



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

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

Estudio fisiológico de la nitrificación en presencia de *p*-cresol

T E S I S

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

P R E S E N T A

I.B.I CARLOS DAVID SILVA LUNA

COMITE TUTORIAL

**Directora: Dra. Anne-Claire Texier
Asesor: Dr. Jorge Gómez Hernández
Asesor: Dr. Eric Houbron**

México D.F.

Marzo 2007

Esta tesis se llevó a cabo en el Laboratorio de Fisiología Microbiana W-103 del Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa, gracias al apoyo otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con el proyecto SER-2003-C02-43144/A1.

La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa está inscrita en el marco del Padrón Posgrado de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Iztapalapa, D.F. a 22 de Marzo de 2007

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

ESTUDIO FISIOLÓGICO DE LA NITRIFICACIÓN EN PRESENCIA DE *p*-CRESOL

Que presentó

I.B.I. Carlos David Silva Luna

Comité tutorial

Dra. Anne-Claire Texier
Directora, UAM-Iztapalapa

Dr. Jorge Gómez Hernández
Asesor, UAM-Iztapalapa

Dr. Eric Houbron Marty
Asesor, Universidad Veracruzana

H. Jurado

Presidenta: Dra. Florina Ramírez Vives
UAM-Iztapalapa

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

Vocal: Dr. Eric Houbron Marty
Universidad Veracruzana

Vocal: Dr. Frédéric Thalasso Siret
CINVESTAV-IPN

AGRADECIMIENTOS

Agradezco la dirección de la Dra. Anne-Claire Texier durante la escritura y evaluación de esta tesis, gracias por su invaluable apoyo, profesionalismo, dedicación y las horas de discusión y cuestionamiento.

Al Dr. Jorge Gómez y la Dra. Flor Cuervo por su aportación a este trabajo, por brindarme la oportunidad y apoyo para trabajar en el laboratorio de fisiología microbiana, gracias por las críticas constructivas y el tiempo invertido en mi formación.

Al jurado que revisó este trabajo por sus comentarios y sugerencias

A los compañeros y amigos del laboratorio de fisiología microbiana, Ricardo, Edna, Sergio, Arturo, Felipe, Citlalli, Emmanuel, gracias por su amistad, el buen ambiente de trabajo y por compartir sus ideas.

A los compañeros del edificio W y de generación que compartimos una etapa, gracias por su amistad y buenos consejos.

Dedicatorias:

A mis padres

*Por su apoyo incondicional y darme lo necesario
para enfrentar la vida*

A mis hermanos

Por su amistad y contagiarme con su alegría

A Sara

Gracias por tu amor y amistad

**Quien tiene voluntad de aprender
encuentra siempre un maestro**
Proverbio alemán

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	V
ABSTRACT	VII
PRÓLOGO	IX
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Eliminación biológica del nitrógeno.....	1
1.1.1 Desnitrificación.....	3
1.1.2 Nitrificación.....	3
1.1.2.1 Microbiología de la nitrificación.....	5
1.1.2.2 Bioquímica y fisiología de la nitrificación.....	5
1.2 Factores ambientales que afectan la nitrificación.....	9
1.2.1 Efecto de la concentración de oxígeno.....	9
1.2.2 Efecto del pH y la temperatura.....	10
1.2.3 Efecto de la materia orgánica.....	11
1.2.3.1 Efecto inhibitorio de compuestos fenólicos.....	14
1.2.3.2 Capacidad biotransformante de cultivos nitrificantes.....	17
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	19
2.1 Justificación.....	19
2.2 Objetivos.....	19
3. MATERIALES Y MÉTODOS	20
3.1 Reactor nitrificante en continuo y fuente de inóculo.....	21
3.2 Cultivo nitrificante en lote.....	21
3.3 Cultivo nitrificante en lote con <i>p</i> -cresol.....	22
3.4 Cultivo nitrificante en lote con nitrito inicial.....	22
3.5 Variables de respuesta del proceso nitrificante.....	22
3.6 Métodos analíticos.....	24
3.6.1 Cuantificación de amonio.....	25
3.6.2 Cuantificación de nitrito y nitrato.....	25
3.6.3 Cuantificación de carbono total e inorgánico.....	27
3.6.4 Cuantificación de ácidos grasos volátiles.....	28
3.6.5 Cuantificación de <i>p</i> -cresol.....	29
3.6.6 Cuantificación de proteína microbiana.....	30

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1 Reactor nitrificante en continuo.....	31
4.2 Cultivos en lote.....	32
4.2.1 Cultivo nitrificante sin <i>p</i> -cresol.....	32
4.2.2 Estudio cinético de la nitrificación en presencia de <i>p</i> -cresol.....	33
4.2.3 Oxidación del <i>p</i> -cresol durante la nitrificación.....	35
4.2.4 Nitrito como posible inhibidor de la nitrificación.....	39
5. CONCLUSIONES GENERALES y PERSPECTIVAS.....	44
6. REFERENCIAS.....	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Intervalos de pH y temperatura para el crecimiento de algunos géneros nitrificantes (Gómez <i>y col.</i> , 1995).....	10
Tabla 2. Inhibición de la nitrificación por compuestos fenólicos.....	14
Tabla 3. Composición del medio de cultivo alimentado al reactor nitrificante en continuo	20
Tabla 4. Concentraciones de los nutrientes del medio de cultivo.....	21
Tabla 5. Métodos analíticos.....	24
Tabla 6. Promedio de las pendientes y coeficientes de variación (r^2) de las curvas de calibración de los diferentes métodos analíticos.....	24
Tabla 7. Velocidades, eficiencia y rendimiento del cultivo nitrificante en lote sin <i>p</i> -cresol.....	33
Tabla 8. Comparación de las velocidades específicas de consumo de amonio (q_{NH_4}) y producción de nitrato (q_{NO_3}) en cultivos nitrificantes en lote con y sin <i>p</i> -cresol.....	34
Tabla 9. Eficiencias de consumo de amonio y rendimientos de producción de nitrato en cultivos en lote en ausencia de nitrito (control) y con diferentes concentraciones de nitrito inicial.....	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo global del nitrógeno (Richardson y Watmough, 1999).....	2
Figura 2. Oxidación del amonio por bacterias amonio oxidantes (Madigan <i>y col.</i> , 2003).....	6
Figura 3. Oxidación del nitrito a nitrato por bacterias nitrito oxidantes (Madigan <i>y col.</i> , 2003).....	8
Figura 4. Transformación del benceno (1) por un consorcio nitrificante (Zepeda <i>y col.</i> , 2003) y oxidación del <i>p</i> -cresol (2) por <i>Nitrosomonas europaea</i> (Keener y Arp, 1994).....	18
Figura 5. Curva de calibración de amonio.....	25
Figura 6. Curva estándar de nitrito por electroforesis capilar.....	26
Figura 7. Curva estándar de nitrato por electroforesis capilar.....	26
Figura 8. Curva estándar de nitrito y nitrato por HPLC.....	27
Figura 9. Curva estándar de carbono total.....	28
Figura 10. Curva estándar de carbono inorgánico.....	28
Figura 11. Curva estándar promedio de acetato, propionato y butirato.....	29
Figura 12. Curva estándar de <i>p</i> -cresol por HPLC.....	30
Figura 13. Curva estándar de proteína microbiana.....	31
Figura 14. Perfil de las velocidades del reactor nitrificante.....	31
Figura 15. Perfil del cultivo nitrificante en lote sin <i>p</i> -cresol.....	32
Figura 16. Consumo de amonio y producción de nitrito y nitrato en cultivos nitrificante con 25 mg <i>p</i> -cresol/L.....	33
Figura 17. Perfil de consumo de <i>p</i> -cresol y producción de <i>p</i> -hidroxibenzaldehído y <i>p</i> -hidroxibenzoato en un cultivo nitrificante en lote.....	36
Figura 18. Perfil nitrificante de los cultivos en lote control.....	39
Figura 19. Perfil de un cultivo nitrificante en lote con 25 mg N-NO ₂ /L.....	40
Figura 20. Perfil nitrificante de un cultivo en lote con 100 mg N-NO ₂ /L.....	41
Figura 21. Perfil nitrificante de un cultivo en lote con 200 mg N-NO ₂ /L.....	41

Silva Luna Carlos David (2007). Estudio fisiológico de la nitrificación en presencia de *p*-cresol. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. México.

RESUMEN

La contaminación del agua por nitrógeno se da principalmente por la presencia de amonio, el cual se puede encontrar en efluentes municipales e industriales. Una de las alternativas para eliminar el nitrógeno del agua es el sistema nitrificación-desnitrificación. La nitrificación es un proceso respiratorio quimiolitautotrófico donde el amoníaco es biológicamente oxidado a nitrito y posteriormente a nitrato. Está documentado que algunos compuestos aromáticos como los compuestos fenólicos pueden inhibir la nitrificación. Al respecto, existe poca información del efecto del *p*-cresol sobre el proceso nitrificante. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue evaluar en cultivos en lote el efecto inhibitorio del *p*-cresol sobre un proceso respiratorio nitrificante utilizando un lodo producido en estado estacionario así como determinar la capacidad de este consorcio para oxidar al *p*-cresol. El lodo utilizado para inocular los cultivos en lote fue obtenido de un reactor continuo de tanque agitado en régimen estacionario. En este reactor se obtuvo una eficiencia de consumo de amonio ($E\text{-NH}_4^+$) de $99.6\% \pm 0.9$ y un rendimiento de producción de nitrato ($Y\text{-NO}_3^-$) de 0.92 ± 0.1 . En los cultivos en lote sin *p*-cresol, el proceso nitrificante se llevó a cabo exitosamente y después de 15h, la $E\text{-NH}_4^+$ fue del $93\% \pm 1.2$ y el $Y\text{-NO}_3^-$ de 0.92 ± 0.04 , indicando que las condiciones experimentales utilizadas fueron las adecuadas. Las velocidades específicas de consumo de N-NH_4^+ y producción de N-NO_3^- fueron 0.066 ± 0.01 y 0.049 ± 0.01 mg N/mg proteína h, respectivamente. Al añadir *p*-cresol a los cultivos nitrificantes a una concentración inicial de 25 mg/L disminuyeron las velocidades específicas en un 30% para el consumo de amonio y 20% para la producción de nitrato. Los resultados ponen en evidencia el efecto inhibitorio del *p*-cresol sobre la nitrificación e indican que el *p*-cresol inhibió principalmente la actividad de las bacterias amonio oxidantes. Después de 15h, la $E\text{-NH}_4^+$ fue de $80.7\% \pm 8.5$ mientras que el $Y\text{-NO}_3^-$ fue de 0.91 ± 0.01 . Sin embargo después de 24h, la $E\text{-NH}_4^+$ aumentó a 88% y el $Y\text{-NO}_3^-$ se mantuvo a un valor de 0.90. Esto indica que la vía nitrificante fue afectada sólo en la velocidad enzimática, pero la eficiencia y el rendimiento nitrificante no fueron alterados. Por primera vez el *p*-hidroxibenzaldehído y *p*-hidroxibenzoato fueron identificados y cuantificados como intermediarios transitorios de la oxidación del *p*-cresol por un consorcio nitrificante. El *p*-cresol desapareció

completamente del medio transcurridas 4h, mientras que sus intermediarios fueron consumidos después de 12h. A este tiempo la concentración de carbono orgánico total fue muy baja, demostrando la ausencia de materia orgánica en el cultivo. Se determinó un rendimiento de producción de biomasa de 0.3. El rendimiento de producción de biomasa junto con la mínima concentración de carbono orgánico total al final del proceso nitrificante indicaron que el *p*-cresol y sus intermediarios fueron principalmente oxidados de manera desasimilativa, sugiriendo una mineralización de los compuestos carbonados. En la literatura se reportan evidencias de la capacidad de la enzima amonio monooxigenasa (AMO) para oxidar una amplia variedad de sustratos, como hidrocarburos aromáticos, causando la acumulación de productos más oxidados que los sustratos originales en el medio. Con la finalidad de evaluar la participación de la enzima amonio monooxigenasa en la ruta de oxidación del *p*-cresol se realizaron cultivos nitrificantes en lote en presencia de nitrito como inhibidor selectivo de la enzima AMO. La eficiencia en el consumo de amonio se mantuvo cercana al 100% en todos los cultivos expuestos a nitrito inicial (25, 100 y 200 mg N-NO₂⁻/L), lo cual indicó que el nitrito no inhibió totalmente la enzima amonio monooxigenasa. Por el contrario, el nitrito tuvo un efecto en el rendimiento de producción de nitrato que disminuyó gradualmente conforme aumentó la concentración de nitrito en los cultivos.

ABSTRACT

The water pollution by nitrogen occurs mainly by the ammonium presence which can be found in municipal and industrial effluents. One alternative to eliminate the nitrogen from the water is the nitrification-denitrification system. The nitrification is a quimiolitotrofica respiratory process where the ammonia is biologically oxidized to nitrite then nitrite is further oxidized to nitrate. There is evidence that some aromatic compounds as the phenolic compounds can inhibit the nitrification. However, there is little information about the inhibitory effect of *p*-cresol on the nitrifying process. By the previous thing, the aim of this study was to evaluate in batch cultures the role of *p*-cresol on a nitrifying sludge physiologically stable produced in steady-state and the ability to the consortium to oxidize *p*-cresol. The nitrifying sludge used for inoculating batch cultures was obtained from a continuous stirred nitrifying reactor, efficiency of ammonium consumption ($E\text{-NH}_4^+$) was $99.6\% \pm 0.9$ and the nitrifying yield ($Y\text{-NO}_3^-$) was 0.92 ± 0.1 . In control batch cultures without *p*-cresol the nitrification process proceeded successfully and after 15 h, $E\text{-NH}_4^+$ was $93\% \pm 0.2$ and the $Y\text{-NO}_3^-$ was 0.92 ± 0.4 showing that the experimental conditions used were suitable. Specific rates of $\text{NH}_4^+\text{-N}$ consumption and $\text{NO}_3^-\text{-N}$ production were 0.07 ± 0.01 and 0.05 ± 0.01 mg N/mg microbial protein h respectively. *p*-Cresol at 25 mg/L inhibited the nitrification process by decreasing the specific rates of 29% for ammonium consumption and 20% for nitrate production. Results indicated that the *p*-cresol inhibited mainly the activity of the ammonia oxidizing bacteria. After 15 h, $E\text{-NH}_4^+$ was $80.7 \pm 8.5\%$ while $Y\text{-NO}_3^-$ kept high as 0.90. Thus the nitrifying pathway was affected only on the enzymatic rate, but the consumption efficiency and the nitrifying yield were not altered. For the first time the *p*-hidroxibenzaldehide and *p*-hidroxibenzoate were identified and measured by HPLC as transitory intermediates from *p*-cresol oxidation by nitrifying sludge. *p*-Cresol disappeared completely from the medium after 4 h and its intermediaries after 12 h. After this time, the total organic carbon concentration was negligible, showing the absence of organic matter in the culture. The biomass production yield was found to be of 0.3 mg protein-C/mg C consumed. The low yield of biomass production along with the minimum total organic carbon concentration at the end of the nitrifying process indicated that *p*-cresol and their intermediaries were mainly oxidized through a dissimilative way, suggesting a mineralization of organic compounds. Literature reported results about the capacity of the enzyme ammonia monooxygenase (AMO) to oxidize organic substrates as aromatic hydrocarbons, providing the accumulation of

oxidation products in the medium. With the purpose of finding out the participation of the ammonia monooxygenase enzyme in the oxidation of *p*-cresol, nitrifying batch cultures were conducted in the presence of nitrite like selective inhibitor of the AMO enzyme. The E-NH₄⁺ kept near 100% in all the cultures exposed to nitrite, which indicated that the nitrite did not totally inhibit the AMO enzyme. On the contrary, the nitrite had an effect in the yield of nitrate production that diminished gradually in agreement increased the concentration of nitrite in the culture.

PRÓLOGO

En México, de acuerdo con la Comisión Nacional del Agua, en el año 2003 se produjeron $258 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ de aguas residuales, de las cuales sólo el 10.6% se procesaron en los sistemas de tratamiento (Estadísticas del agua en México, 2005; Monroy *y col.*, 2000). Uno de los giros industriales con mayor descarga contaminante a los cuerpos receptores es la industria petrolera con $11.4 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ de aguas residuales. La composición química de estos efluentes tiene como característica la presencia de nitrógeno y materia orgánica. La contaminación por nitrógeno en los efluentes de la industria petrolera se da por la presencia de amonio y se puede encontrar al fenol y sus derivados como parte de la materia orgánica contaminante (Olmos *y col.*, 2004). La refinación del petróleo genera efluentes como las aguas amargas, que se originan por la destilación de arrastre de vapor o en proceso de rompimiento térmico de hidrocarburos (Almendariz, 2005). Olmos *y col.* (2004) por ejemplo, encontraron concentraciones de $710 \pm 590 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{L}$, $60 \pm 10 \text{ mg } p\text{-cresol}/\text{L}$ y $20 \pm 5 \text{ mg } o\text{-cresol}/\text{L}$ en los efluentes de la refinería de Tula, México. El amonio puede causar eutrofización y llegar a asfixiar la fauna acuática debido a que disminuye la concentración de oxígeno disuelto en el agua (Cervantes *y col.*, 2000). La Norma Oficial Mexicana (NOM-001-ECOL-1996) establece un límite máximo permisible de $15 \text{ mg N}_{\text{Total}}/\text{L}$ en los cuerpos receptores de agua. Los compuestos fenólicos fueron catalogados como peligrosos para la salud humana y pueden causar efectos de toxicidad y bioacumulación en organismos vegetales y animales (U.S. EPA, 1992; Davi y Gnudi, 1999). Beber agua contaminada por cresoles que conduzca a superar la ingesta diaria de 0.17 mg/kg peso corporal, provoca quemaduras en boca y esófago, dolores abdominales y vómito. La ingesta de cresoles afecta el hígado, el corazón y el sistema nervioso central. La exposición cutánea puede provocar quemaduras en la piel y toxicidad sistémica (Papa, 1998). Se ha informado que conforme se incrementan los grupos metilo unidos al anillo aromático, aumenta la toxicidad de los compuestos fenólicos (Kumaran y Paruchuri, 1997).

Por tales motivos se han desarrollado tecnologías capaces de eliminar o transformar estos compuestos en otros menos tóxicos. Se han realizado estudios para optimizar los procesos de eliminación de contaminantes en las aguas residuales y dependiendo del tipo de compuesto, su eliminación es más o menos complicada. Las investigaciones se han enfocado en dos tipos de procesos: biológico y fisicoquímico.

