



UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA-IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

TESIS:

EFFECTO DEL 2-CLOROFENOL SOBRE LA NITRIFICACIÓN

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

PRESENTA:

JESÚS EMMANUEL PÉREZ ALFARO

DIRECTORA:

Dra. FLOR DE MARÍA CUERVO LÓPEZ

ASESORES:

Dra. ANNE-CLAIRE TEXIER

Dr. GERMÁN BUITRÓN MÉNDEZ

MÉXICO, D.F.

ENERO 2010

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 CB-2005-C01-49748/Z.

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.

Efecto del 2-clorofenol sobre la nitrificación

Que presentó:

Q.F.B Jesús Emanuel Pérez Alfaro

Comité tutorial

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

Dra. Anne-Claire Texier Valentin
Asesor, UAM-Iztapalapa

Dr. Germán Buitrón Méndez
Asesor, UNAM

H. Jurado

Presidenta: Dra. Anne-Claire Texier

Secretaria: Dra. Florina Ramírez Vives

Vocal: Dr. Germán Buitrón Méndez

Vocal: Dr. Felipe Martínez Orta

AGRADECIMIENTOS

Agradezco la dirección de la Dra. Flor de María Cuervo López durante la escritura y evaluación de esta tesis, por las horas de dedicación, de discusión y cuestionamiento.

A la Dra. Anne-Claire Texier, Dra. Florina Ramírez, Dr. Germán Buitrón y Dr. Felipe Martínez por su aportación a este trabajo,

Al Dr. Jorge Gómez Hernández por la oportunidad y apoyo para trabajar en el laboratorio de fisiología microbiana.

A los compañeros y amigos del laboratorio de fisiología microbiana, Citlalli Dennys, Emir, Darío, Ricardo, David, Sergio, Darío, Vicente y Diego, gracias por su amistad, el buen ambiente de trabajo y por compartir sus ideas.

Dedicatorias:

A mis padres

Por su apoyo incondicional y el gran amor que siempre me han demostrado.

A mis hermanos

Por su amistad y apoyo incondicional.

A Isabel

Por tu amor, compañía y comprensión durante todo este tiempo.

Índice general

Resumen	I
Abstract	III
Panorama general	IV
1.0 Introducción	1
1.1 Nitrificación.....	1
1.1.2 Microbiología de la nitrificación.....	2
1.1.3 Aspectos bioquímicos y fisiológicos de la nitrificación.....	3
1.1.4 Factores que afectan la nitrificación.....	4
1.1.4.1 Efecto del pH.....	5
1.1.4.2 Efecto del oxígeno.....	5
1.1.4.3 Efecto de la materia orgánica en la nitrificación.....	5
1.5 Degradación de clorofenoles en condiciones aerobias.....	6
1.5.1 Degradación de 2-clorofenol bajo condiciones nitrificantes.....	9
2.0 Justificación y objetivos	11
2.1 Justificación.....	11
2.2 Objetivo general.....	11
2.2.1 Objetivos Particulares.....	11
Materiales y métodos	12
3.1 Cultivo continuo en el reactor de tanque agitado (fuente de inóculo)....	12
3.1.1 Medio de cultivo.....	12
3.2 Cultivo nitrificante en lote.....	13
3.3 Cultivo nitrificante con 2-CP.....	14
3.4 Ensayos abióticos.....	14
3.5 Ensayos de recuperación.....	14
3.6 Técnicas analíticas.....	15
3.6.1 Cuantificación de amonio.....	15
3.6.2 Cuantificación de 2-Clorofenol.....	16
3.6.3 Nitrito y nitrato.....	17
3.6.4 Proteína.....	18
3.6.5 Variables de respuesta.....	19
4.0 Resultados y discusión	20
4.1 Lodo nitrificante en estado estacionario.....	21
4.2 Cinéticas nitrificantes control.....	21
4.3 Proceso nitrificante en presencia de 2-clorofenol.....	23
4.4 Ensayos de recuperación de la nitrificación.....	26
4.4.1 Recuperación después del contacto con 10 mg C-2CP/l.....	26

4.5 Consumo de 2-clorofenol.....	31
5.0 Conclusiones.....	36
6.0 Recomendaciones.....	37
7.0 Bibliografía.....	38

Índice de tablas y figuras.

