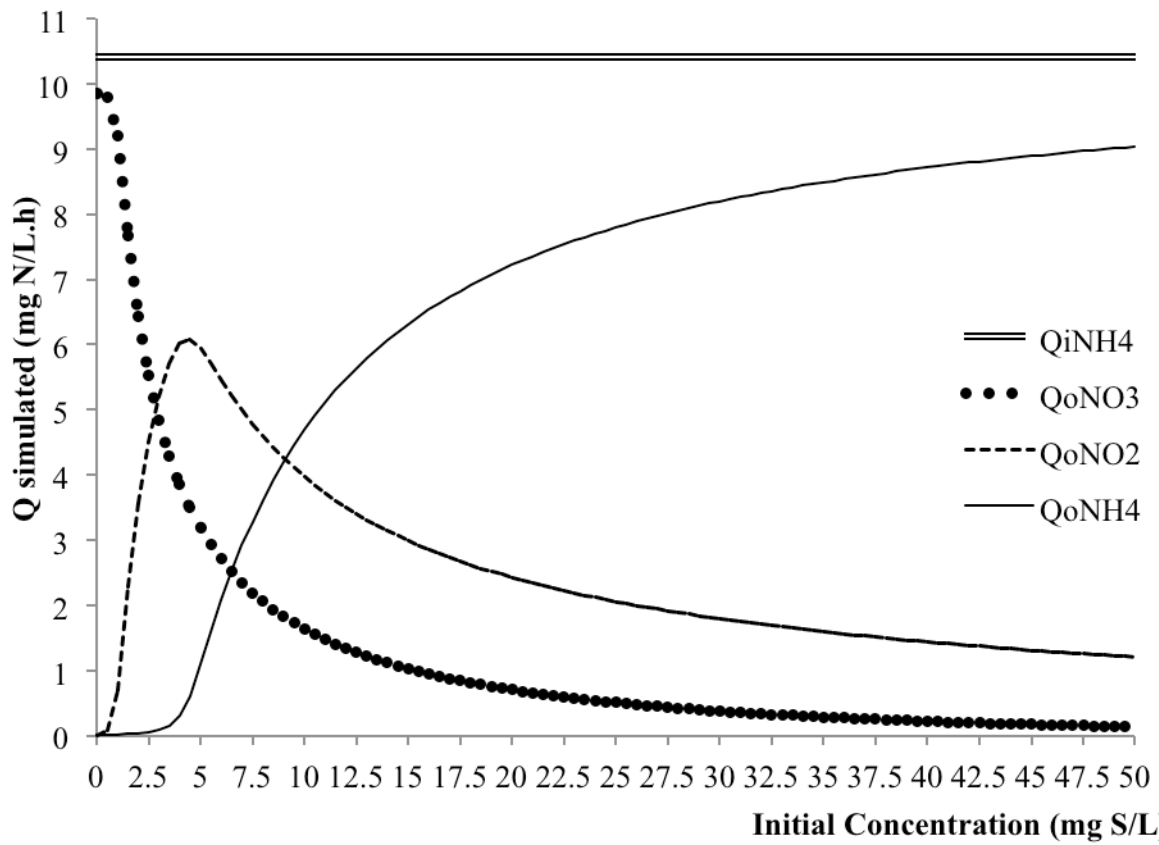


**Fig. 2.** Monod plots of ammonium (a) and nitrite (b) oxidation at different initial sulfide concentrations: 0 ( $\diamond$ ), 2.5 ( $\square$ ), 3.5 ( $\blacktriangle$ ) and 5.0 ( $\bullet$ ) mg  $\text{HS}^-$ -S/L. (—) The solid lines are the best-fit curves using Monod equation for the control assay without sulfide and the inhibition model for the assays added with sulfide.



**Fig. 3.** Linear regression of the experimental data with a model fit data for ammonium (a) and nitrite (b) oxidation.





**Fig. 4.** Simulation of nitrification in a continuous reactor fed with sulfide.  $Q_i$ : volumetric loading rate,  $Q_o$ : output volumetric rate.

**Table 1.** Monod kinetic constants for ammonium oxidation and nitrite oxidation processes. Values with the same capital letter, in the same column, are not significantly different ( $p < 0.021$ ) and values without letters ( $p > 0.32$ ) was obtained.

<b>Ammonium oxidation</b>		
<b>Concentration</b>	<b><math>K_{S,NH4}</math></b>	<b><math>q_{max,NH4}</math></b>
<b>(mg HS<sup>-</sup>-S/L)</b>	<b>(mg NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N/L)</b>	<b>(mg NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N/mg microbial protein.h)</b>
0	2.41 ± 0.11 <sup>(A)</sup>	0.086 ± 0.008
2.5 ± 0.5	2.33 ± 0.11 <sup>(A)</sup>	0.055 ± 0.005
3.5 ± 0.5	2.36 ± 0.08 <sup>(A)</sup>	0.040 ± 0.003
5.0 ± 0.5	2.30 ± 0.05 <sup>(A)</sup>	0.021 ± 0.002
<b>Nitrite oxidation</b>		
<b>Concentration</b>	<b><math>K_{S,NO2}</math></b>	<b><math>q_{max,NO2}</math></b>
<b>(mg HS<sup>-</sup>-S/L)</b>	<b>(mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N/L)</b>	<b>(mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N/mg microbial protein.h)</b>
0	0.74 ± 0.03	0.124 ± 0.001
2.5 ± 0.5	8.05 ± 0.73	0.037 ± 0.005
3.5 ± 0.5	15.21 ± 1.40	0.024 ± 0.006 <sup>(B)</sup>
5.0 ± 0.5	21.15 ± 1.10	0.022 ± 0.004 <sup>(B)</sup>