El proceso fisicoquímico más empleado para eliminar nitrógeno amoniacal suele hacerse por medio del arrastre de NH_3 . El sistema involucra un ajuste del pH a valores mayores que 10 y al mismo tiempo una fuerte corriente de aire bajo agitación (Metcalf y Eddy, 1985; Gómez y col., 1995). Otro proceso utilizado es el empleo de resinas de intercambio iónico. En general los tratamientos fisicoquímicos presentan eficiencias de eliminación cercanas al 100%, pero con el inconveniente de costos excesivos de operación debido al gasto energético y de mantenimiento (Ramalho, 1991). Además, pueden ocasionar contaminación colateral durante su aplicación, puesto que el contaminante sólo es trasladado de un medio a otro.

Por otro lado, el tratamiento biológico es recomendado como alternativa a los procesos fisicoquímicos, al generar costos menores de operación y presentar altas eficiencias de eliminación de nitrógeno. La eliminación del nitrógeno por vía biológica comprende el acoplamiento de dos procesos, la nitrificación y la desnitrificación. La nitrificación es un proceso respiratorio aerobio litoautotrófico donde el nitrógeno amoniacal es oxidado biológicamente a nitrito y posteriormente a nitrato por la acción de dos tipos de bacterias: amonio oxidantes y nitrito oxidantes (Prosser, 1989; Bock y col., 1991). La nitrificación ha sido estudiada tanto en cultivos axénicos (*Nitrosomonas europaea* y *Nitrobacter winogradsky* principalmente) como en consorcios nitrificantes. La desnitrificación es un proceso respiratorio anóxico llevado a cabo por bacterias heterótrofas de respiración facultativa donde el nitrato es reducido a través de varias reacciones enzimáticas hasta nitrógeno molecular (Payne, 1973). La nitrificación y desnitrificación permiten transformar el amonio disuelto en el agua hasta nitrógeno molecular, mediante la unión de dos reactores en línea, pero el proceso no es simple, dadas las diferencias fisiológicas entre ambos procesos (Dalmacija y col., 1986).

En cuanto a la eliminación de cresoles por métodos fisicoquímicos, se puede llevar a cabo por recuperación, incineración, adsorción por carbón activado y oxidación química. Los trabajos de eliminación de cresoles por vía biológica se han llevado a cabo principalmente con bacterias heterótrofas en procesos aerobios y anaerobios. Se ha estudiado la eliminación de cresoles por consorcios microbianos en condiciones óxicas, determinando las velocidades de consumo de cada compuesto fenólico en forma individual (Acuña-Arguelles y col., 2003). Por otra parte, se ha estudiado la eliminación de *p*-cresol en cultivos axénicos y consorcios microbianos por desnitrificación y metanogénesis (Bossert y Young, 1986; Häggblom y col., 1990; Khowry y col., 1992).

Se han sugerido las rutas de oxidación del *p*-cresol en procesos aerobios como anaerobios. Por ejemplo, en *Pseudomonas putida*, se propuso una vía metabólica en donde participan varias oxigenasas (Hopper y Taylor, 1975).

A diferencia de estas investigaciones, son insuficientes los estudios realizados sobre el efecto de los compuestos fenólicos en la nitrificación, la cual es ampliamente utilizada en la primera etapa de eliminación de nitrógeno por vía biológica. De entre los escasos estudios del efecto de cresoles en la nitrificación, algunos se han realizado en consorcios microbianos. Stafford (1974) reportó que una concentración de 5.6 mg/L de fenol y 4.4 mg/L de *o*-cresol inhibieron en un 75% la amonio oxidación, mientras que Dyreborg y Arvin (1995) observaron que una concentración de 3.7 mg/L de fenol y 1.3 mg/L de *o*-cresol provocaron un 100% de inhibición en el proceso amonio oxidante. Sin embargo, aunque se sabe que el *p*-cresol disminuye el rendimiento de producción de nitrato (Texier y Gómez, 2002), sobre el efecto particular del *p*-cresol en consorcios nitrificantes no hay mucha información en la literatura y se han omitido los datos cinéticos que permitan entender mejor el efecto inhibitorio del *p*-cresol en el proceso respiratorio nitrificante. Texier y Gómez (2002) observaron la desaparición del *p*-cresol en cultivos nitrificantes así como la aparición de intermediarios carbonados que aún no han sido identificados sugiriendo la capacidad del consorcio nitrificante en oxidar el *p*-cresol. Zepeda *y col.* (2003) observaron la oxidación del benceno a fenol y finalmente a acetato en cultivos nitrificantes en lote. Los autores sugirieron una participación conjunta de las microfloras nitrificantes y organo-heterótrofas.

Con base en lo anterior, el objetivo de este trabajo fue contribuir a un mejor entendimiento del proceso respiratorio de la nitrificación en presencia de *p*-cresol, haciendo énfasis en los estudios cinéticos de la nitrificación y la oxidación del *p*-cresol.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Eliminación biológica del nitrógeno

Conforme se agudiza el problema de la contaminación del agua, se incrementan las investigaciones para desarrollar procesos eficientes y de bajo costo que permitan eliminar los contaminantes de las aguas residuales y cumplir con los requerimientos de descarga permitidos. Para diseñar y operar de manera eficiente una planta de tratamiento de aguas residuales, es necesario entre otros aspectos entender la fisiología de los microorganismos involucrados. En relación con esto las investigaciones a nivel básico son fundamentales para entender y optimizar procesos ya establecidos o desarrollar nuevos sistemas. Los compuestos nitrogenados solubles en el agua son de los contaminantes primarios del agua, por causa del incremento en las actividades agrícolas e industriales que han aumentado casi al doble la concentración de nitrógeno fijado anualmente en la biosfera (Vitousek *y col.*, 1997). Debido a la amplia diversidad de aguas residuales que contienen nitrógeno, se han estudiado diferentes procesos biológicos, como por ejemplo: la nitrificación parcial (oxidación parcial del amonio a nitrito), el proceso ANNAMOX (desnitrificación del nitrito con amonio como donador de electrones) y el proceso CANON (combinación de una nitrificación parcial con un proceso ANNAMOX en un único reactor aireado) (Schmidt *y col.*, 2003). Cabe mencionar que en algunos de los procesos anteriores, los mecanismos por los que se llevan a cabo no están del todo entendidos. A pesar de las alternativas en la eliminación biológica del nitrógeno, el sistema convencional con la ejecución secuenciada de la nitrificación y desnitrificación es un procedimiento ya establecido. Ya que su nivel de operación se ha utilizado en plantas de tratamiento a gran escala, mientras que los procesos más recientes se han operado únicamente a nivel planta piloto o laboratorio. El sistema nitrificante-desnitrificante ha constituido una forma efectiva, sustentable y económicamente factible de eliminar biológicamente el nitrógeno de aguas residuales (Cervantes *y col.*, 2000). Aunque se han logrado avances en la comprensión del proceso nitrificante, faltan estudios fisiológicos que ayuden a caracterizar los lodos activados que se utilizan en las plantas de tratamiento.

La nitrificación y desnitrificación se llevan a cabo en la naturaleza y forman parte del ciclo terrestre del nitrógeno (Figura 1). La principal forma de nitrógeno en la tierra es el N_2 y las bacterias fijadoras de éste pueden utilizarlo como fuente de nitrógeno. El amoníaco que se produce por la fijación de nitrógeno o de los compuestos orgánicos

nitrogenados, es asimilado en forma de materia orgánica (aminoácidos y proteínas) o bien oxidado a nitrato por las bacterias nitrificantes. En su ambiente natural, las bacterias nitrificantes son el único grupo microbiano que produce cantidades altas de nitrito y nitrato a partir del amoniaco. Las pérdidas de nitrógeno en la biósfera son el resultado de la desnitrificación, en la que el nitrato se reduce nuevamente a N_2 (Madigan *y col.*, 2003).

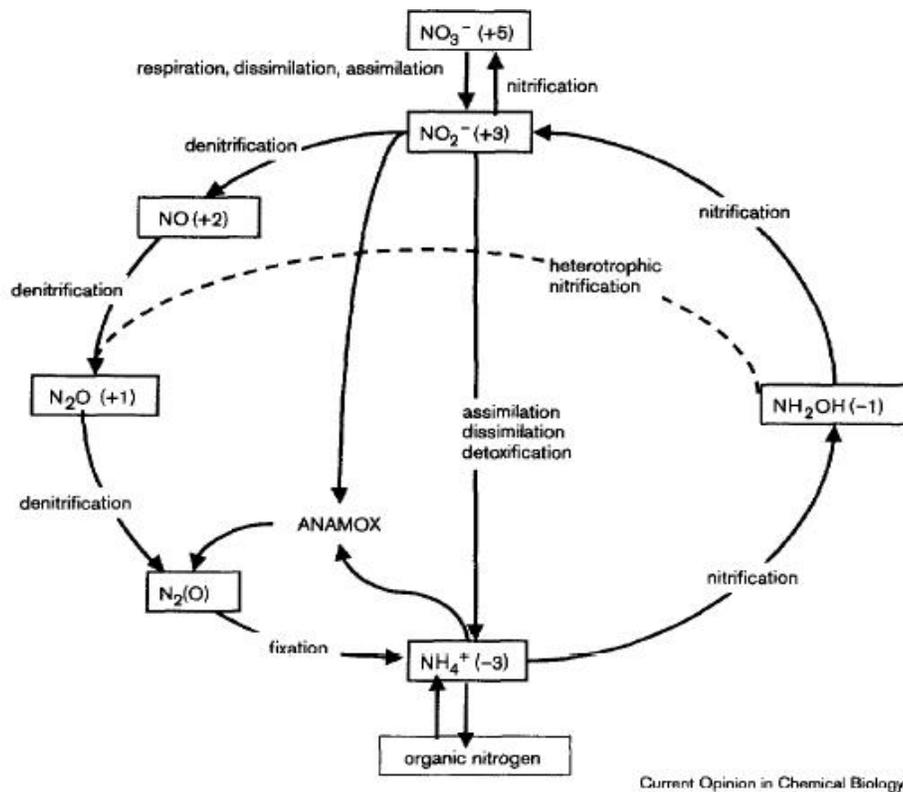


Figura 1. Ciclo global del nitrógeno (Richardson y Watmough, 1999).

El ciclo del nitrógeno mantiene una eficiente recirculación del nitrógeno en la naturaleza. Si en alguna de sus etapas no es lo suficientemente rápido para transformar el amonio, este puede alcanzar concentraciones muy altas, teniendo como consecuencia la erosión de los suelos y la muerte de flora y fauna en ecosistemas acuosos. Por lo tanto, a fin de disminuir el impacto ambiental del amonio en los ecosistemas, es importante identificar algunas de las etapas limitantes del ciclo del nitrógeno, en particular la nitrificación y desnitrificación.

1.1.1 Desnitrificación

La desnitrificación es un proceso respiratorio anóxico llevado a cabo por microorganismos organo-heterótrofos y litótrofos de respiración facultativa e involucra la reducción de las formas oxidadas del nitrógeno, NO_2^- y NO_3^- a N_2 como producto final (Payne, 1973). En el proceso respiratorio, la reducción de nitrato a N_2 está acoplada con la oxidación de materia orgánica o inorgánica. La desnitrificación heterotrófica ocurre cuando un compuesto orgánico sirve como fuente de carbono y energía mientras que la litoautotrófica cuando el carbono inorgánico es utilizado para síntesis celular y un compuesto inorgánico como fuente de energía (Soares, 2000). En la desnitrificación están involucradas una serie de enzimas que catalizan las reacciones de reducción. En la primera reducción de NO_3^- a NO_2^- , la enzima implicada es la nitrato reductasa. En la segunda etapa, el NO_2^- es reducido a NO por la nitrito reductasa. La reducción de NO a N_2O se realiza por la óxido nítrico reductasa. Finalmente la nitroso reductasa cataliza la reducción de N_2O a N_2 (Hochstein y Tomlinson, 1988). Estas enzimas han sido localizadas en la membrana citoplasmática y en el periplasma. La desnitrificación está condicionada al ambiente, y entre los factores externos que influyen en la desnitrificación se conoce a: la concentración de oxígeno en el medio, carbono orgánico (tipo y concentración) como fuente de electrones, óxidos de nitrógeno, pH y temperatura. El nitrato que proviene del proceso nitrificante puede ser reducido por la desnitrificación a N_2 en los sistemas de eliminación biológica de nitrógeno. Algunos efluentes industriales contienen hidrocarburos aromáticos, por lo que se han realizado estudios de la capacidad de las bacterias desnitrificantes para oxidar estos compuestos. Por ejemplo, la eliminación de compuestos fenólicos bajo condiciones desnitrificantes ha sido ampliamente estudiada (Hägglom *y col.*, 1990; Khoury *y col.*, 1992). Se reportó la capacidad de una cepa desnitrificante para metabolizar al *p*-cresol, aislando una de las enzimas que participan en la oxidación (Bossert y Young 1986; Hopper *y col.*, 1991).

1.1.2 Nitrificación

Se define la nitrificación como un proceso respiratorio aerobio donde se lleva a cabo la oxidación del amonio hasta nitrato vía nitrito mediante dos grupos de bacterias quimiolitautótrofas filogenéticamente no relacionadas, las amonio oxidantes y nitrito oxidantes que pertenecen a la familia *Nitrobacteraceae* (Prosser, 1989). Las bacterias nitrificantes son quimiolitautótrofas obligadas que utilizan como donador de

electrones al amoníaco o nitrito y pueden fijar el CO_2 vía el ciclo de Calvin para utilizarlo como fuente de carbono para biosíntesis celular. La nitrificación se realiza en dos etapas sucesivas. En una primera etapa de la ruta metabólica nitrificante, el amoníaco (NH_3) se oxida a nitrito (NO_2^-), aeróbicamente por acción de las bacterias amonio oxidantes. En la segunda etapa, las bacterias nitrito oxidantes, oxidan al nitrito (NO_2^-) a nitrato (NO_3^-).

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

La aplicación de la nitrificación autotrófica en la eliminación de nitrógeno de las aguas residuales ha sido ampliamente estudiada. Frecuentemente se asume que al ser las bacterias nitrificantes lentas en su crecimiento, se convierten en el "cuello de botella" del proceso de tratamiento de las aguas residuales. Considerando lo anterior, se han desarrollado diversos diseños de biorreactores para llevar a cabo la nitrificación a una mayor velocidad aumentando la densidad celular. Otro aspecto que a menudo no se considera en los sistemas de tratamiento de aguas es la actividad metabólica del lodo nitrificante. Al tomar en cuenta estudios del tipo fisiológico del proceso respiratorio, se podrían prevenir malos funcionamientos o desviaciones del proceso que conducirían a tecnologías no sustentables. No obstante, aún existen limitaciones para tratar aguas residuales de origen industrial, particularmente aquellas con una carga elevada de nitrógeno (Gómez y col., 1995).

1.1.2.1. Microbiología de la nitrificación

Las bacterias nitrificantes se dividen en dos grupos. En el primer grupo se encuentran las bacterias amonio oxidantes que cuentan con los siguientes géneros: *Nitrosomonas*, *Nitrospira*, *Nitrosolobus*, *Nitrosococcus* y *Nitrosovibrio*. Las bacterias amonio oxidantes están ampliamente distribuidas en varios ecosistemas. Especies de diferentes géneros se han aislado en suelos, ríos, lagos y océanos. El género más estudiado es *Nitrosomonas*. La pared celular de estos microorganismos es típicamente gram negativa, y presentan diversas morfologías tales como: cocos, bacilos y espirales. Presentan un mayor crecimiento en intervalos de temperatura de 25 a 30°C, a valores de pH entre 7.5 y 8.0 y con una concentración de sustrato de 36 a 900 mg NH₄⁺/L (Bock y col., 1991). En el caso de las bacterias nitrito oxidantes, se han encontrado los siguientes géneros gram negativos: *Nitrobacter*, *Nitrospina*, *Nitrococcus* y *Nitrospira*, que presentan diversas morfologías tales como: cocos y bacilos. Algunos géneros nitrito oxidantes están restringidos a ambientes marinos, mientras que *Nitrobacter* ha sido aislado de suelos, rocas y ríos (Bock y col., 1991). El género *Nitrobacter* es el más estudiado. Las bacterias nitrito oxidantes tienen su mejor actividad en la zona de temperatura mesófila y a valores de pH de neutro a alcalino y no presentan actividad ni crecimiento a pH ácido (Prosser, 1989).

1.1.2.2 Bioquímica y fisiología de la nitrificación

La oxidación de NH₃ a NO₂⁻ se lleva a cabo en dos etapas como se muestra en la Figura 2. En la primera, la enzima involucrada es la amonio monooxigenasa (AMO), la cual cataliza la reacción de oxidación de amoniaco a hidroxilamina (NH₂OH). La reacción se muestra en la ecuación (1).



La AMO aún no ha podido ser purificada conservando su actividad (Suzuki, 1974; Arp y col., 2002; Arp y Stein, 2003) y la mayoría de los estudios sobre esta enzima se han llevado a cabo en *Nitrosomonas europaea*. Se cree que la AMO está localizada en la membrana citoplasmática (McCarty, 1999). La AMO está constituida por tres polipéptidos: AmoA, AmoB y AmoC. La evidencia de la existencia de estos tres polipéptidos es bioquímica, genética y a través de la analogía con la metano monooxigenasa (MMO) (Arp y Stein, 2003). Células de *N. europaea* fueron incubadas con acetileno marcado (¹⁴C₂H₂), perdiendo la AMO su actividad y se identificó un

polipéptido de 27kDa (AmoA) como el sitio de unión con el $^{14}\text{C}_2\text{H}_2$ (Hyman y Wood, 1985). Se cree que el polipéptido AmoA contiene el sitio catalítico de la oxidación del NH_3 . El segundo polipéptido AmoB (38kDa) fue copurificado simultáneamente con AmoA por McTavish *y col.* (1993) y estos autores indicaron que los polipéptidos AmoA y AmoB son codificados por los genes *amoA* y *amoB*. La evidencia de la existencia del tercer polipéptido AmoC es indirecta ya que los genes que codifican al AmoA, AmoB y AmoC son cotranscritos en un único ARNm (Arp *y col.*, 2002). La AMO parece ser catalítica, estructural y genéticamente similar a la MMO de las bacterias metanotróficas. Muchos de los avances en la comprensión de la función y estructura de la AMO se han realizado en analogía con la MMO purificada y caracterizada (Bedard y Knowles, 1989). Se ha sugerido que el cobre es un cofactor de la AMO con base en dos argumentos: la inhibición de la AMO por queladores selectivos del cobre y la adición de cobre en extractos libres de células activaron la AMO (Arp *y col.*, 2002). Posteriormente, la hidroxilamina oxidoreductasa (HAO) cataliza la oxidación de la hidroxilamina a nitrito como se muestra en la ecuación (2).