Tabla 1.1. Trabajos que se han llevado a cabo en condiciones aerobias para la eliminación de clorofenoles.....	8
Tabla 3.1. Composición del medio de cultivo para el reactor de tanque agitado.....	13
Tabla 3.2. Composición del medio de cultivo para el cultivo en lote.....	13
Tabla 3.3. Técnicas analíticas empleadas en la etapa experimental.....	15
Figura 1.1 Esquema del ciclo del nitrógeno.....	1
Figura 1.2. Etapas de reacción para la completa oxidación de amonio hasta nitrato.....	2
Figura 1.3. Ruta de oxidación para el 2-CP y sus isómeros	9
Figura 3.1. Curva estándar de amonio con electrodo de ion selectivo.....	16
Figura 3.2. Curva estándar de 2-clorofenol por HPLC.....	17
Figura 3.3. Curva estándar de nitrito por HPLC.....	17
Figura 3.4. Curva estándar de nitrato por HPLC.....	18
Figura 3.5. Curva estándar de proteína por el método de Lowry.....	18
Figura 4.1. Perfil de la nitrificación en reactor en continuo.....	20
Figura 4.2. Perfil de la nitrificación control.....	22
Figura 4.3. Perfil del consorcio microbiano en presencia de 2-CP.....	24
Figura 4.4. Perfil del lodo nitrificante previamente expuesto a 10mg 2-CP/l.....	27
Figura 4.5. Comparación de las variables de respuesta evaluadas en los ensayos de recuperación del lodo nitrificante previamente expuesto a diferentes concentraciones de 2-CP.....	28
Figura 4.6. Perfil de consumo de 2-clorofenol a diferentes concentraciones.....	32
Figura 4.7. Cromatograma de posibles intermediarios de la oxidación de 2-CP.....	33

Resumen

En el presente trabajo se evaluó y caracterizó, en cultivo en lote, el proceso respiratorio de nitrificación en presencia de diferentes concentraciones de 2-clorofenol (2-CP) (10, 5 y 2.5 mg C-2-CP/l). Se utilizó como inóculo un consorcio fisiológicamente estable que no tuvo contacto previo con dicho compuesto. Posteriormente, con los lodos expuestos al 2-CP se evaluó la recuperación de la actividad nitrificante. En todos los casos se realizaron ensayos control de la nitrificación. El comportamiento fisiológico de los lodos se evaluó mediante la eficiencia de consumo (E_c), el rendimiento de formación de productos (Y_p) y la velocidad específica de consumo de sustrato y formación de productos (q_c y q_p). Los ensayos control indicaron que la eficiencia de consumo de amonio ($E_{C_{NH_4^+}}$) fue del $99.7\% \pm 1.1$, mientras que el rendimiento de producción de nitrato ($Y_{NO_3^-}$) fue de 0.99 ± 0.03 . No se detectó la formación de intermediarios nitrogenados. Las velocidades específicas de consumo de amonio y producción de nitrato fueron 0.135 ± 0.02 y 0.076 ± 0.056 mg N/mg de proteína h, respectivamente. Por lo tanto bajo las condiciones experimentales ensayadas la nitrificación no se vio limitada en ningún aspecto. Los ensayos en presencia de diferentes concentraciones de 2-clorofenol muestran que independientemente de la concentración utilizada, no hay consumo de amonio, ni producción de nitrato, sin embargo, es destacable que el consorcio nitrificante tiene la capacidad de consumir 2-CP al 100% y transformarlo a un intermediario que hasta el momento no ha sido identificado. Los ensayos de recuperación de la nitrificación, indicaron con respecto a un control con lodos sin exposición previa al 2-CP, que las eficiencias de consumo de amonio presentan una disminución de $27.8\% \pm 3.2$ para el caso del lodo expuesto a una concentración de 2.5mg C-2-CP/l y de hasta $89.5\% \pm 0.05$, para el caso del lodo expuesto a una concentración de 10 mg C-2-CP/l. En todos los ensayos hubo acumulación de nitrito, encontrándose $Y_{NO_2^-}$ cercanos a 1 y en ninguno de los ensayos se detectó la producción de nitrato. En lo que se refiere a las velocidades específicas tanto de consumo como de producción, se presentó un nivel de recuperación máximo de 8.5% para los lodos expuestos a 2.5 mg C-2-CP/l y de 1.6% para los lodos expuestos a 10 mg C-2-CP/l. Parece que la actividad de la