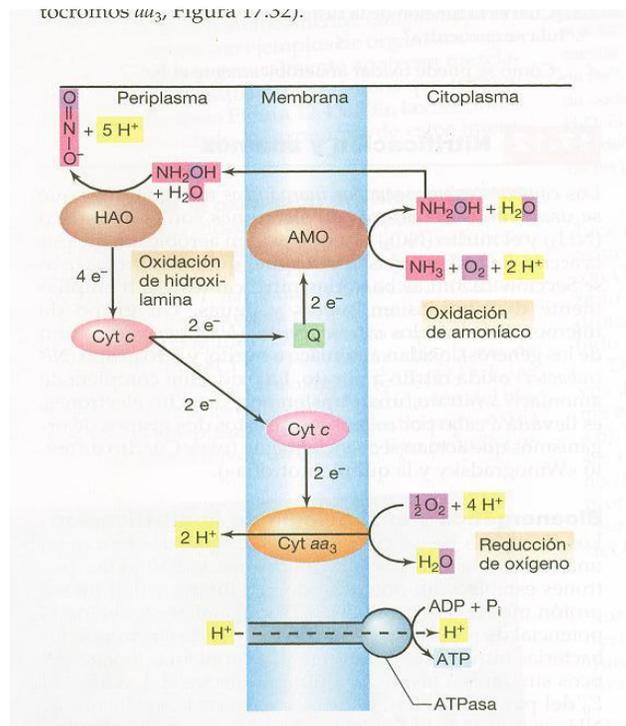
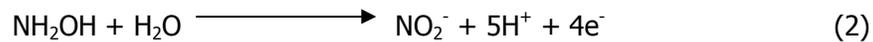
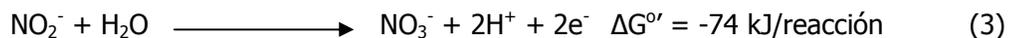


Figura 2. Oxidación del amonio por bacterias amonio oxidantes (Madigan *y col.*, 2003).

Esta enzima se encuentra localizada en el periplasma, que es la región entre la capa externa de la membrana citoplasmática y la superficie interna de la capa de liposacáridos en las bacterias gram negativas. La HAO contiene ocho subunidades, la octava subunidad llamada P460 es el sitio activo de oxidación de la NH_2OH (Arp y col., 2002). Aunque la HAO ha sido purificada y homogenizada a partir de cultivos de *N. europaea*, el ciclo catalítico completo parece no estar claro aún (Hooper y Terry, 1977; Hooper y col., 1997). Una cuestión crítica es si la oxidación de la NH_2OH involucra al NO como intermediario. Una evidencia a favor de la formación de NO durante la oxidación de la NH_2OH es la producción de NO y N_2O observada en cultivos de *N. europaea* por Hynes y Knowles (1982).

El cambio de energía libre (ΔG°) para la reacción global de oxidación de NH_3 a NO_2^- es de -275 kJ/reacción (Madigan y col., 2003). Se puede pronosticar dado el valor bajo de ΔG° que el crecimiento de las bacterias amonio oxidantes será también muy bajo, considerando que para fijar una mol de CO_2 se necesitan 3 moles de ATP, por lo que está claro que la formación de nuevas células estará limitada por la disponibilidad energética (Gómez y col., 1995). Dos de los cuatro electrones generados por la oxidación de la hidroxilamina regresan a la AMO y se usan para la oxidación de otras moléculas de amoníaco, mientras que los dos electrones restantes entran en la cadena respiratoria y son usados como apoyo en la síntesis de ATP vía fosforilación oxidativa así como en la fijación de CO_2 (Arp y Stein, 2003). La oxidación de la NH_2OH a NO_2^- es el paso donde las bacterias amonio oxidantes obtienen energía.

La oxidación de nitrito a nitrato es catalizada por acción de un complejo enzimático llamado nitrito óxido reductasa (NOR) que se encuentra en la membrana (Bock y col., 1991) (Figura 3). La NOR está formada por los citocromos c y a, una quinona y una deshidrogenasa dependiente del NADH (Aleem y Sewell, 1981). La reacción se muestra en la ecuación (3).



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).

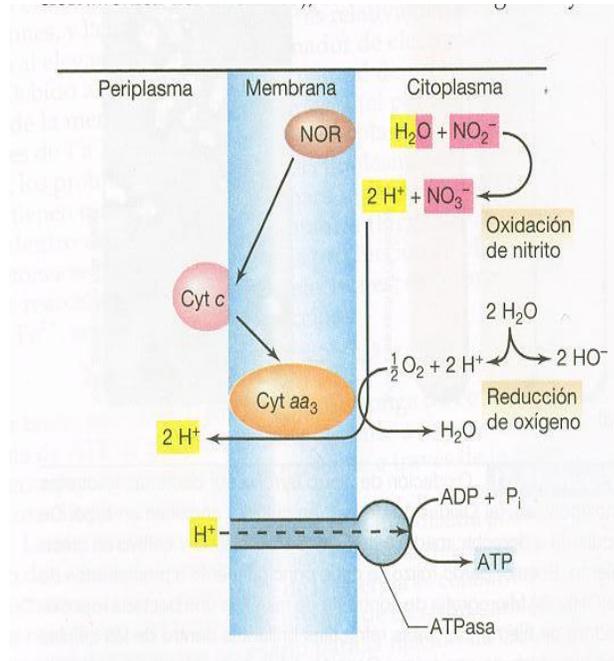
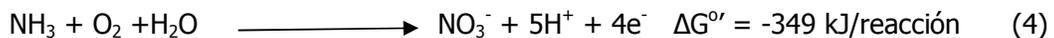


Figura 3. Oxidación de nitrito a nitrato por bacterias nitrito oxidantes. (Madigan y col., 2003).

Como consecuencia de que el ΔG° de -74 kJ/reacción (Madigan y col., 2003) es menor en la nitrito oxidación que en la amonio oxidación, es de esperarse que el crecimiento bacteriano sea más bajo aún. Con estos datos podríamos pensar que el "cuello de botella" para la nitrificación es la nitrito oxidación.

Balanceando las dos ecuaciones anteriores podemos obtener una ecuación general para el proceso nitrificante, como se muestra en la ecuación (4).



1.2 Factores ambientales que afectan la nitrificación

La nitrificación como todo proceso biológico, está condicionada al ambiente que la rodea y se ve afectada por factores como la concentración de oxígeno disuelto en el medio, el pH, la temperatura y la presencia de materia orgánica. Considerando lo anterior se puede establecer que las enzimas de la secuencia respiratoria nitrificante pueden verse inhibidas por el efecto de las condiciones ambientales mencionadas. Además en un proceso nitrificante, otras variables, deben ser controladas en el cultivo. Por ejemplo: la relación C/N, que en general puede orientar el proceso a ser asimilativo o desasimilativo. De esta manera, una C/N baja limitará la fuente de carbono ocasionando una baja producción de biomasa. Sin embargo, en el caso de la nitrificación, al formularse el medio de cultivo con base en la C/N se debe considerar

que el proceso cuenta con un bajo ΔG° en la oxidación de NH_3 a NO_3^- por lo que no es necesario agregar una concentración alta de carbono al medio, pues la producción de biomasa siempre será baja. También se debe prestar atención a los requerimientos nutricionales, por ejemplo, la presencia de hierro y cobre en el medio es indispensable para que se lleve a cabo la nitrificación, ya que existe información que indicó que la enzima AMO contiene cobre (Hooper y Terry, 1973; Bedard y Knowles, 1989) así como hierro en su centro activo (Zahn *y col.*, 1996).

1.2.1 Efecto de la concentración de oxígeno

La nitrificación se describe clásicamente como un proceso aerobio que requiere de oxígeno molecular para poder obtener energía para su crecimiento (Prosser, 1989). El oxígeno en altas concentraciones es inhibitorio y se cree que el mecanismo de inhibición está relacionado con la formación de radicales libres (Gunderson, 1966). Otros autores han reportado que cultivos de *Nitrosomonas* sp bajo condiciones limitantes de oxígeno, presentaron una marcada disminución en la velocidad de producción de nitrito y se observó una acumulación significativa de N_2O (Goreau *y col.*, 1980). Existen reportes donde se sugiere que la nitrito oxidación puede verse más afectada que la amonio oxidación por la baja disponibilidad de oxígeno. Por ejemplo, se ha señalado que en un cultivo mixto de *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*, la amonio oxidación disminuye la velocidad por debajo de $1.0 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$, mientras que la nitrito oxidación reduce la velocidad por debajo de $4.0 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ (Prosser, 1989). Hanaki *y col.* (1990a) observaron en lodos activados, que la nitrito oxidación se vio fuertemente inhibida con concentraciones de 0.5 mg/L de oxígeno disuelto, cuando la misma concentración no causó efecto en la amonio oxidación. De acuerdo con Hanaki *y col.* (1990a), esta diferencia podría atribuirse a que la baja concentración de oxígeno disuelto, aumentó el rendimiento de producción de biomasa de las bacterias amonio oxidantes, lo cual compenso la reducción en la velocidad específica de oxidación de amonio. Las bacterias nitrito oxidantes no presentaron la misma particularidad para compensar la disminución en la velocidad específica de consumo de nitrito. Oyanedel-Craver *y col.* (2005) también señalaron que bajas concentraciones de oxígeno disuelto afectan la nitrificación reduciendo las velocidades de consumo de sustrato y acumulando nitrito. El conocimiento del efecto del oxígeno en la nitrificación tiene una importancia económica, ya que la aireación de los lodos activados es uno de los gastos

de operación más onerosos en las plantas de tratamiento de aguas residuales (Pricnic *y col.*, 1998).

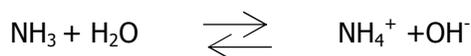
1.2.2. Efecto del pH y la temperatura

Se considera que el crecimiento de las bacterias amonio y nitrito oxidantes es mejor a valores de pH neutro a alcalino (Prosser, 1989). Holt *y col.* (1994) indicaron un intervalo de pH de 5.8-8.5 para bacterias amonio oxidantes y de 6.5-8.5 para nitrito oxidantes en cultivos puros. Propiedades similares se han reportado para cultivos mixtos, los cuales se han encontrado en procesos con lodos activados. En la Tabla 1 se muestran los intervalos de pH en los cuales algunos géneros amonio y nitrito oxidantes presentan mejor crecimiento.

Tabla 1. Intervalos de pH y temperatura para el crecimiento de algunos géneros nitrificantes (Gómez *y col.*, 1995).

Género	pH	Temperatura (°C)
<i>Nitrosomonas</i>	5.8 – 8.5	5 – 30
<i>Nitrosococcus</i>	6.0 – 8.0	5 – 30
<i>Nitrospira</i>	7.0 – 8.0	20 – 35
<i>Nitrobacter</i>	7.5 – 8.0	20 – 30
<i>Nitrococcus</i>	7.0 – 8.0	25 – 30

El valor de pH tiene también efecto sobre la nitrificación al cambiar la disponibilidad del NH₃ en el cultivo (Stein *y col.*, 1997). La reacción



tiene un pK_a de 9.26 a 25°C (Day y Underwood, 1989). De esta manera el valor de pH del medio establece las concentraciones de NH₄⁺ y NH₃. Suzuki *y col.* (1974) mencionaron que el sustrato natural de la AMO es el NH₃. Los autores observaron que las constantes de Michaelis-Menten (Km) para el NH₄⁺ y NH₃ estuvieron relacionadas con la acidez o alcalinidad del medio en cultivos de *N. europaea*. Los valores de Km disminuyeron significativamente cuando el valor de pH se incrementó, sugiriendo que el NH₃ en lugar del NH₄⁺ es el sustrato natural de la enzima AMO. Sin embargo no

debe establecerse lo anterior sin un margen razonable de duda, ya que se debería tomar en cuenta como fueron calculadas las K_m , además no se puede omitir considerar el transporte del NH_3 y NH_4^+ a través de la membrana citoplasmática de las bacterias nitrificantes (Phillips *y col.*, 2002). Groeneweg *y col.* (1994) no encontraron en cultivos de *N. europaea* una K_m constante para el NH_3 en un intervalo de valores de pH entre 6.7 y 7.0 además que en ese intervalo encontraron las máximas velocidades de oxidación para el NH_3 . Estos autores sugieren que el valor de K_m para el NH_3 no es constante como lo indicó Suzuki *y col.* (1974), en cambio, el valor aparente de K_m disminuyó a valores de pH bajos. Se ha reportado que la nitrificación se detiene por completo a valores de pH menores que 5 (Prosser, 1989). El efecto se atribuye entre otras cosas a la acumulación de ácido nitroso (HNO_2), el cual inhibe la oxidación del amonio. Aunque es difícil distinguir entre el efecto del HNO_2 del pH por si mismo, ya que existe alguna evidencia de que la reducción en el valor del pH afecta la actividad enzimática (Anthonisen *y col.*, 1976).

Por otra parte, está documentado que la temperatura tiene un efecto sobre la nitrificación. En la Tabla 1 se muestran los intervalos de temperatura donde se presenta mejor crecimiento de algunos géneros nitrificantes. Groeneweg *y col.* (1994) evaluaron el efecto de la temperatura en cultivos de *N. europaea* sugiriendo que además del pH la temperatura tiene una influencia pronunciada en el equilibrio entre NH_4^+ y NH_3 . Estos autores determinaron en un intervalo de 0 a 30°C la velocidad específica de oxidación del amonio a un valor de pH constante de 8 observando una diferencia significativa en las velocidades de oxidación del amonio a temperaturas de 15 y 30°C. A una misma concentración de N-NH_4^+ , las velocidades específicas de oxidación de amonio fueron de 165 y 260 $\text{mg g}^{-1} \text{h}^{-1}$ a 15 y 30°C, respectivamente lo cual significó un efecto de la temperatura en la actividad de oxidación.

1.2.3. Efecto de la materia orgánica

Al revisar la literatura es frecuente encontrar trabajos acerca de los posibles efectos bioquímicos y fisiológicos negativos de la materia orgánica sobre el metabolismo de las bacterias nitrificantes. En el tratamiento de aguas residuales por nitrificación, el control de la materia orgánica es de suma importancia ya que es inevitable la presencia de compuestos orgánicos en los efluentes. Se considera que para tener un proceso nitrificante eficiente, la materia orgánica debe estar en bajas concentraciones. 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) estudiaron el efecto de algunos ácidos grasos volátiles a diferentes concentraciones en la velocidad nitrificante en cultivos en lote. Sus resultados sugirieron que los diferentes grados de inhibición en el proceso nitrificante estuvieron relacionados con el tipo de materia orgánica adicionada. Algunos estudios relacionan el efecto de la materia orgánica con una inhibición en el crecimiento. Jensen (1950) observó que algunos aminoácidos inhiben el crecimiento de *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*. De esta manera, glicina, alanina y asparagina fueron fuertemente inhibitorios a concentraciones de 13-46 mM, pero la glutamina y aspartato no tuvieron efecto en el crecimiento. Otras investigaciones informan que la materia orgánica puede ocasionar una disminución de las velocidades del proceso nitrificante. Leu y col. (1998) mencionaron que la velocidad de la nitrito oxidación fue la limitante de un proceso nitrificante llevado a cabo en un reactor flujo pistón con presencia de glucosa a una concentración de 250 mg COD/L. Los resultados indicaron que a medida que la concentración de glucosa aumenta, también aumenta la acumulación de nitrito. Se ha evidenciado que la inhibición por la presencia de materia orgánica en *Nitrobacter* es por represión en la síntesis de oxidorreductasas (Frietag y col., 1987). Algunos estudios se han enfocado en entender cómo la materia orgánica puede inhibir la amonio oxidación. Estas investigaciones han indicado que la enzima AMO puede oxidar una amplia variedad de compuestos orgánicos y que los efectos inhibitorios de la mayoría de estos sustratos ocurren por competencia con el NH_3 por el sitio activo de la enzima. Los sustratos alternativos pueden provocar inhibición en la AMO por tres mecanismos distintos: a) unión directa de un sustrato alternativo con la AMO, b) interferencia con el suministro reductor que necesita la AMO para su actividad, c) la oxidación de los sustratos produce compuestos que son altamente reactivos e inactivan la AMO u otras enzimas de la ruta nitrificante (McCarty, 1999). Keener y Arp (1993) estudiaron el efecto inhibitorio de quince hidrocarburos e hidrocarburos halogenados en *Nitrosomonas europaea* y determinaron la actividad de la AMO midiendo la producción de nitrito. Estos autores encontraron que los sustratos alternativos de la AMO exhibieron perfiles cinéticos de inhibición competitiva y no competitiva. Proponen que dependiendo del sustrato, la unión con la AMO puede ocurrir en el sitio activo donde se lleva a cabo la oxidación del NH_3 (sustrato competitivo) o en otro sitio de la enzima diferente al sitio activo (sustrato no competitivo). Estos autores sugieren que el

carácter competitivo generalmente disminuye a medida que el peso molecular del inhibidor aumenta. Por ejemplo el metano y acetileno fueron inhibidores competitivos de la oxidación del NH_3 mientras que los alcanos y alcanos monohalogenados (mayores a C_4) fueron no competitivos.

De la misma manera, en un proceso de tratamiento nitrificante es siempre posible que los microorganismos heterótrofos asociados al lodo nitrificante puedan tener un efecto sobre la nitrificación. Hanaki *y col.* (1990*b*) brindan información acerca de la posible competencia entre nitrificantes y heterótrofos en lodos activados alimentados con glucosa en un intervalo de 160-1000 mg/L (velocidad de carga de 35-220 mg glucosa/Ld) en un reactor en continuo. Sus resultados sugirieron que la adición de materia orgánica al cultivo provocó el crecimiento de los heterótrofos, inhibiendo la amonio oxidación mediante la disminución del amonio disponible. Sin embargo en el trabajo de Hanaki *y col.* (1990*b*) la relación C/N más elevada del medio de cultivo fue de 5, lo cual podría orientar a la microflora heterótrofa a un proceso desasimilativo. Más estudios sobre la competencia entre nitrificantes y organo-heterótrofos son necesarios para entender de una mejor manera el fenómeno. Okabe *y col.* (1996) estudiaron la dinámica de las poblaciones nitrificante y heterótrofa por métodos microbiológicos en biopelículas de poblaciones mixtas y su relación dependiente del tiempo a varias relaciones C/N (0 a 1) de alimentación. Informaron que un influente con la mayor relación C/N, ocasionó una fase de retardo en la nitrificación, especialmente en la actividad de las bacterias nitrito oxidantes.