enzima amonio-monoxigenasa (AMO) del consorcio nitrificante se vio afectada por la presencia de 2-CP, ya que se observó una disminución de la eficiencia de consumo de amonio de hasta 90%, así como la de la enzima nitrito óxido reductasa, pues se detectó la acumulación de nitrito y una disminución del 100% en el rendimiento de producción de nitrato. Asimismo, la velocidad específica de consumo de amonio sólo se recupera en un 9% en comparación con la reportada para el control, mientras que la velocidad específica de producción de nitrato no se recupera. Es probable de que este compuesto no sólo este actuando a nivel enzimático, ya que se ha reportado que algunos compuestos aromáticos, pueden tener efecto sobre la membrana de las células. Así pues, el 2-CP podría ejercer un efecto adverso sobre el transporte de amonio, evitando que éste pueda ser consumido.

Abstract

Batch culture nitrification process in presence of different concentrations of 2-chlorophenol (2-CP) (10, 5 and 2.5 mg C-2-CP / l) was evaluated. Nitrifying consortium in steady state without previous contact to 2-CP was used as inoculum. Recovery of nitrifying activity of, the sludge exposed to 2-CP was also evaluated. Nitrifying control assays were also performed. The physiological behavior of the sludge was evaluated by means of substrate consumption efficiency (E_c), yield product formation (Y_p), specific consumption rate and specific production rate (q_p and q_c , respectively). Control assays indicated that the ammonium consumption efficiency ($E_{cNH_4^+}$) was $99.7\% \pm 1.1$, while the nitrate production yield ($Y_{NO_3^-}$) was 0.99 ± 0.03 . No nitrogen intermediates were detected. Ammonium and nitrate specific were 0.135 ± 0.02 and 0.076 ± 0.0056 mg protein N/mg h, respectively. Thus under the experimental conditions tested nitrification was not limited. Tests Assays in presence of different concentrations of 2-chlorophenol showed that regardless of the concentration used, no consumption of ammonium and nitrate production was detected. However, the nitrifying consortium was able to completely consume 2-CP and transform it to an intermediary that so far has not been identified. The nitrifying recovery tests indicated that ammonium consumption efficiencies decreased between, $27.8\% \pm 3.2$ and $89.5\% \pm 0.05$ in the assays with sludge exposed to 2.5 C-2-CP/l and 10 mg C-2-CP / l, respectively. Nitrite was accumulated in accounting for a Y_{NO_2} value close to 1. Moreover, nitrate production was not detected. In regard to the specific rates of both, consumption and production, a maximum recovery rate of 8.5% for sludge exposed to 2.5 mg C-2-CP/l and of 1.6% for sludge exposed to 10 mg C-2-CP / l was calculated. These results suggest that the activity of the ammonia-monooxygenase (AMO) and oxide reductase enzymes were affected by the presence of 2-CP, since a decrease of ammonium consumption efficiency up to 90% and a decrease of 100% in nitrate yield production were observed. Likewise, ammonium consumption specific rate was only recovered in 9% compared with the control, while nitrate specific production rate was not recovered. However, substrates transport affectation can't be discarded.

Panorama general

Según una de las estimaciones más aceptadas, poco más del 97% del volumen de agua existente en nuestro planeta es agua salada y está contenida en océanos y mares; mientras que apenas algo menos del 3% es agua dulce o de baja salinidad. Del volumen total de agua dulce, estimado en unos 38 millones de kilómetros cúbicos, poco más del 75% está concentrado en casquetes polares, nieves eternas y glaciares; el 21% está almacenado en el subsuelo, y el 4% restante corresponde a los cuerpos y cursos de agua superficial como lagos y ríos (www.conagua.gob.mx).