Como ejemplo del efecto inhibitorio de compuestos aromáticos en la nitrificación, Zepeda *y col.* (2003) evaluaron en cultivos en lote el efecto del benceno a diferentes concentraciones sobre el proceso nitrificante. Determinaron las velocidades específicas de consumo de amonio y producción de nitrato, así como la eficiencia de consumo de amonio y el rendimiento de producción de nitrato. Estos autores observaron que 10 mg de benceno /L inhibió en un 53% el rendimiento de producción de nitrato, mientras que a 5 mg/L no se observó efecto alguno. Los autores determinaron que el benceno ocasionó un incremento en el tiempo de adaptación de los cultivos para iniciar la nitrificación y una disminución significativa en los valores de las velocidades específicas de la nitrificación. A 10 mg/L, la velocidad específica de consumo de amonio disminuyó un 82% y la velocidad específica de producción de nitrato 74%. En un trabajo posterior, Zepeda *y col.* (2006) compararon el efecto del benceno, tolueno, y *m*-xileno

(BTX) sobre cultivos nitrificantes en lote. A 10 mg C/L de BTX, el orden de inhibición en la producción de nitrato fue benceno > *m*-xileno > tolueno mientras que a 20 mg C/L la secuencia cambió *m*-xileno > tolueno > benceno. Estos autores consideran que los mecanismos que involucran la inhibición del proceso nitrificante por BTX dependen de varios factores como: la concentración inicial, la estructura química y características hidrofóbicas del compuesto.

De todo lo anterior se establece que la materia orgánica tiene un efecto negativo sobre la ruta nitrificante, pero aún falta más información para comprender del todo el fenómeno.

1.2.3.1 Efecto inhibitorio de los compuestos fenólicos

Existen pocos trabajos acerca de la inhibición de la nitrificación por parte de compuestos fenólicos en cultivos axénicos y consorcios nitrificantes y menos aún respecto al efecto inhibitorio de los cresoles. En la tabla 2 se presentan trabajos realizados en cultivos en lote que reportan porcentajes de inhibición de la nitrificación por el efecto del fenol y sus derivados.

Tabla 2. Inhibición de la nitrificación por compuestos fenólicos.

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN (mg/L)	% INHIBICIÓN	REFERENCIA
Fenol	5.6	75	Stafford, 1974
Fenol	3.5	100	Dyreborg y Arvin, 1995
Fenol	2	100	Gernaey <i>y col.</i> , 1999
Fenol	4	77	Juliastuti <i>y col.</i> , 2003
Fenol	1500	18	Amor <i>y col.</i> , 2005
<i>p</i> -cresol	5.6	75	Stafford, 1974
<i>p</i> -cresol	17	70	Texier y Gómez, 2002
<i>o</i> -cresol	4.4	75	Stafford, 1974
<i>o</i> -cresol	1.3	100	Dyreborg y Arvin, 1995
3,5-diclorofenol	2	60	Gernaey <i>y col.</i> , 1999

Cabe mencionar que para poner en evidencia la inhibición se deben evaluar las velocidades específicas del proceso y generalmente en estos trabajos (Tabla 2) se omiten datos cinéticos, así como información sobre la eficiencia en el consumo de amonio y el rendimiento en la producción de nitrato, que son necesarios para un mejor entendimiento del proceso respiratorio nitrificante. Cabe mencionar que algunos de estos resultados no se pueden comparar entre sí ya que existieron diferencias en las metodologías usadas, el tipo de inóculo así como en las variables de respuesta evaluadas. Por ejemplo, Stafford (1974) evaluó la inhibición mediante las velocidades de consumo de oxígeno. Dyreborg y Arvin (1995) basaron sus determinaciones de inhibición de la nitrificación en un modelo matemático que describe una inhibición no competitiva por el compuesto fenólico, asumiendo que la nitrificación es de orden-cero respecto al oxígeno y amonio. Gernaey *y col.* (1999) midieron la inhibición usando una técnica de titulación que cuantifica los protones formados durante la nitrificación y mediante un modelo matemático determinaron a partir de estos datos los parámetros cinéticos. Juliastuti *y col.* (2003) para definir el porcentaje de inhibición, utilizaron la prueba ISO 9509 que se basa en relacionar las velocidades de oxidación inhibidas con la máxima velocidad de oxidación. Unos autores definen la inhibición como una disminución en la eficiencia de eliminación de amonio, mientras que otros la evalúan determinando una disminución en el rendimiento de producción de nitrato (Texier y Gómez, 2002; Juliastuti *y col.*, 2003).

En varios trabajos realizados con consorcios nitrificantes, se discute el efecto del fenol, y algunos autores coinciden en que las bacterias nitrificantes aumentaron su actividad a medida que la concentración de fenol en el medio disminuyó. De la misma manera se indicó que el fenol provocó una fase de retardo en la nitrificación y se argumentó que este fue consumido por las bacterias organo-heterótrofas asociadas al cultivo nitrificante (Stafford, 1974; Gernaey *y col.*, 1999; Yamagishi *y col.*, 2001; Amor *y col.*, 2005). Stafford (1974) observó un aumento en la velocidad específica de consumo de NH_3 a medida que la concentración de fenol disminuyó en el medio, argumentando que podría deberse a la adaptación de las bacterias nitrificantes a la presencia de este compuesto o que las bacterias heterótrofas al consumir la materia orgánica hasta una concentración no inhibitoria, permitieron la oxidación del NH_3 . Lo anterior coincide con lo observado por Gernaey *y col.* (1999) que sugirieron que bacterias organo-heterótrofas eliminaron el fenol a 2 mg/L en un cultivo en lote y encontraron que la nitrificación comenzó cuando el fenol se encontró en una concentración no inhibitoria.

Amor y col. (2005) concordaron que en cultivos en lote, la fase de retardo de la nitrificación originada por el fenol (100-2500 mg/L) y la acumulación de nitrito y amonio, aumentaron a medida que la concentración inicial de fenol se incrementaba. Estos autores mencionaron que el fenol fue totalmente eliminado a todas las concentraciones. Sin embargo se omitió reportar datos de velocidades específicas y se observó una disminución en el rendimiento de producción de nitrato, lo cual indicaría que la ruta nitrificante ya no era la predominante en el proceso. Yamagishi y col., (2001) utilizaron un consorcio nitrificante adaptado al fenol por 15 años como fuente de inóculo para un reactor de filtración de flujo cruzado. Encontraron que el fenol a 300 mg/Ld fue completamente eliminado y simultáneamente el amonio fue oxidado a nitrato. Sin embargo los autores no brindan información acerca de la oxidación del fenol, la formación de posibles intermediarios y se omite el balance de masa de carbono que permitiría visualizar la posible asimilación o mineralización del fenol. Yamagishi y col. (2001) sugirieron que el fenol fue consumido por la desnitrificación en los períodos de no aireación del cultivo cuantificando el óxido nitroso producido en los periodos de aireación intermitente. A pesar de que los autores muestran evidencias moleculares de la presencia de bacterias nitrificantes en el consorcio, se omiten estudios moleculares para los posibles desnitrificantes.

De entre los pocos estudios del efecto particular del *p*-cresol en la nitrificación, Texier y Gómez (2002) observaron que en cultivos en lote utilizando un consorcio nitrificante proveniente de un reactor en continuo en estado estacionario, el *p*-cresol a 17 mg/L provocó una disminución del 70% en la producción de nitrato. Estos autores no proporcionaron datos cinéticos del proceso nitrificante para poner en evidencia la inhibición de la nitrificación por el *p*-cresol y comparar el efecto inhibitorio sobre la amonio y nitrito oxidación.

A pesar de que existe información sobre el efecto de los compuestos fenólicos, y en menor medida de los cresoles en la nitrificación, más estudios son necesarios para entender a qué se debe la inhibición en el proceso respiratorio nitrificante. No queda claro todavía en qué proporción está involucrada la inhibición de las enzimas de la nitrificación por los compuestos fenólicos y el efecto de competencia de los heterótrofos por el oxígeno y amonio.

1.2.3.2 Capacidad biotransformante de cultivos nitrificantes

Un aspecto relevante de la nitrificación es que existen evidencias de su capacidad biotransformante de compuestos aromáticos. Se ha estudiado y evidenciado que la enzima AMO puede oxidar una amplia variedad de sustratos (McCarty, 1999). Por ejemplo, Hyman *y col.* (1985) observaron que el benceno fue oxidado a fenol y posteriormente a hidroquinona por *Nitrosomonas europaea*. Estos autores adicionaron alitiourea a los cultivos como inhibidor selectivo de la AMO y encontraron que la producción de fenol e hidroquinona fue inhibida, sugiriendo que la AMO estuvo implicada en ambas oxidaciones. Posteriormente, Keener y Arp (1994) encontraron que en cultivos axénicos de *Nitrosomonas europaea*, el benceno y una variedad de compuestos aromáticos, como etilbenceno y tolueno fueron oxidados a intermediarios pero sin un rompimiento del anillo. El mecanismo de oxidación fue incorporar un grupo -OH al anillo u oxidar al sustituyente metilado. Keener y Arp (1994) adicionaron acetileno como inhibidor de la AMO a cultivos en lote de *Nitrosomonas europaea*, para comprobar si los compuestos aromáticos podrían ser oxidados en ausencia de la actividad de la AMO. Estos autores encontraron que la mayoría de los compuestos aromáticos no fueron oxidados bajo estas condiciones atribuyendo la capacidad de oxidación de estos compuestos a la enzima AMO. Sin embargo, el *p*-cresol y el *p*-hidroxibencilalcohol fueron oxidados bajo estas condiciones originando como producto *p*-hidroxibelzaldehido en ambos casos. Los resultados experimentales sugieren que el *p*-hidroxibencilalcohol es intermediario en la oxidación del *p*-cresol, y que la oxidación del grupo metilado del *p*-cresol pudo llevarse a cabo por una enzima diferente a la AMO. Puede verse que se requieren más estudios para entender la capacidad de la AMO para oxidar compuestos fenólicos y cómo se afecta el proceso respiratorio nitrificante.

En consorcios nitrificantes también hay indicios de la biotransformación de compuestos aromáticos. Por ejemplo, Texier y Gómez (2002) observaron que el *p*-cresol en cultivos nitrificantes en lote, fue transformado a intermediarios aún no identificados. Zepeda *y col.* (2003) observaron la biotransformación del benceno a fenol y finalmente hasta acetato. El tolueno y *m*-xileno fueron oxidados a ácidos grasos volátiles. En este caso si existió un rompimiento del anillo aromático, y los autores sugirieron la participación conjunta de las microfloras nitrificantes y organo-heterótrofas en la oxidación de los BTX. Dos posibles hipótesis se pueden plantear. Es posible que la AMO oxidó el

benceno a fenol, como ya había sido observado (Hyman *y col.*, 1985) en cultivos de *Nitrosomonas europaea* y posteriormente los organo-heterótrofos oxidaron el fenol a acetato. La segunda hipótesis contempla que no hubo participación de la AMO en la oxidación del benceno y que únicamente la microflora organo-heterótrofa participó en la oxidación total del benceno hasta acetato. No obstante, es necesaria hacer investigación sobre ambas hipótesis que permita obtener más evidencias y poder realizar una propuesta fundada. En la Figura 3 se esquematiza la oxidación del *p*-cresol y benceno en cultivos en lote con un consorcio nitrificante y un cultivo axénico.

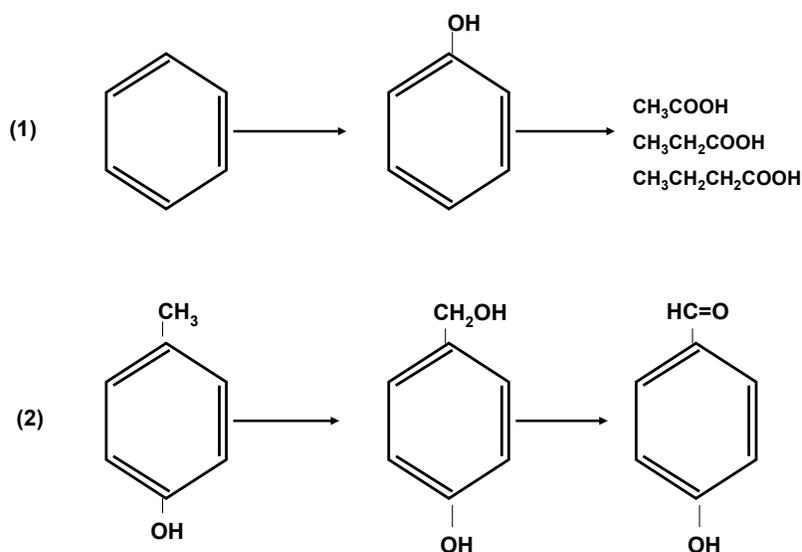


Figura 4. Transformación del benceno (1) con un consorcio nitrificante (Zepeda *y col.*, 2003). Oxidación de *p*-cresol (2) por *Nitrosomonas europaea* (Keener *y Arp*, 1994).

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2.1 Justificación

En los efluentes petroleros e industriales se pueden encontrar altas concentraciones de amonio y de compuestos fenólicos como los cresoles. La nitrificación puede ser utilizada en una primera etapa al oxidar el N-NH_4^+ a N-NO_3^- para que posteriormente se reduzca hasta N_2 por desnitrificación. Sin embargo en la literatura aún no se cuenta con suficiente información sobre la fisiología del proceso nitrificante cuando hay presencia de cresoles. En los pocos trabajos existentes se omiten datos cinéticos (velocidades específicas del consumo de amonio y producción de nitrato) que permitan entender cómo son inhibidos los procesos de amonio y nitrato oxidación. Por otro lado, no se ha evaluado la capacidad de un consorcio nitrificante para biotransformar los cresoles, identificando los intermediarios y productos finales obtenidos.

2.2 Objetivos

Objetivo general: Estudiar y evaluar el efecto del *p*-cresol sobre el metabolismo de un consorcio nitrificante

Objetivos Particulares:

- ✚ Estudiar en cultivos en lote el efecto del *p*-cresol sobre el metabolismo nitrificante, a través de variables de respuesta como, la eficiencia del consumo de amonio, el rendimiento de producción de nitrato y las velocidades específicas del proceso
- ✚ Evaluar y analizar, a través de estudios cinéticos, la oxidación del *p*-cresol durante el proceso nitrificante

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Reactor nitrificante en continuo y fuente de inóculo.

Se operó un reactor nitrificante de tanque agitado en continuo por un período de 270 d con un volumen de operación de 6 L, con una concentración de proteína microbiana de 0.68 ± 0.14 g/L, a una temperatura de 30°C, un pH de 8.0 ± 0.5 , una agitación de 300 rpm, una aireación continua de 2 volúmenes de aire por volumen de líquido por minuto (vvm) y un tiempo de retención hidráulica de 2 d. El reactor fue alimentado con agua residual sintética compuesta por dos medios (Tabla 3) que se separaron como fuente de nitrógeno (A) y carbono (B). El medio (A) se diluye a razón de 20:100 (v:v) para llegar a una concentración total de N-NH₄⁺ de 500 mg/L. El medio (B) además de ser la fuente de carbono tiene la función de amortiguar el pH.

Tabla 3. Composición del medio de cultivo alimentado al reactor nitrificante en continuo.

Medio (A)	Concentración (g/L)
(NH ₄) ₂ SO ₄	5.9
(NH ₄)Cl	4.8
KH ₂ PO ₄	7.0
MgSO ₄	3.0
NaCl	5.0
Medio (B)	Concentración (g/L)
NaHCO ₃	9.3
CaCl ₂	0.5

Los medios A y B fueron alimentados a un flujo de 1.6 y 1.5 L/d, respectivamente. La velocidad de carga de N-NH₄⁺ en el reactor fue de 140.2 ± 6.0 mg N/Ld. La relación C/N fue de 2.5. Además se adicionaron al reactor en continuo diariamente 30 mL de una solución de FeSO₄ al 0.5% (w/v) como micronutriente para la actividad enzimática de la amonio monooxigenasa. El consorcio nitrificante mantenido en el reactor bajo estas condiciones, se utilizó como fuente de inóculo para todos los ensayos en lote.

3.2 Cultivo nitrificante en lote.

Todos los experimentos fueron llevados a cabo en botellas serológicas de 160 mL con un volumen de trabajo de 100 mL y un espacio de cabeza de 60 mL. La fase líquida fue la mezcla de los medios como fuente de nitrógeno y carbono, la cual resultó con las siguientes relaciones C/N = 2.5, N/S = 3.1 y N/P = 1.6. En la Tabla 4 se muestran las concentraciones de nutrientes de los medios de cultivo concentrados. Se adicionó a cada botella 25 mL de medio concentrado como fuente de nitrógeno, 25 mL de medio como fuente de carbono, 0.5 mL de solución de FeSO₄ al 0.5% (w/v), 30 mL de inóculo y 20 mL de agua destilada para llegar a concentraciones iniciales de 100 mg N-NH₄⁺/L y 250 mg C-NaHCO₃/L.

Tabla 4. Concentraciones de los nutrientes del medio de cultivo

Medio de cultivo como fuente de nitrógeno	Concentración (g/L)
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.95
(NH ₄)Cl	0.77
KH ₂ PO ₄	1.12
NaCl	0.8
MgSO ₄	0.8
Medio de cultivo como fuente de carbono	Concentración (g/L)
NaHCO ₃	7.0
CaCl ₂	0.04

Se burbujeó oxígeno al medio durante 2 min y posteriormente se resuspendió el inóculo en cada botella serológica. Las botellas se cerraron herméticamente con tapones de goma y anillos de aluminio y se saturó el espacio de cabeza con oxígeno al 99.6% de pureza, durante 2 min. Para la inoculación, el lodo nitrificante proveniente del reactor en continuo fue lavado con solución fisiológica (NaCl 9 g/L) y centrifugado a 4000 rpm por 10 min. La concentración inicial de biomasa fue de 136 ± 17 mg proteína microbiana/L. El pH inicial fue 7.7 ± 0.2. Finalmente, cada una de las botellas fue colocada en un agitador orbital a 300 rpm, dentro de una incubadora a una temperatura controlada de 30°C por 15 h. A diferentes tiempos de incubación, se tomaron muestras de los cultivos en lote, que fueron filtradas a través de una

membrana de 0.45 μm y se midieron los siguientes compuestos N-NH_4^+ , N-NO_2^- y N-NO_3^- . Los cultivos se realizaron por triplicado.

3.3 Cultivo nitrificante en lote con *p*-cresol

Siguiendo la misma metodología experimental, se evaluó el efecto del *p*-cresol a una concentración inicial de 25 mg/L en el cultivo nitrificante. Se realizaron las cinéticas de eliminación del *p*-cresol y formación de sus intermediarios.

3.4 Cultivo nitrificante en lote con nitrito inicial

Para evaluar el efecto del nitrito sobre la amonio oxidación se utilizaron concentraciones iniciales de 25, 100 y 200 mg NO_2^- /L. Las condiciones experimentales fueron similares a las descritas previamente. El tiempo de incubación de los cultivos fue de 24 h.

3.5 Variables de respuesta del proceso nitrificante

Para valorar fisiológicamente a un cultivo, se hace uso de variables de respuesta, que nos proporcionan información global del proceso, es decir, no hacen énfasis en datos específicos de las rutas metabólicas analizadas. Las variables de respuesta utilizadas para evaluar el proceso nitrificante tanto en cultivos en lote como en continuo, fueron la eficiencia de consumo de N-NH_4^+ ($E\text{-NH}_4^+$), que es la forma de cuantificar el consumo de sustrato (S) y se define como $E\text{-NH}_4^+ = ((S \text{ inicial} - S \text{ final}) / S \text{ inicial}) * 100$; y el rendimiento de producción de N-NO_3^- ($Y\text{-NO}_3^-$). El rendimiento se refiere a la generación de producto (P) a partir del sustrato consumido y se calcula $Y = \text{mg P formado} / \text{mg S consumido}$. El rendimiento puede proporcionar información relacionada con las vías metabólicas. Es importante mencionar que la eficiencia y el rendimiento deben ser medidos a un tiempo constante. Identificando el nivel en donde se localizan los cambios de las variables de respuesta, se puede estudiar y comprender un proceso respiratorio microbiano. También se realizó el balance de nitrógeno (mg/L) empleando para el cultivo continuo la siguiente ecuación:

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

Donde: Q_e = Velocidad de carga; Q_s = velocidad de descarga

Y para los cultivos en lote:

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

Para el carbono en lote:

$$[\text{C-HCO}_3^-]_{\text{inicial}} + [\text{C-}p\text{-cresol}]_{\text{inicial}} + [\text{C-CO}_2]_{\text{inicial}} = [\text{C-HCO}_3^-]_{\text{final}} + [\text{C-}p\text{-cresol}]_{\text{final}} + [\text{C-intermediarios}]_{\text{final}} + [\text{C-CO}_2]_{\text{final}} + [\text{C-Biomasa}]_{\text{final}}$$

Al ser cuantificada la proteína microbiana se asumió que el 16% de la proteína microbiana es nitrógeno y que en la biomasa, 50 % es carbono (Bailey y Ollis, 1986). La cinética del proceso nitrificante se evaluó mediante el cálculo de las velocidades volumétricas (Ecuación 5) y específicas (Ecuación 6) de consumo de amonio ($q\text{-NH}_4^+$) y producción de nitrato ($q\text{-NO}_3^-$), las cuales se expresan como sigue:

$$q_p X = \frac{dP}{dt} \quad q_s X = \frac{dS}{dt} \quad (5)$$

$$q_p = \frac{1}{x} \frac{dP}{dt} \quad q_s = \frac{1}{x} \frac{dS}{dt} \quad (6)$$

Donde x es la concentración de proteína microbiana. Asimismo, las velocidades específicas de consumo de N-NH_4^+ y producción de N-NO_3^- fueron expresadas en mg N/mg N-proteína h. Cabe mencionar que la velocidad volumétrica aumenta conforme aumenta la concentración celular, por lo que no es útil para evaluar la capacidad exclusiva del cultivo. Mientras que la velocidad específica si evalúa las capacidades metabólicas propias del cultivo.

3.6 Métodos analíticos

En la Tabla 5 se muestran los métodos analíticos que se emplearon durante el desarrollo experimental de este trabajo de tesis.

Tabla 5. Métodos analíticos

COMPUESTO	METODO
N-NH ₄ ⁺	Electrodo selectivo
N-NO ₂ ⁻	Electroforesis capilar y HPLC
N-NO ₃ ⁻	Electroforesis capilar y HPLC
Proteína microbiana	Método de Lowry (Lowry,1951)
Cresoles e intermediarios	HPLC
Carbono Orgánico Total	Medidor TOC
Ácidos grasos volátiles (AGV)	Cromatografía de gases
pH	Electrodo (Phoenix electrode Co.)

Antes de iniciar los cultivos, se pusieron a punto las técnicas analíticas con el fin de verificar el grado de variación. En la Tabla 6 se presentan los promedios de las pendientes y coeficientes de correlación de tres curvas estándar como mínimo.

Tabla 6. Promedios de las pendientes y coeficientes de correlación (r^2) de las curvas de calibración de los diferentes métodos analíticos

Análisis	Pendiente	Coefficiente de correlación
Amonio	-45.18 ± 3.1	0.995 ± 0.005
Proteína	2.161 ± 0.08	0.994 ± 0.08
Carbono Inorgánico	891.09 ± 35.5	0.999 ± 0.001
Carbono Total	665.7 ± 25.8	0.994 ± 0.009
Acetato	31215 ± 2537	0.988 ± 0.008
Propionato	57816 ± 1621	0.989 ± 0.006
Butirato	87764 ± 3548	0.989 ± 0.007
Nitrato	590.6 ± 79	0.995 ± 0.003
Nitrito	520.7 ± 34	0.993 ± 0.002
<i>p</i> -cresol	51773 ± 4550	0.988 ± 0.009

En todos los métodos de medida, a excepción del nitrato, se obtuvieron coeficientes de variación menores que el 10%, lo que indicó una aceptable reproducibilidad. Además los coeficientes de regresión fueron siempre superiores que 0.988.

A continuación se describen cada una de las técnicas analíticas que se pusieron a punto.

3.6.1 Cuantificación de amonio

Para cuantificar amonio, se utilizó un electrodo selectivo de amoniaco (Phoenix electrode CO). Primeramente se construyó una curva estándar con NH_4Cl a cinco concentraciones conocidas: 1, 5, 10, 200, y 500 $\text{mg NH}_4^+/\text{L}$, a partir de la cual se determinó la concentración de amonio en las muestras. La lectura del potencial (en mV) generado por el electrodo se registró con un potenciómetro (Cole-parmer, DigiSense). El valor del potencial es proporcional al logaritmo de la concentración cuyo valor puede ser calculado directamente de la ecuación de la recta. Se tomó un volumen de muestra de 50 mL y se alcalinizó con 0.5 mL de solución de NaOH (10N) para desprotonar el ión amonio formándose el amoniaco. Bajo agitación constante y temperatura ambiente, se tomó la lectura del potencial (mV) cuando fue estable (aproximadamente 3 min. después de agregar el NaOH). La Figura 5 muestra el perfil obtenido de los valores promedios de catorce curvas de calibración.

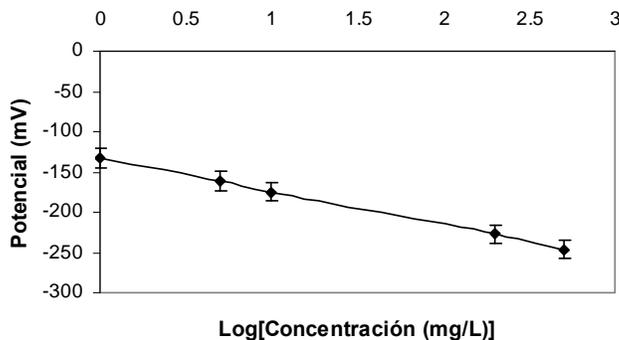


Figura 5. Curva de calibración de amonio.

3.6.2 Cuantificación de nitrito y nitrato

Se realizó la cuantificación de nitrógeno en forma de nitrito y nitrato por electroforesis capilar (CIA 4000 Millipore). Las soluciones requeridas para preparar el electrolito son: sulfato de sodio 0.1M y solución de surfactante OFM. Se tomó 10 mL de solución de sulfato de sodio y 3 mL de OFM y se llevó a un volumen de 100 mL con agua

desionizada. Se filtraron las muestras, las soluciones estándar y el electrolito por una membrana de nylon de 0.45 μm de tamaño de poro.

Para corroborar la reproducibilidad del método, se hicieron curvas de calibración a 10, 30 y 50 mg/L (Figuras 6 y 7) empleando una solución madre de nitrato de potasio y nitrito de sodio a una concentración de 2500 mg/L de N-NO_2^- y N-NO_3^- . Los estándares y las muestras fueron medidos por duplicado.

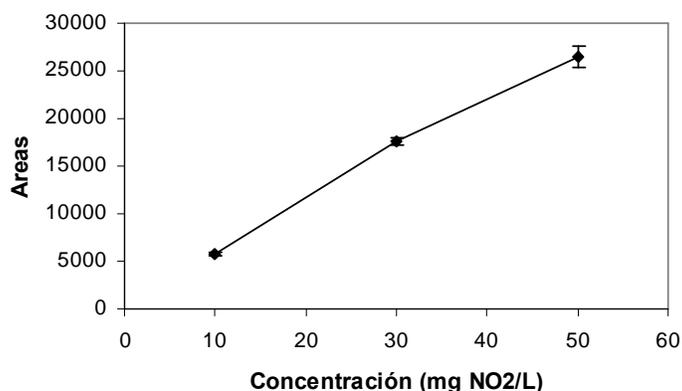


Figura 6. Curva estándar de nitrito por electroforesis capilar

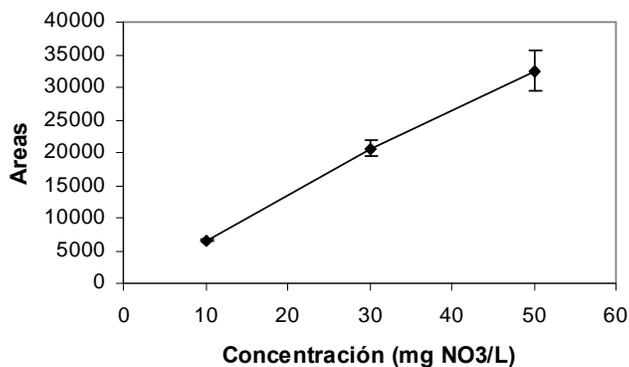


Figura 7. Curva estándar de nitrato por electroforesis capilar.

Como método alternativo para la cuantificación de nitrito y nitrato, se utilizó un cromatógrafo de líquidos (HPLC, Perkin Elmer serie 200) con una columna de intercambio iónico (Waters IC-pak HC) y un detector UV-visible. La fase móvil consistió en una mezcla de butanol, acetonitrilo y un concentrado de gluconato (20:120:20

v:v:v) diluidos con agua desionizada a un volumen de 1L. La longitud de onda fue de 214 nm y el flujo de 2 mL/min. Como en el método por electroforesis capilar, se construyó una curva estándar a partir de una solución madre a las concentraciones de 10, 25 y 50 mg nitrito y nitrato/L y se encontró que la respuesta del equipo fue lineal (Figura 8).

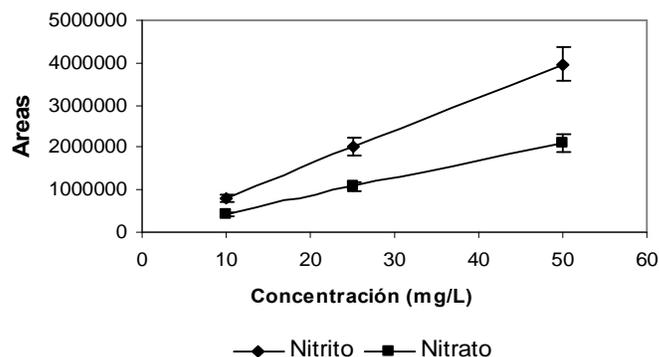


Figura 8. Curva estándar de nitrito y nitrato por HPLC.

3.6.3 Cuantificación de carbono orgánico total e inorgánico

El carbono total es la suma del carbono orgánico e inorgánico. Se utilizó un analizador de carbono orgánico total (modelo TOC-5000 de Shimadzu corporation) para su cuantificación. Los componentes carbonados de la muestra se descomponen y los productos de combustión pasan por un analizador de gas infrarrojo en donde es detectado el CO₂ generando un pico, cuya área es calculada por un procesador de datos. El principio del método se basa en la propiedad de absorción de radiación infrarroja que presenta el CO₂. El área es proporcional a la concentración de carbono en la muestra. Las muestras y los estándares se filtran por una membrana de 0.45 µm antes de ser analizados. Para la elaboración de la curva estándar se prepararon diluciones a partir de una solución madre con una concentración de 1000 mg/L de ftalato de potasio (Figura 9).

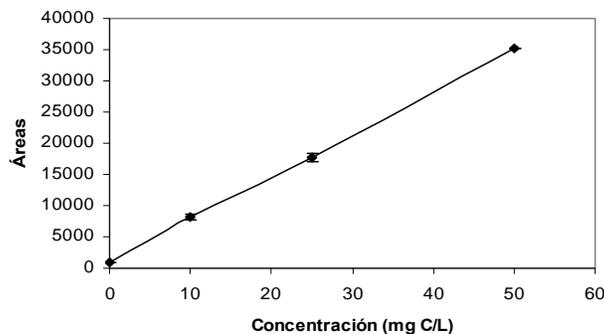


Figura 9. Curva estándar de carbono total

Para cuantificar el carbono inorgánico se utilizó el mismo equipo y procedimiento que para el carbono total. Las soluciones estándar (0, 10, 25 y 50 mg/L) se prepararon a partir de una solución madre de bicarbonato y carbonato de sodio a una concentración equivalente de 1000 mg C/L. La muestra es acidificada con ácido fosfórico al 25% para convertir el carbono inorgánico disuelto a CO_2 . La figura 10 presenta la curva estándar realizada por triplicado.

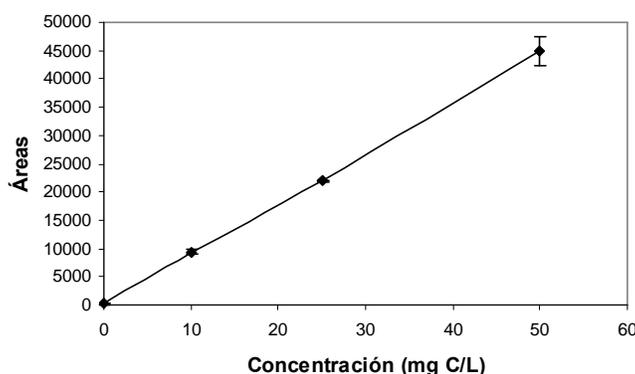


Figura 10. Curva estándar de carbono inorgánico.

3.6.4 Cuantificación de ácidos grasos volátiles

Se midieron los ácidos acético, propiónico y butírico por cromatografía de gases (Hewlett Packard 5890) usando una columna capilar (AT-1000) y un detector FID. La temperatura del inyector fue de 130°C , el horno se programó para hacer una rampa, iniciando con 100°C por 0.2 min, con un incremento de temperaturas de $20^\circ\text{C}/\text{min}$, hasta llegar a 120°C por 3.5 min. La temperatura del detector fue de 150°C . Se usó

nitrógeno molecular como gas acarreador a un flujo de 4 mL/min. El tiempo de corrida fue de 4.7 min. Se construyó una curva estándar a partir de una solución madre de una mezcla de acetato, propionato y butirato a una concentración de 100 mM cada uno. Se agregó 50 μ L de solución de HCL al 50% a todos los viales. La solución estándar y las muestras se filtraron a través de una membrana de 0.45 μ m de tamaño de poro. La curva estándar se realizó por triplicado para evaluar la reproducibilidad del análisis. La Figura 11 muestra las curvas estándar obtenidas.

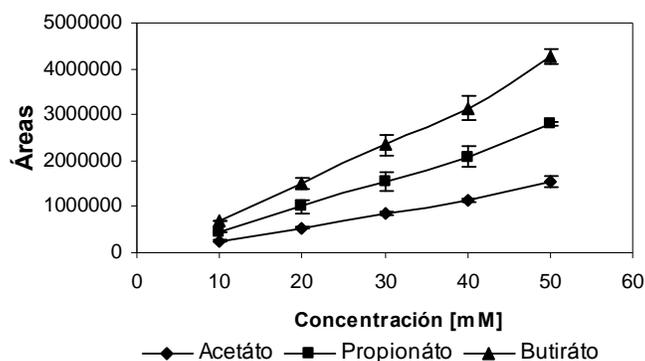


Figura 11. Curvas estándar promedio de acetato, propionato y butirato.

3.6.5 Cuantificación de *p*-cresol

El método para cuantificar el *p*-cresol se desarrolló por HPLC (Perkin Elmer serie 200) utilizando una columna C-18 (Varian Crompack) y un detector UV-visible. Se utilizó una fase móvil compuesta por acetonitrilo y agua (60:40, v:v), a un flujo de 1.4 mL/min. La fase móvil fue filtrada (0.45 μ m) y desgasificada. La longitud de onda fue de 254 nm (Figura 12). A partir de una solución madre se realizaron las diluciones para obtener soluciones estándar con 10, 20, 30, 40 y 50 mg/L. Todas las diluciones se hicieron con agua desionizada y las soluciones fueron filtradas por una membrana de 0.45 μ m de tamaño de poro.

Para la cuantificación de los intermediarios *p*-hidroxibenzoato y *p*-hidroxibenzaldehído se utilizó el mismo método, con la única variante que se programó en el equipo una rampa con el flujo constante de 1.5 mL/min pero cambiando las proporciones de la fase móvil (acetonitrilo y agua) a 60:40 por 1.2min, 50:50 por 0.1 min y finalmente 30:70 por 2 min para aumentar la resolución de los picos.

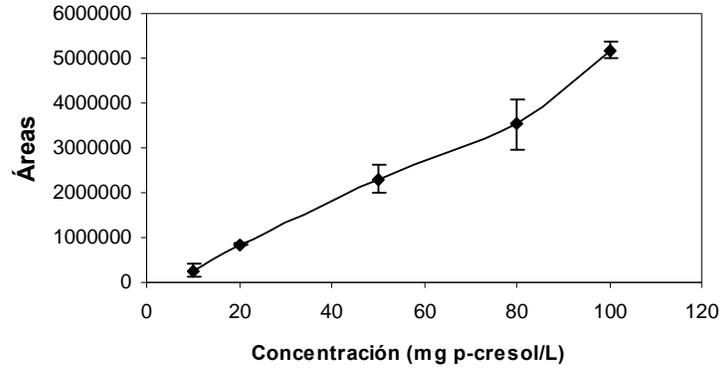


Figura 12. Curva estándar de *p*-cresol por HPLC.