Aunque se cuenta con información detallada sobre la cantidad de agua que está disponible para consumo humano, las actividades que el hombre realiza en lo cotidiano, así como en el ramo tecnológico o industrial, han provocado que la problemática de la contaminación de los cuerpos acuáticos vaya en aumento día con día, y que los cursos de agua, arrastren compuestos muy variados y a concentraciones muy diversas. En general, se puede decir que los problemas de contaminación por desechos industriales se agravan por la falta de tratamiento de los efluentes finales, por el gran desarrollo industrial, que genera efluentes más complejos y contaminantes y por la falta de planes reguladores para el establecimiento de industrias. La composición de los efluentes contaminantes varía con el tipo de industria y con el tipo de proceso que se lleva a cabo. Dentro de las sustancias disueltas hay elementos orgánicos que pueden ser biodegradables o no, y/o elementos inorgánicos como sales de amoníaco, fosfatos, etc. (www.ingenieroambiental.com). Estos compuestos pueden repercutir en la salud de muchos seres vivos incluyendo la de los seres humanos.

En 1993, el amonio fue el tercer producto químico de mayor volumen en los EE.UU. El sector agrícola utiliza aproximadamente una tercera parte de lo producido como componente de fertilizantes y alimentación animal. También se utiliza en la fabricación de explosivos, artículos farmacéuticos, plaguicidas, textiles,

cuero, plásticos, caucho y productos petrolíferos. Además, el amonio es un componente importante de muchos productos de limpieza del hogar y productos de blanqueado (Issley y. Lang. 2007), por lo que su presencia como contaminante en aguas residuales municipales es importante. Sin embargo, un gran porcentaje de amonio se genera y desecha por la industria farmacéutica, petroquímica, plástica y química. Particularmente, en la industria química y del refinado del petróleo, se registran concentraciones de hasta 10 g NH_4^+ /l (Prosser, 1989). En ecosistemas acuáticos el amonio es uno de los causantes de la eutrofización, que trae como consecuencia la muerte de organismos por asfixia (Bock y col., 1986; Prosser, 1989). En el hombre genera malestares como dolor de cabeza e incluso desmayos, irritación de ojos, nariz y garganta, además su presencia en el agua la hace difícil de consumir.

Además del amonio, en los efluentes de la industria farmacéutica, petroquímica, maderera y química, los compuestos fenólicos están presentes en altas concentraciones. Por ejemplo, su producción anual promedio en hornos de coque se encuentra entre (mg/l), 28 y 3900; entre 9 y 6800 en procesos de conversión de carbón y entre 2.8 y 1250, en la industria petroquímica, respectivamente (Nemerow y col., 1998). Dentro de los compuestos fenólicos, los halogenados, en particular los clorados como el 2-clorofenol (2-CP), se encuentran contaminando suelos y acuíferos debido a su uso generalizado como parte estructural de pesticidas y preservantes en la industria de la madera. Aunque actualmente su uso para este fin está prohibido en casi todo el mundo, en muchos países madereros, los problemas de contaminación por clorofenoles persisten debido a su elevada vida media en el ambiente (Gallego y col., 1998). En este sentido, autores como (Liu y Parcepavicius 1990), proponen que el 2-CP es uno de los más persistentes en condiciones aerobias, sin embargo debe aclararse que pueden ser muchos los factores que pueden afectar la degradabilidad de los clorofenoles, como el tipo y la concentración de inóculo utilizado.

De lo anterior surge la necesidad de implementar sistemas de tratamiento que permitan eliminar tanto al amonio como al 2-CP de los efluentes industriales. Con

esta finalidad, se han desarrollado sistemas del tipo físico-químico y biológico. Dentro de los tratamientos fisicoquímicos, podemos citar la eliminación del nitrógeno amoniacal por medio del arrastre. Esto se logra ajustando el pH a valores superiores a 10 y aplicando al mismo tiempo una fuerte corriente de aire. A este proceso se le conoce como arrastre del amoniaco y se pueden alcanzar eficiencias de eliminación de hasta un 95%, siempre que el flujo de aire sea muy alto (Gómez y col., 1995). Sin embargo, la desventaja de este proceso es el elevado costo de la aireación y que el amoniaco sólo se separa del efluente pero no se le transforma a un compuesto menos dañino. Para la eliminación fisicoquímica de compuestos de tipo fenólico de las aguas residuales, en general existen tres formas. i) La retención (adsorción) sobre un agente externo cuya reutilización o disposición final esté asegurada, ii) el uso de agentes físicos que destruyen químicamente las moléculas hasta llevarlas a subproductos y, iii) técnicas que se basan en el aprovechamiento de la capacidad de los fenoles para reaccionar con otras sustancias dando lugar a compuestos de menor solubilidad y así poder separarlos del efluente.