3.6.6 Cuantificación de proteína microbiana.

La concentración de proteína fue determinada por el método colorimétrico de Lowry (Lowry *y col.*, 1951). Se midió la absorbancia con un espectrofotómetro (Shimadzu TM), a una longitud de onda de 750 nm. Se realizó una curva estándar de albúmina, cada vez que se midió la proteína en las muestras.

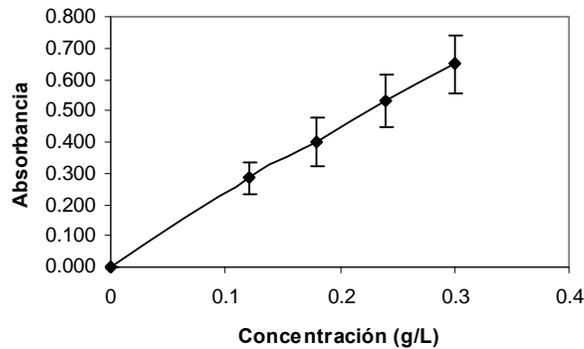


Figura 13. Curva estándar de proteína microbiana.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Reactor nitrificante en continuo

En la Figura 14, se presentan las velocidades de carga y descarga de amonio ($Q_e \text{ N-NH}_4^+$ y $Q_s \text{ N-NH}_4^+$, respectivamente), así como la velocidad de producción de nitrato ($Q_s \text{ N-NO}_3^-$) obtenidas en el reactor nitrificante en continuo, durante un período de 270 días. El reactor se alimentó con una $Q_e \text{ N-NH}_4^+$ de $140.2 \pm 6.0 \text{ mg N/L.d.}$ La velocidad de descarga en N-NH_4^+ residual fue de $0.5 \pm 1.0 \text{ mg N/L.d.}$ y la velocidad de producción de N-NO_3^- fue de $127.1 \pm 14.5 \text{ mg N/L.d.}$ Durante todo el tiempo de operación del reactor nitrificante, no se detectó N-NO_2^- . Se observó que las velocidades volumétricas de descarga de N-NH_4^+ y de N-NO_3^- se mantuvieron con un coeficiente de variación menor que 11%, durante todo el período de operación del reactor, indicando que el cultivo nitrificante alcanzó el régimen estacionario.

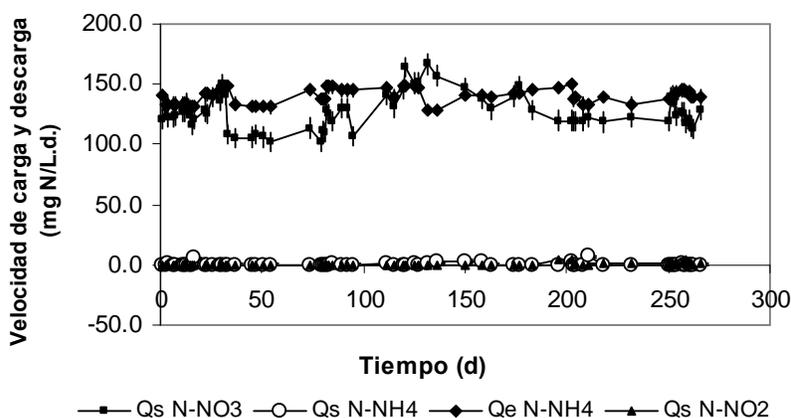


Figura 14. Perfil de las velocidades del reactor nitrificante.

Se determinó una eficiencia en el consumo de amonio ($E\text{-NH}_4^+$) de $99.6\% \pm 0.9$ y un rendimiento de producción de nitrato ($Y\text{-NO}_3^-$) de 0.92 ± 0.1 . Se encontró que la velocidad de producción de proteína microbiana fue aproximadamente de $6.9 \text{ mg proteína/Ld}$, lo que corresponde a $1.1 \pm 0.1 \text{ mg N-proteína/Ld}$. Esto indica que menos del 1% del N-NH_4^+ consumido se utilizó para biosíntesis celular. El rendimiento alto de producción de nitrato, así como la baja velocidad de producción de biomasa, indican que el proceso nitrificante fue netamente desasimilativo. Estos resultados pueden entenderse en términos de la composición y balanceo del medio de cultivo. Se

esperaba un proceso desasimilativo ya que la relación C/N fue baja y desbalanceada para la producción de biomasa. Asimismo este resultado coincide con el ΔG° del proceso nitrificante, que es de -349 kJ/reacción (Madigan *y col.*, 2003) lo que limita el crecimiento microbiano. El valor promedio de pH fue 8.1 ± 0.3 . Cabe mencionar que no fue necesario ajustar el pH en el reactor en continuo, ya que el bicarbonato de sodio del medio de cultivo tuvo la función de amortiguador. Los resultados fueron similares a los observados por Texier y Gómez (2002) y Zepeda *y col.* (2003), que utilizaron un reactor nitrificante en continuo bajo régimen estacionario. Se puede concluir que el proceso se llevó a cabo con un consorcio nitrificante estabilizado fisiológicamente, mismo que fue utilizado como fuente de inóculo para los ensayos en lote.

4.2 Cultivos en lote

4.2.1 Cultivo nitrificante sin *p*-cresol

Como referencia, se realizaron cinéticas del proceso nitrificante sin *p*-cresol (Figura 15) para determinar las velocidades volumétricas y específicas de consumo de amonio y producción de nitrato, así como la $E\text{-NH}_4^+$ y el $Y\text{-NO}_3^-$ (Tabla 7).

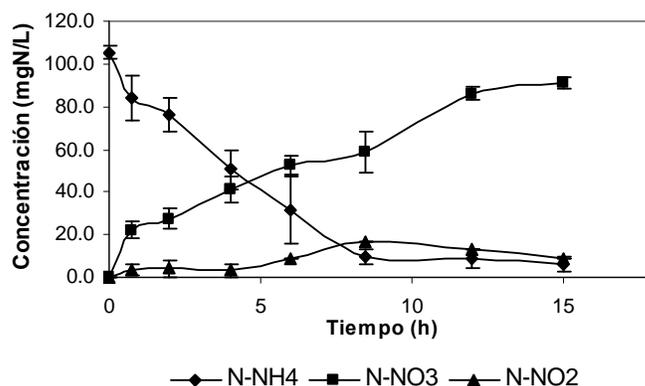


Figura 15. Perfil del cultivo nitrificante en lote sin *p*-cresol.

Tabla 7. Velocidades, eficiencia y rendimiento del cultivo nitrificante en lote sin *p*-cresol.

	Consumo de N-NH_4^+	Producción de N-NO_3^-
Velocidad específica (mg N/mg proteína h)	0.07 ± 0.01	0.05 ± 0.01
Eficiencia (%)	93.0 ± 1.2	----
Rendimiento	----	0.92 ± 0.04

Debe destacarse que no se observó que la disponibilidad de oxígeno fuera una limitante en el proceso, ya que no se encontró una acumulación de nitrito, característica de un proceso nitrificante con una limitación de oxígeno disuelto (Goreau *y col.*, 1980; Hanaki *y col.*, 1990a). El pH de los cultivos fue 7.0 ± 0.5 , en este intervalo no hubo problema de disponibilidad de sustrato, ni formación de HNO_2 . Estos resultados en el control muestran que las condiciones experimentales utilizadas en los cultivos en lote fueron adecuadas para llevar a cabo la nitrificación.

4.2.2 Estudio cinético de la nitrificación en presencia de *p*-cresol

Se realizó un estudio cinético del proceso nitrificante en lote, para evaluar el efecto inhibitorio del *p*-cresol (25 mg/L) sobre la actividad del consorcio nitrificante (Figura 16).

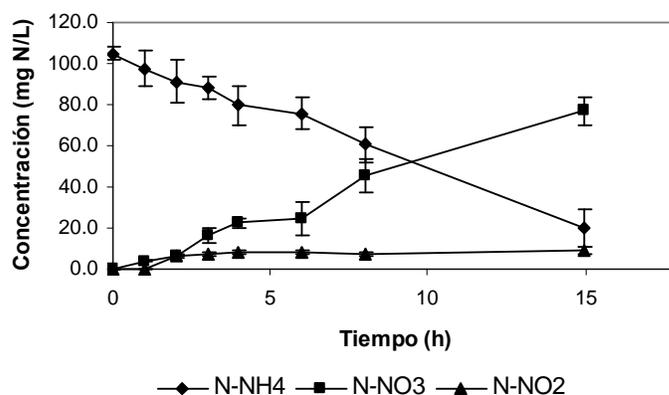


Figura 16. Consumo de amonio y producción de nitrito y nitrato en un cultivo nitrificante con 25 mg/L de *p*-cresol.

A las 15 h de cultivo, el proceso nitrificante presentó una $E\text{-NH}_4^+$ de $80.7\% \pm 8.5$. Se observó una disminución del 13% en el consumo de N-NH_4^+ , en comparación con el

cultivo nitrificante sin *p*-cresol. Sin embargo, el rendimiento de producción de nitrato fue de 0.91 ± 0.1 , es decir, casi la totalidad del amonio consumido fue oxidado hasta nitrato. Se puede decir entonces que la ruta metabólica nitrificante, fue la predominante.

La Tabla 8 muestra las velocidades específicas de oxidación del amonio y producción de nitrato, comparadas con su respectivo control sin *p*-cresol.

Tabla 8. Comparación de las velocidades específicas de consumo de amonio ($q\text{-NH}_4^+$) y producción de nitrato ($q\text{-NO}_3^-$) en cultivos nitrificantes en lote con y sin *p*-cresol.

Concentración de <i>p</i> -cresol (mg/L)	$q\text{-NH}_4^+$ (mg N- NH_4^+ /mg proteína h)	$q\text{-NO}_3^-$ (mg N- NO_3^- /mg proteína h)
0	0.066 ± 0.01	0.049 ± 0.01
25	0.046 ± 0.01	0.039 ± 0.01

La disminución en las velocidades específicas de consumo de amonio (30%) y producción de nitrato (20%) muestra el efecto inhibitorio del *p*-cresol sobre la velocidad del proceso respiratorio del lodo nitrificante. Estos resultados indican que la ruta metabólica nitrificante fue afectada en su velocidad, es decir, las reacciones de oxidación del NH_4^+ hasta NO_3^- sí se llevaron a cabo, aunque a una menor velocidad. De hecho, al aumentar el tiempo de cultivo a 24 h, la $E\text{-NH}_4^+$ alcanzó un valor de 88% y el $Y\text{-NO}_3^-$ fue de 0.90. Aunque no se pueden descartar posibles efectos en el transporte del *p*-cresol por algún daño en la membrana, como parece haber sido observado en el consumo de algunos compuestos recalcitrantes del tipo aromático y que se sugiere son temporalmente acumulados, o lentamente consumidos (Sikkema *y col.*, 1992 y 1995). Se observó también que la velocidad específica de consumo de amonio disminuyó en mayor grado que la velocidad específica de producción de nitrato. Es decir, el proceso amonio oxidante se vio mayormente afectado que la nitrato oxidación. Algunos autores mencionan que las bacterias amonio oxidantes son más sensibles que las bacterias nitrato oxidantes al efecto de la materia orgánica y se ha señalado que puede ser debido a que las bacterias amonio oxidantes tienen incompleto el ciclo de los ácidos tricarbónicos, o bien, a que no hay un acoplamiento entre las enzimas NADH-dependientes con la generación de energía y formación de ATP (Smith *y col.*, 1967; Smith y Hoare, 1968; Hyman y Wood, 1983). Por otro lado, se ha señalado que *Nitrobacter* no es una bacteria quimiolitótrofa obligada, dado que podría utilizar

fuentes de carbono orgánico tales como el acetato, pero sólo hasta ciertas concentraciones (Steinmüller y Bock, 1976; Smith y Hoare, 1968).

Stafford (1974) reportó que en un consorcio microbiano expuesto a una concentración de 10 mg/L de fenol, la amonio oxidación fue completamente inhibida, mientras que a concentraciones mayores que 100 mg/L de fenol, la nitrito oxidación no fue afectada. Indicó también que la inhibición se determinó cuantificando el consumo de oxígeno por los organismos nitrificantes, sin embargo se excluyeron los datos de eficiencia, rendimientos y cinéticos, omisión frecuente en los estudios de la inhibición de la nitrificación por compuestos fenólicos. Amor y col. (2005) señalaron la eliminación simultánea de fenol y amonio por un consorcio nitrificante, pero sin reportar datos cinéticos. Además el proceso fue netamente asimilativo, ya que se formó biomasa microbiana. Texier y Gómez (2002) observaron en un cultivo nitrificante al cual se le adicionó *p*-cresol a una concentración de 17 mg/L, que el rendimiento de producción de nitrato disminuyó un 30%, sin embargo no se hizo referencia a la velocidad del proceso respiratorio.

Se han propuesto diversos mecanismos que podrían ayudar a entender mejor el efecto inhibitorio de la materia orgánica sobre la nitrificación, como son: el efecto quelante de cierto tipo de materia orgánica sobre el centro de cobre de la AMO (Hooper y Terry, 1973), el enlace covalente de un sustrato diferente al NH_4^+ con la AMO (Hyman y Wood, 1985) y la inhibición competitiva y no competitiva sobre la AMO (McCarty, 1999). Keener y Arp (1994) realizaron estudios en *Nitrosomonas europaea* sobre la transformación de diecisiete compuestos aromáticos, entre ellos el benceno, fenol y *p*-cresol. Observaron una inhibición en la oxidación del amonio y, en la mayoría de los casos, la inhibición fue acompañada de la oxidación del compuesto aromático. Los autores sugirieron que la inhibición en la oxidación del NH_3 podría ser el resultado de la competencia de los sustratos por el sitio activo de la AMO o por la unión del compuesto aromático con la AMO.

4.2.3 Oxidación del *p*-cresol durante la nitrificación

En la Figura 17 se puede apreciar el perfil de consumo de *p*-cresol y la aparición de sus intermediarios más oxidados.

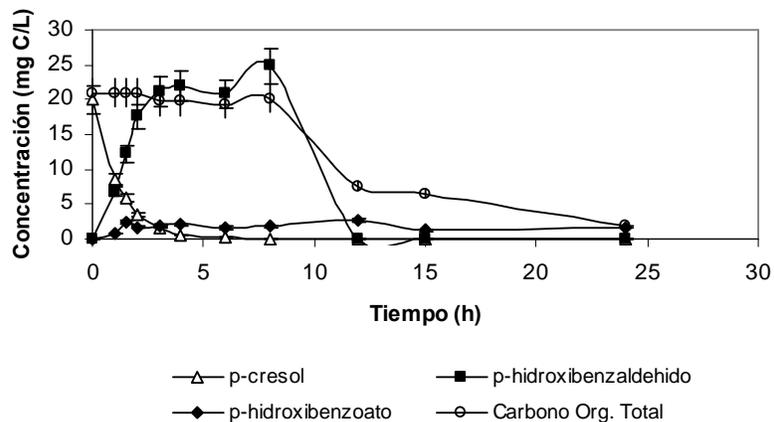


Figura 17. Perfil de consumo de *p*-cresol y producción de *p*-hidroxibenzaldehído y *p*-hidroxibenzoato en un cultivo nitrificante en lote.

Dos compuestos más oxidados que el *p*-cresol fueron identificados y cuantificados por HPLC: el *p*-hidroxibenzaldehído y el *p*-hidroxibenzoato. No obstante, de acuerdo con la revisión en la literatura, todo parece indicar que esta es la primera vez que son determinados y cuantificados estos intermediarios de la oxidación del *p*-cresol en un proceso nitrificante. En la literatura estos compuestos ya han sido mencionados como intermediarios en la ruta de oxidación anaeróbica del *p*-cresol, por desnitrificación (Bossert y Young, 1986; Hopper *y col.*, 1991; Khowry *y col.*, 1992), sulfato-reducción y metanogénesis (Hägglom *y col.*, 1990). Hägglom *y col.* (1990) informaron que bacterias aerobias han sido capaces también de metabolizar al *p*-cresol iniciando con una oxidación del grupo funcional metilo para finalmente formar el *p*-hidroxibenzoato y que en dichas reacciones no se requiere oxígeno molecular. Hopper (1978) aportó evidencia con oxígeno marcado que en la hidroxilación del grupo funcional metilo del *p*-cresol en *Pseudomonas putida*, el átomo de oxígeno se deriva del agua y la reacción es catalizada por la enzima *p*-cresol metilhidrolasa para formar *p*-hidroxibencilalcohol. Hägglom *y col.* (1990) sugirieron que existe una ruta universal para la oxidación del *p*-cresol en sus primeras etapas utilizando como aceptor final de electrones al oxígeno, nitrato, sulfato, así como el dióxido de carbono y formándose de manera secuenciada el *p*-hidroxibencilalcohol, el *p*-hidroxibenzaldehído y el *p*-hidroxibenzoato. En el presente trabajo, se observó que el *p*-cresol fue consumido totalmente después de 4 h y se determinó una velocidad específica de oxidación de 0.06 mg *p*-cresol/mg proteína h. Hägglom *y col.* (1990) establecieron una velocidad específica para un proceso

desnitrificante de 0.03 mg *p*-cresol/mg proteína h. Aunque hubo diferencias en las condiciones experimentales, estas velocidades sugieren que un proceso nitrificante podría ser considerado para oxidar al *p*-cresol en sistemas de tratamiento, aunque más estudios son necesarios al respecto. La posible pérdida de *p*-cresol por volatilización y adsorción sobre el lodo fue determinada mediante pruebas abióticas y con lodo estéril. Se vio que en ambos casos, la pérdida de *p*-cresol no fue significativa (7%) bajo estas condiciones experimentales, lo que era esperable dada la fisicoquímica de los compuestos, así como la solubilidad de estos en el agua. El *p*-hidroxibenzaldehído se acumuló gradualmente en el cultivo, aumentando su concentración hasta 22.2 ± 1.8 mg/L durante 5 h y desaparecer después de 12 h. Asimismo, la presencia de *p*-hidroxibenzoato permaneció baja y constante a lo largo de la cinética. Se planteó entonces la posibilidad de que la siguiente etapa de oxidación se hubiera llevado a cabo hasta ácidos grasos volátiles, ya que Zepeda *y col.* (2003 y 2006) reportaron la oxidación de compuestos aromáticos como el benceno, tolueno y *m*-xileno hasta acetato y butirato, por un consorcio nitrificante. Sin embargo, se verificó que no hubo presencia de ninguno de ellos a lo largo de la cinética. A las 24 h de cultivo, la concentración de carbono orgánico total fue muy baja, indicando que los intermediarios fueron consumidos totalmente. Se estableció el siguiente balance de materia de carbono (mg C/L):

$$[\text{HCO}_3^-]_i + [p\text{-cresol}]_i + [\text{CO}_2]_i = [\text{HCO}_3^-]_f + [p\text{-cresol}]_f + [\text{Intermediarios}]_f + [\text{CO}_2]_f + [\text{BM}]_f$$

$$222.1 \pm 5.1 + 21 \pm 0.8 + 11.1 \pm 0.2 = 190.5 \pm 13.2 + 0 + 1.8 \pm 0.7 + 37.1 \pm 2.6 + 6 \pm 0.6$$

Se puede observar que el aumento en la concentración de biomasa producida (BM) fue bajo. El rendimiento de producción de biomasa fue de 0.3 mg C/mg C-consumido, lo cual indicó que el *p*-cresol y sus intermediarios fueron principalmente oxidados de forma desasimilativa sugiriendo una mineralización del *p*-cresol.

Cabe mencionar que en la literatura no existen reportes de mineralización de *p*-cresol por consorcios nitrificantes. Estudios hechos con *Nitrosomonas europaea* muestran la capacidad de la AMO para oxidar compuestos aromáticos (Hyman *y col.*, 1985; Keener y Arp, 1993). Sin embargo, no existe evidencia del rompimiento del anillo aromático por cultivos axénicos. Keener y Arp (1994) señalaron que un cultivo de *Nitrosomonas europaea* oxidó al *p*-cresol y al *p*-hidroxibencilalcohol en ausencia de actividad de la AMO (utilizaron acetileno como inhibidor selectivo), convirtiéndolos cuantitativamente a

p-hidroxibenzaldehído. Los resultados experimentales de Keener y Arp (1994) sugirieron que el *p*-hidroxibencilalcohol es un intermediario en la ruta de oxidación del *p*-cresol, además que otras enzimas presentes en *Nitrosomonas europaea* diferentes a la AMO, participaron en la oxidación del grupo metilo del *p*-cresol. Sin embargo estos mismos autores observaron que la AMO es capaz de oxidar el grupo metilo de algunos compuestos aromáticos como el tolueno y *p*-xileno. El tolueno fue oxidado a bencil alcohol y finalmente a benzaldehído mientras que el *p*-xileno fue oxidado a *p*-metilbencil alcohol, tolualdehído y 1,4-bencenodimetanol. Estos autores indican que su evidencia experimental demuestra que la AMO está involucrada en la oxidación del grupo funcional metilo (-CH₃) unido al anillo aromático. Se encontró que el consorcio nitrificante utilizado por Zepeda *y col.* (2003) fue capaz de oxidar al benceno a fenol y finalmente a acetato. Los autores sugirieron una participación conjunta de las microfloras nitrificantes y organo-heterótrofas en la oxidación del benceno.

Por otro lado, la eliminación aerobia de compuestos fenólicos se ha evaluado en cultivos axénicos organo-heterótrofos. Al respecto, se han realizado estudios en *Pseudomonas putida* sobre su capacidad de oxidar al *p*-cresol sugiriendo la ruta metabólica y encontrando al *p*-hidroxibencilalcohol, *p*-hidroxibenzaldehído y *p*-hidroxibenzoato como intermediarios y CO₂ como producto final (Dagley y Patel, 1952; Heinaru *y col.*, 2000). Se ha aislado la enzima participante en el primer paso de oxidación, conocida como la *p*-cresol metilhidrolasa (Hopper, 1978). Está documentado que bacterias organo-heterótrofas facultativas son capaces de oxidar al *p*-cresol hasta CO₂ (Keat y Hopper, 1978; Pares y Juárez, 1997).

Los resultados del presente trabajo no permiten distinguir si fueron las bacterias litoautótrofas u organo-heterótrofas las responsables de oxidar inicialmente al *p*-cresol. Una posibilidad para entenderlos es que las bacterias amonio oxidantes podrían haber oxidado al *p*-cresol a *p*-hidroxibenzaldehído y posteriormente, éste ser oxidado por bacterias organo-heterótrofas.

Existe la posibilidad que las bacterias organo-heterótrofas presentes en el consorcio nitrificante realicen la oxidación del *p*-cresol desde un inicio. Parece necesario averiguar hasta qué punto participa la microflora nitrificante en la ruta de oxidación del *p*-cresol, y si las bacterias organo-heterótrofas presentes en el consorcio nitrificante están participando. Este tipo de información pudiera contribuir también en entender a

que se debe la inhibición de la nitrificación por presencia de *p*-cresol (inhibición enzimática o competición por O₂ o NH₄⁺).

Con esta finalidad, se formuló un experimento en el que la enzima AMO de las bacterias amonio oxidantes estuviera completamente inhibida por medio de la acción de un inhibidor selectivo. Se decidió utilizar nitrito como inhibidor de la actividad catalítica de la AMO, ya que el efecto del nitrito está documentado en la literatura (Anthonisen *y col.*, 1976; Stein y Arp, 1998; Philips *y col.*, 2002). Los resultados obtenidos se describen a continuación.

4.2.4 Nitrito como posible inhibidor de la nitrificación

Se evaluó el efecto del nitrito sobre la actividad de los cultivos nitrificantes en lote a diferentes concentraciones: 25, 100 y 200 mg N-NO₂⁻/L. La Figura 18 presenta el perfil promedio nitrificante de tres cultivos sin nitrito inicial (control).

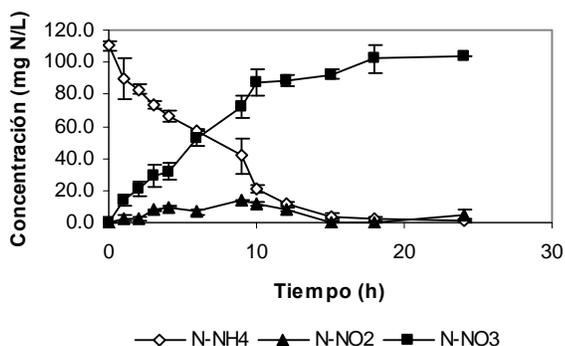


Figura 18. Perfil nitrificante de los cultivos en lote control.

En el cultivo control hubo un completo consumo de N-NH₄⁺ y una análoga producción de N-NO₃⁻. Se observó una formación transitoria de N-NO₂⁻ que posteriormente fue oxidado a nitrato. La eficiencia y el rendimiento del cultivo control se muestran en la Tabla 9. Las velocidades específicas de consumo de amonio y producción de nitrato fueron 0.05 ± 0.001 mg N-NH₄⁺/mg proteína h y 0.05 ± 0.001 mg N-NO₃⁻/mg proteína h, respectivamente. De la misma manera como los cultivos control sin *p*-cresol, el proceso nitrificante se llevó a cabo de una manera adecuada bajo las condiciones

experimentales utilizadas. En la Figura 19 se muestra el perfil nitrificante con 25 mg/L de nitrito.

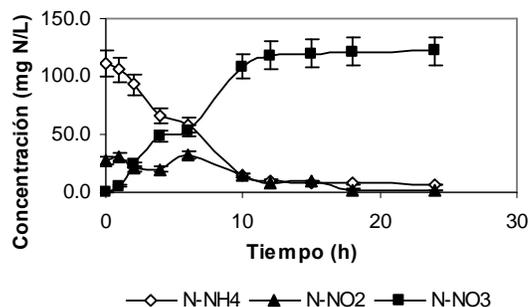


Figura 19. Perfil de un cultivo nitrificante en lote con 25 mg N-NO₂/L.

Se puede observar en el perfil con 25 mg N-NO₂⁻/L inicial, que hubo un completo consumo de N-NH₄⁺ y una concomitante producción de nitrato que alcanzó una máxima concentración a partir de las 10h de cultivo. El N-NO₂⁻ fue oxidado hasta llegar a una mínima concentración a las 12h de cultivo. No hay una diferencia significativa en la E-NH₄⁺ y en el Y-NO₃⁻ entre el cultivo control y con nitrito a 25 mg N-NO₂⁻/L (Tabla 9). La q-NH₄⁺ (0.05 ± 0.005 mg N-NH₄⁺/mg proteína h) del cultivo expuesto al nitrito no presentó cambio significativo respecto al cultivo sin nitrito inicial. Estos resultados muestran que el nitrito (25 mg/L) no pareció tener un efecto inhibitorio sobre la amonio oxidación. Sin embargo, se observó que la velocidad de producción de nitrato (0.07 ± 0.01 mg N-NO₃⁻/mg proteína h) aumentó un 40% respecto a la velocidad específica del cultivo control. Este efecto puede deberse a que la oxidación del nitrito a nitrato es una reacción de primer orden. Cuando se adicionaron 100 mg N-NO₂⁻/L (Figura 20), se observó, al igual que en el cultivo control, un consumo total del amonio a las 24 h de cultivo (Tabla 9). También se observó que la q-NH₄⁺ (0.05 ± 0.005 mg N-NH₄⁺/mg proteína h) y la q-NO₃⁻ (0.05 ± 0.005 mg N-NO₃⁻/mg proteína h) no tuvieron diferencia significativa con las velocidades específicas del cultivo control. Por el contrario el Y-NO₃⁻ disminuyó significativamente (-35%). En el cultivo expuesto a nitrito inicial se acumuló N-NO₂⁻ hasta una concentración máxima de 123 mg N-NO₂⁻/L a las 24 h, de acuerdo con el siguiente balance de nitrógeno (mg N/L):

$$[\text{N-NH}_4^+]_i + [\text{N-NO}_2^-]_i + [\text{N-NO}_3^-]_i = [\text{N-NH}_4^+]_f + [\text{N-NO}_2^-]_f + [\text{N-NO}_3^-]_f$$

$$107 + 102 + 0 \rightarrow 4 + 123 + 79$$

Una parte del amonio oxidado permaneció en forma de nitrito. Esto indica que a una concentración inicial de nitrito de 100 mg/L el proceso de nitrito oxidación se vio afectado.

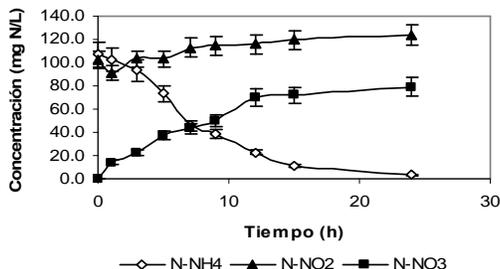


Figura 20. Perfil nitrificante de un cultivo en lote con 100 mg N-NO₂/L.

En el caso del cultivo nitrificante al cual se le adicionó 200 mg N-NO₂⁻/L (Figura 21), el N-NH₄⁺ fue totalmente oxidado a las 24 h, con una E-NH₄⁺ que se mantuvo cercana al 100%, pero el Y-NO₃⁻ disminuyó un 60% (Tabla 9). La q-NH₄⁺ del cultivo con nitrito fue 0.03 ± 0.003 mg N-NH₄⁺/mg proteína h y se determinó un 40% de disminución respecto al cultivo sin nitrito inicial. Mientras que la velocidad de producción de nitrato disminuyó un 60%. A 200 mg N-NO₂/L el nitrito no sólo inhibió el proceso de nitrito oxidación, también parece que tuvo un efecto sobre la velocidad del proceso amonio oxidante.

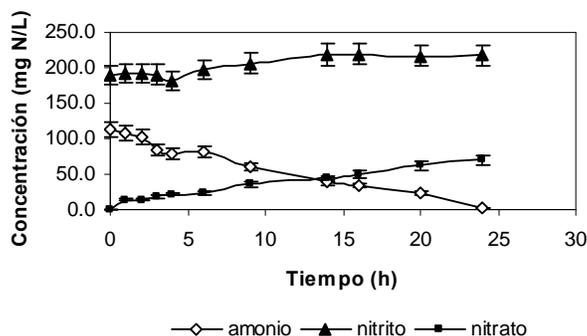


Figura 21. Perfil nitrificante de un cultivo en lote con 200 mg N-NO₂/L.

Tabla 9. Eficiencias de consumo de amonio y rendimientos de producción de nitrato en cultivos en lote en ausencia de nitrito (control) y con diferentes concentraciones de nitrito inicial.

Concentración inicial de N-NO ₂ ⁻ (mg/L)	Eficiencia (%)	Rendimiento
0	98.8 ± 1.8	0.95 ± 0.01
25	93.3 ± 1.8	0.86 ± 0.01
100	96.8 ± 1.9	0.62 ± 0.01
200	98.1 ± 2	0.38 ± 0.01

Por otra parte, la E-NH₄⁺ se mantuvo cercana al 100% en todos los cultivos expuestos al nitrito (Tabla 9), lo cual indicó que el nitrito no inhibió totalmente a la enzima AMO. Por ejemplo, el tiempo de cultivo de 24 h fue suficiente para que el cultivo con 200 mg N-NO₂⁻/L, consumiera totalmente el N-NH₄⁺ a pesar de la disminución en la q-NH₄⁺. El Y-NO₃⁻ disminuyó conforme la concentración en N-NO₂⁻ adicionado aumentó (Tabla 9). Lo anterior podría deberse a un efecto inhibitorio del nitrito sobre la enzima nitrito oxidoreductasa (NOR). En la nitrificación, cuando las velocidades específicas de consumo de amonio y producción de nitrato están acopladas entre ellas, la acumulación de nitrito es mínima. Pero si la velocidad de la nitrito oxidación disminuye, se acumula nitrito, lo que puede interpretarse como posible inhibición de la NOR (Smith *y col.*, 1997).

En la literatura se encuentra información sobre los mecanismos mediante los cuales el nitrito podría inhibir la AMO. Sijbesma *y col.* (1996) indicaron que el nitrito actúa como un desacoplante en la cadena respiratoria. Stein y Arp (1998) sugirieron que la inhibición en la AMO es causada por metabolitos químicos del nitrito como pueden ser el óxido nitroso (N₂O) y óxido nítrico (NO), ya que, de acuerdo con estos autores, estas especies reactivas atacan el centro activo de cobre o hierro de la AMO formando complejos. Al formarse uno de estos complejos, la velocidad catalítica de la enzima puede disminuir por el debilitamiento del enlace entre el O₂ y el sustrato o bien por reducción del sitio activo. Sin embargo estos autores adicionaron de manera externa N₂O y NO al medio y encontraron un escaso efecto en la actividad amonio oxidante, lo cual podría deberse a que el N₂O y NO son poco solubles, de manera que en el equilibrio podrían encontrarse por debajo del umbral inhibitorio. De acuerdo con los mismos autores se tendría un efecto diferente entre los metabolitos químicos del nitrito

producidos por la célula y los adicionados de manera externa. Por otra parte, el nitrito en medios ácidos provoca inhibición en el consumo de amoniaco y se cree que el efecto inhibitorio está más vinculado con el pH, que con una inhibición directa sobre los citocromos de la cadena respiratoria o sobre la AMO (Gómez y col., 1995).

Recordando que el propósito del experimento al adicionar N-NO_2^- a los cultivos nitrificantes en lote fue inhibir totalmente a la enzima AMO, los resultados obtenidos no son enteramente satisfactorios. Las bacterias amonio oxidantes continuaron consumiendo N-NH_4^+ aún a la concentración más alta de N-NO_2^- ensayada. Por lo tanto, es recomendable experimentar con un inhibidor selectivo de la enzima AMO para obtener una inhibición total de ésta y poder comprender mejor la participación de esta enzima y de los microorganismos organo-heterótrofos en la oxidación del *p*-cresol.

5. CONCLUSIONES GENERALES y PERSPECTIVAS

Se determinó una inhibición del proceso nitrificante por el *p*-cresol a una concentración de 25 mg/L, donde las velocidades específicas de consumo de amonio y de producción de nitrato disminuyeron un 30% y 20%, respectivamente. El *p*-cresol afectó en mayor medida la amonio oxidación que la nitrito oxidación. A pesar de la disminución en las velocidades específicas, la eficiencia en el consumo de amonio y el rendimiento de producción de nitrato no fueron alterados. La vía metabólica nitrificante fue la predominante del proceso, ya que se alcanzó un rendimiento cercano a 1.

Se pudo observar que el *p*-cresol fue oxidado por el consorcio nitrificante a dos intermediarios transitorios que se identificaron como el *p*-hidroxibenzaldehído y el *p*-hidroxibenzoato. La oxidación del *p*-cresol fue mayoritariamente desasimilativa y el balance de carbono sugirió una mineralización del *p*-cresol. En el presente trabajo, por primera vez, se ha señalado que por medio de un consorcio nitrificante se puede biotransformar al *p*-cresol hasta CO₂. La velocidad específica de oxidación del *p*-cresol determinada en este trabajo fue más alta (50%) que en la desnitrificación. La nitrificación como la primera etapa en la eliminación de nitrógeno presentaría la posibilidad de oxidar materia orgánica de tipo aromática a velocidades superiores que en otros procesos.

Respecto a los ensayos con nitrito como inhibidor de la amonio oxidación, se observó una disminución en la velocidad específica de consumo de amonio únicamente con una concentración inicial de nitrito de 200 mg N-NO₂⁻/L, pero con una eficiencia de consumo de amonio cercana al 100% en todos los casos (0, 25, 50 y 200 mg N-NO₂⁻/L). El rendimiento de producción de nitrato disminuyó conforme se incrementó la concentración de nitrito, lo cual podría sugerir un efecto inhibitorio del nitrito sobre la enzima nitrito oxidorreductasa, sin embargo, más estudios son necesarios al respecto para entender el fenómeno. Se recomienda utilizar otro inhibidor para obtener una inhibición selectiva y total de la enzima AMO como podrían ser el acetileno o aliltiurea.

De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, surgen las siguientes interrogantes: ¿Es capaz la enzima AMO de las bacterias amonio oxidantes de oxidar al *p*-cresol y hasta qué etapa de la oxidación estaría participando? ¿Los microorganismos organo-heterótrofos pueden oxidar al *p*-cresol estando limitados por un medio de

cultivo idóneo para nitrificantes? Si la posibilidad de que los organo-heterótrofos oxidaron al *p*-cresol se evidenciara, entonces sería interesante investigar por qué el proceso amonio oxidante y nitrito oxidante fueron inhibidos. No obstante, es necesario realizar más estudios sobre las cuestiones anteriores para poder obtener más evidencias y entender de una mejor manera a qué se debe la inhibición de la nitrificación por presencia de compuestos fenólicos, como el *p*-cresol en reactores en lote y continuos. Un mejor entendimiento de la inhibición puede implicar un mejor control de la actividad de cultivos nitrificantes que reciben materia orgánica de tipo aromática. En futuros estudios podría contemplarse el uso de inhibidores selectivos de la enzima AMO en cultivos en lote así como el uso de cultivos en lotes secuenciados donde además de evaluar los aspectos metabólicos, al ser un sistema dinámico, permitiría estudiar un posible cambio poblacional en el consorcio por la adición de *p*-cresol, incluyendo probablemente el uso de técnicas moleculares para este fin.

6. REFERENCIAS

1. Acuña-Arguelles M.E., Olguin-Lora P. y Razo-Flores E. (2003). Toxicity and kinetic parameters of the aerobic biodegradation of the phenol and alkylphenols by a mixed culture. *Biotech. Lett.* **25**, 559-564.
2. Aleem M.I.H. y Sewell D.L. (1981). Mechanism of nitrite oxidation and oxidoreductase systems in *Nitrobacter agilis*. *Current Microbiology.* **5**, 267-272.
3. Almendariz Tapia F. J. (2005). Tratamiento de sosas gastadas en un reactor de lecho expandido de lodos granulares anaerobios (EGSB). Tesis Doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México.
4. Amor L., Eiroa M., Kennes C., Veiga M.C. (2005). Phenol biodegradation and its effect on the nitrification process. *Wat. Res.* **39**, 2915-2920.
5. Anthonisen A.C., Loehr R.C., Prakasom T.B.S. and Srinath E.G. (1976). Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *Journal of Water Pollution Control Federation.* **48**(5), 835-851.
6. Arp D., Sayavedra-Soto L. A. y Hommes N.G. (2002). Molecular biology and biochemistry of ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea*. *Arch. Microbiol.* **178**, 250-255.
7. Arp D. y Stein L.Y. (2003). Metabolism of inorganic N compounds by Ammonia-Oxidizing bacteria. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology.* **38**, 471-495.
8. Bailey J.E. y Ollis D.F. (1986). *Biochemical Engineering Fundamentals*. Second Edition. McGraw-Hill Internationals Editions. Singapore. 55.
9. Bedard C. y Knowles R. (1989). Physiology, biochemistry, and specific inhibitors of CH₄, NH₄⁺, and CO oxidation by methanotrophs and nitrifiers. *Microbiological Reviews.* **53**(1), 68-84.
10. Bock E., Koops H.P., Harms H. y Ahlers B. (1991). The biochemistry of nitrifying microorganism. *Variations in Autotrophic Life*. Editorial Academic press. Londres. 171-200.
11. Bossert I. y Young L.Y. (1986). Anaerobic oxidation of *p*-cresol by a denitrifying bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**(5), 1117-1122.

12. Cervantes-Carrillo F., Pérez J. y Gómez J. (2000). Avances en la eliminación biológica de nitrógeno de las aguas residuales. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. **42**, 73-82.
13. Dagley S. y Patel M.D. (1952). Oxidation of *p*-cresol and related compounds by a *Pseudomonas*. *Biochem. J.* **66**, 227-233.
14. Dalmacija B., Miskovic B., Zivanov Z. y Petrovic O. (1986). Combined Microbiological and Advanced Treatment of Oil Refinery and Municipal Wastewaters. *Water Science and Technology*. **18**(9), 137-146.
15. Davi M.L. y Gnudi F. (1999). Phenolic compounds in surface water. *Wat. Res.* **33**(14), 3213-3219.
16. Day R.A. y Underwood A.L. (1989). *Química analítica cuantitativa*. 5^{ta} Edición. Prentice-Hall Hispanoamericana S.A. pp 808.
17. Dyreborg S., and Arvin E. (1995). Inhibition of nitrification by cresote-contaminated water. *Wat. Res.* **29**(6), 1603-1606.
18. Estadísticas del agua en México. (2005). Comisión Nacional del Agua. 63-76.
19. Frietag A., Rudert M. y Bock E. (1987). Growth of *Nitrobacter* by dissimilatoric nitrate reduction. *FEMS Microbiology Letters*. **48**. 105-109.
20. Gernaey K., Maffei D., Vanrolleghem P. and Verstraete W. (1999). A new pH-based procedure to model toxic effects on nitrifies in activated sludge. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. **74**, 679-687.
21. Gómez J., Lema J.M. y Mendez J.R. (1995). La nitrificación biológica con cultivos axénicos o lodos activados. *CIENCIA* **46**, 507-523.
22. Gómez J., Mendez 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.
23. Goreau, T.J., Kaplan W.A., Wofsy S.C., McElroy M.B., Valois F.W. y Watson S.W. (1980). Production of NO_2^- and N_2O by nitrifying bacteria at reduced concentration of oxygen. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**(3), 526-532.
24. Groeneweg J., Sellner B. y Tappe W. (1994). Ammonia oxidation in *Nitrosomonas* at NH_3 concentrations near *K_m*: Effects of pH and temperature. *Wat. Res.* **28**(12), 2561-2566.
25. Gunderson K. (1966). *Journal of General Microbiology*. **6**, 299.

-
-
26. Häggblom M.M., Rivera M.D., Bossert I.D., Rogers J.E. y Young L.Y. (1990). Anaerobic biodegradation of *para*-cresol under three reducing conditions. *Microb. Ecol.* **20**, 141-150
 27. Hanaki K., Wantawin C., Ohgaki S. (1990*a*). Nitrification at low levels of dissolved oxygen with and without organic loading in a suspended-grow reactor. *Wat. Res.* **24**(3), 297-302.
 28. Hanaki K., Wantawin C., Ohgaki S. (1990*b*). Effects of the activity of heterotrophs on nitrification in a suspended-growth reactor. *Wat. Res.* **24**(3), 289-296.
 29. Heinaru E., Truu J., Stottmeister U. y Heinaru A. (2000). Three types of phenol and *p*-cresol-degrading bacteria isolated from river water continuously polluted with phenolic compounds. *FEMS Microbiology Ecology.* **31**, 195-205.
 30. Hochstein L.I. y Tomlinson G.A. (1988). The enzymes associated with denitrification. *Ann. Rev. Microbiol.* **42**, 231-261.
 31. Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.A., Stanley J.T. y Williams S.T. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9^{na} Edición. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia. 447-450.
 32. Hooper A.B. y Terry K.R. (1973). Specific inhibitors of ammonia oxidation in *Nitrosomonas*. *J. Bacteriol.* **115**(2), 480-485.
 33. Hooper A.B. y Terry K.R. (1977). Hydroxylamine oxidoreductase from *Nitrosomonas*: Inactivation by hydrogen peroxide. *Biochemistry* **16**(3), 455-459.
 34. Hooper A.B., Vannelli T., Bergmann D.J. y Arriero D.M. (1997). Enzymology of the oxidation of ammonia to nitrite by bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek.* **71**, 59-67.
 35. Hopper D.J. y Taylor D.G. (1975). Pathways for the degradation of *m*-cresol and *p*-cresol by *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **122**(1), 1-6.
 36. Hopper D.J. (1978). Incorporation of [¹⁸O]Water in the formation of *p*-hydroxy benzyl alcohol by the *p*-cresol methylhydroxylase from *Pseudomonas putida*. *Biochem. J.* **175**, 345-347.
 37. Hopper D.J., Bossert I.D. y Rhodes-Roberts M. (1991). *p*-Cresol metilhydrolase from a denitrifying bacterium involved in anaerobic degradation of *p*-cresol. *J. Bacteriol.* **173**(3), 1298-1301
 38. Hyman M.R. y Word P.M. (1983) Methane oxidation by *Nitrosomonas europaea*. *Biochem. J.* **212**, 31-37.

-
-
39. Hyman M.R. y Wood P.M. (1985). Suicidal inactivation and labeling of ammonia mono-oxygenase by acetylene. *Biochem J.* **227**, 719-725.
 40. Hyman, M.R., Samson-Smith A.W., Shears J.H. y Wood P.M. (1985) A kinetic study of benzene oxidation to phenol by whole cells of *Nitrosomonas europaea* and evidence for the further oxidation of phenol to hydroquinone. *Arch. Microbiol.* **143** 302-306.
 41. Hynes R.K. y Knowles R. (1982). Effect of acetylene on autotrophic and heterotrophic nitrification. *Canadian Journal of Microbiology.* **28**(3), 334-340.
 42. Jensen H.L. (1950). Effect of organic compounds on *Nitrosomonas*. *Nature.* **165**(4207), 974.
 43. Juliastuti S.R., Baeyens J. y Creemers C. (2003). Inhibition of nitrification by heavy metals and organic compounds: The ISO 9509 test. *Environmental Engineering Science.* **20**(2), 79-90.
 44. Keat M. y Hopper D.J. (1978). *p*-Cresol and 3,5-xyleneol methylhydroxylases in *Pseudomonas putida* N.C.I.B. 9869. *Biochem J.* **175**, 649-658.
 45. Keener W.K. and Arp D.J. (1993). Kinetic studies of ammonia monooxygenase inhibition in *Nitrosomonas europaea* by hydrocarbons and halogenated hydrocarbons in a optimized whole-cell assay. *Applied and Environmental Microbiology.* **59**(68), 2501-2510.
 46. Keener W.K. y Arp D.J. (1994). Transformations of aromatic compounds by *Nitrosomonas europaea*. *Applied and Environmental Microbiology.* **60**(6), 1914-1920.
 47. Khowry N., Dott W. y Kämper P. (1992). Anaerobic degradation of *p*-cresol in batch and continuous cultures by a denitrifying bacterial consortium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**, 529-531.
 48. Kumaran P. y Paruchuri Y.L. (1997). Kinetics of phenol biotransformation. *War Res.* **31**(1), 11-22.
 49. Leu H-G., Lee C-D., Ouyang C.F. y Tseng H-T. (1998). Effects of organic matter on the conversion rates of nitrogenous compounds in a channel reactor under various flow conditions. *Wat. Res.* **32**(3), 891-899.
 50. Lowry O.H., Rosen Brough N.J., Farr A.L. y Randall R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.

-
-
51. McCarty G.W. Modes of action of nitrification inhibitors (1999). *Biol. Fertil Soils.* **29**,1-9.
 52. McTavish H., Fuchs J.A. y Hooper A.B. (1993). Sequence of the gene coding for ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea*. *J. Bacteriol.* **175**, 2445-2447.
 53. Madigan M., Martinko J. y Parker J. (2003). *Brock Microbiología de los Microorganismos*. 10^{ma} edición. Editorial Pearson Prentice Hall. Madrid. 359-360.
 54. Metcalf y Eddy. (1985). *Ingeniería sanitaria: redes de alcantarillado y bombeo de aguas residuales*. 1^{ra} edición. Editorial Labor. Barcelona.
 55. Mével G. y Prieur D. (2000). Heterotrophic nitrification by a thermophilic *Bacillus* species as influenced by different cultures conditions. *Can. J. Microbiol.* **46**, 465-473.
 56. Monroy O., Famá G., Meraz M., Montoya L. y Macarie H. (2000). Anaerobic digestion for wastewater treatment in Mexico: State of the technology. *Wat. Res.* **34**(6), 1803-1816.
 57. Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996. Límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 24 de Junio de 1996.
 58. 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 and Fuels.* **18**, 302-304.
 59. Okabe Y., Oozawa Y., Hirata K. y Watanabe Y. (1996). Relationship between population dynamics of nitrifiers in biofilms and reactor performance at various C:N ratios. *Wat. Res.* **30**(7), 1563-1572.
 60. Oyanedel-Craver V., Ruiz G. y Chamy R. (2005). Nitrite accumulation in activated sludge and airlift reactors: Process performance comparison. *Environmental Engineering science.* **22**(4), 450-458.
 61. Painter H.A. (1970). A review of literature on inorganic nitrogen metabolism in microorganisms. *Wat. Res.* **4**, 393-450.
 62. Papa L. (1998). Criterio de salud ambiental (OMS) N° 168 cresoles. *Acta Toxicológica Argentina* **6**(2), 55-56.
 63. Papen H., von Berg R., Hinkel I., Thoene B. y Rennenberg H. (1989). Heterotrophic nitrification by *Alcaligenes faecalis*: NO₂⁻, NO₃⁻, N₂O and NO production in exponentially growing cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**(8), 2068-2072.

-
-
64. Pares R. y Juárez A. (1997). Bioquímica de los microorganismos. Editorial Reverté. Barcelona. 224-236.
65. Payne W.J. (1973). Reduction of nitrogenous oxides by microorganisms. *Bacteriological Reviews*. **37**(4), 409-452.
66. Philips S., Laanbroek H.J. y Verstraete W. (2002) Origin, causes and effects of increased nitrite concentrations in aquatic environments. *Reviews in environmental science and biotechnology*. **1**, 115-141.
67. Pricnic A., Mahne I., Megusar F., Paul E.A. y Tiedje J. (1998). Effects of pH and oxygen and ammonium concentrations on the community structure of nitrifying bacteria from wastewaters. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**(10), 3584-3590.
68. Prosser J.I. (1989). *Adv. Microbial Physiology* **30**, 125-181.
69. Ramalho J.S. (1996). Tratamiento de aguas residuales. Editorial Reverté S.A.
70. Richardson D.J. y Watmough N.J. (1999). Inorganic nitrogen metabolism in bacteria. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**(2), 207-219.
71. Robertson L., VAN Niel E., Torremans R. y Kuenen J.G. (1988). Simultaneous nitrification and denitrification in aerobic chemostat cultures of *Thiosphaera pantotropha*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**(11), 2812-2818.
72. Schmidt I., Sliemers O., Schmid M., Bock E., Fuerst J., Kuenen J.G., Jetten M. y Strous M. (2003). New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater. *FEMS Microbiology Reviews*. **27**, 481-492.
73. Sijbesma W.F.H., Almeida J.S., Reis M.A.M. y Santos H. (1996). Uncoupling effect of nitrite during denitrification by *Pseudomonas fluorescens*: an in vivo ³¹P-NMR study. *Biotechnology and Bioengineering*. **52**, 176-182.
74. Sikkema J., Poolman B., Konings W.N. y de Bont J.A.M. (1992). Effects of the membrane actions of tetralin on the functional and structural properties of artificial and bacterial membranes. *J. Bacteriol.* **174**, 2986-2992.
75. Sikkema J., de Bont J.A.M. y Poolman B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbial. Reviews*. **59**(2), 201-222.
76. Smith A.J., London J. y Stainer R.Y. (1967). Biochemical basis of obligate autotrophy in blue-green algae and *Thiobacilli*. *Journal of Bacteriology*. **94**(4), 972-983.
77. Smith A.J. y Hoare D. (1968). Acetate Assimilation by *Nitrobacter agilis* in relation to its "obligate autotrophy". *J. Bacteriol.* **95**(3), 844-855.

-
-
78. Smith R.V., Doyle R.M., Burns L.C. y Stevens R.J. (1997). A model for nitrite accumulation in soils. *Soil. Biol. Chem.* (29), 8, 1241-1247.
 79. Soares M.I.M. (2000). Biological denitrification of groundwater. *Water, Air and Soil Pollution*. **123**, 183-193.
 80. Stafford D.A. (1974). The effects of phenols and heterocyclic bases on nitrification in activated sludges. *J. Appl. Bact.* **37**, 75-82.
 81. Stein L.Y., Arp D.J. y Hyman M.R. (1997). Regulation of the synthesis and activity of ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea* by altering pH to affect NH₃ availability. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**(11), 4588-4592.
 82. Stein L.Y. y Arp D.J. (1998). Loss of ammonia monooxygenase activity in *Nitrosomonas europaea* upon exposure to nitrite. *Applied and Environmental Microbiology*. **64**(10), 4098-4102.
 83. Steinmüller W. y Bock E. (1976). Growth of *Nitrobacter* in the presence of organic matter. *Arch. Microbiol.* **108**, 299-304.
 84. Suzuki I., Dular U. y Kwok S.C. (1974). Ammonia or ammonium ion as substrate for oxidation by *Nitrosomonas europaea* cell and extracts. *J. Bacteriol.* **120**(1), 556-558.
 85. Texier A-C. y Gómez J. (2002). Tolerance of nitrifying sludge to *p*-cresol. *Biotechnology Letters*. **24**, 321-324.
 86. U.S. Environmental Protection Agency (U.S. EPA). (1992). Technology Transfer Network. Air toxics web site. Cresol.
 87. Vitousek P.M., Mooney H.A., Lubchenco J. y Melillo M. (1997). Human domination on earth's ecosystems. *Science. New series*. **277**(5325), 494-499.
 88. Yamagishi T., Leite J., Ueda S., Yamaguchi F. y Suwa Y. (2001). Simultaneous removal of phenol and ammonia by an activated sludge process with cross-flow Filtration. *Wat. Res.* **35**(13), 3089-3096.
 89. Zahn J.A., Arciero D.M., Hooper A.B., DiSprito A.A. (1996). Evidence for an iron center in the ammonia monooxygenase from *Nitrosomonas europaea*. *FEBS Letters* **397**, 35-38.
 90. Zepeda A., Texier A-C. y Gómez J. (2003). Bencene transformation in nitrifying batch culture. *Biotechnol. Prog.* **19**, 789-793.

91. Zepeda A., Texier A-C. y Gómez J. (2006). Kinetic and metabolic study of benzene, toluene and *m*-xylene in nitrifying batch cultures. *Wat. Res.* **40**, 1643-1649.

Iztapalapa, D.F. a 22 de Marzo de 2007

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

ESTUDIO FISIOLÓGICO DE LA NITRIFICACIÓN EN PRESENCIA DE *p*-CRESOL

Que presentó

I.B.I. Carlos David Silva Luna

Comité tutorial

Dra. Anne-Claire Texier
Directora, UAM-Iztapalapa

Dr. Jorge Gómez Hernández
Asesor, UAM-Iztapalapa

Dr. Eric Houbron Marty
Asesor, Universidad Veracruzana

H. Jurado

Presidenta: Dra. Florina Ramírez Vives
UAM-Iztapalapa



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



Vocal: Dr. Eric Houbron Marty
Universidad Veracruzana



Vocal: Dr. Frédéric Thalasso Siret
CINVESTAV-IPN