En general la desventaja de los procesos físico-químicos es su elevado costo y que el problema sólo se traslada de un lugar a otro, puesto que en el mejor de los casos, los compuestos contaminantes sólo se separan del efluente, pero no se les transforma a un compuesto menos dañino. En este sentido, los procesos biológicos, tienen una gran ventaja, mediante la desnitrificación por ejemplo, que produce nitrógeno molecular a partir de la reducción de nitrito o nitrato, se puede oxidar materia orgánica de tipo fenólica hasta CO_2 (Hernández 2005; Hernández y col., 2008). Otra alternativa importante es la nitrificación, definida como un proceso respiratorio aerobio en donde el amonio, es secuencialmente oxidado a nitrito y posteriormente a nitrato. Aunque se ha reportado que bajo condiciones nitrificantes es posible oxidar cierto tipo de materia orgánica, tanto alifática como aromática, también se sabe que el proceso nitrificante pierde eficiencia y velocidad (Silva y col., 2009). Esto es, aún no se tiene entendido del todo el efecto de la materia orgánica sobre la nitrificación. Asimismo, procesos como el ANNAMOX

(desnitrificación del nitrito con amonio como donador de electrones) y el CANON (es la combinación de realizar una nitrificación parcial con el ANNAMOX en un solo reactor) (Schimidt y col., 2003) pueden eliminar compuestos nitrogenados con alta eficiencia y convertirlos a compuestos inocuos (nitrógeno molecular). Sin embargo, el control de estos procesos puede resultar complicado.

Los trabajos de eliminación de clorofenoles por vía biológica se han llevado a cabo principalmente con bacterias heterótrofas en procesos aerobios (Buitrón y col., 2003) y anaerobios. Bajo estas condiciones, se han sugerido las rutas de oxidación del 2-clorofenol y sus isómeros (Farell y Brid 1990). Aunque se sabe que la nitrificación es un proceso que se ve fuertemente afectado por la presencia de materia orgánica (Keener y Arp 1994; McCarty 1999; Gómez y col., 2000; Zepeda y col., 2003), los estudios realizados sobre el efecto de los compuestos fenólicos como el 2-CP en la nitrificación, son insuficientes. Considerando que la nitrificación es un proceso respiratorio ampliamente utilizado en la primera etapa de eliminación de nitrógeno por vía biológica, resulta de suma importancia obtener información al respecto. Con base en lo anterior y a fin de mantener estable la nitrificación en presencia de 2-CP, el objetivo de este trabajo fue contribuir a la generación del conocimiento acerca del proceso respiratorio de la nitrificación en presencia de 2-clorofenol, mediante la realización de ensayos cinéticos.

1. Introducción

1.1 Nitrificación

La nitrificación se define como un proceso respiratorio aerobio donde se lleva a cabo la oxidación del amonio hasta nitrato vía nitrito mediante dos grupos de bacterias quimiolitotrofas, las amonio oxidantes y nitrito oxidantes, que pertenecen a la familia Nitrobacteraceae (Prosser, 1989). La nitrificación se realiza en dos etapas sucesivas. En una primera etapa de la ruta metabólica, por acción de las bacterias amonio oxidantes, el amonio (NH_4^+) se oxida aeróbicamente a nitrito (NO_2^-). En la segunda etapa, las bacterias nitrito oxidantes, oxidan el nitrito a nitrato (NO_3^-).

En la naturaleza, la nitrificación es un proceso que se lleva a cabo en conjunto con la desnitrificación, formando parte del ciclo del nitrógeno (fig 1.1). Este ciclo mantiene una eficiente recirculación del nitrógeno, pero debido a la enorme generación de amonio por el hombre, la velocidad de recirculación de este elemento puede verse disminuida y causar grandes problemas ambientales, por lo que identificar las etapas limitantes de dicho proceso ayudaría a acelerar este ciclo geoquímico tan importante. Aunque se han logrado grandes avances en el entendimiento del proceso nitrificante, aun faltan muchos estudios, sobre todo en lo que compete a la fisiología de los inóculos que se utilizan en este sistema.

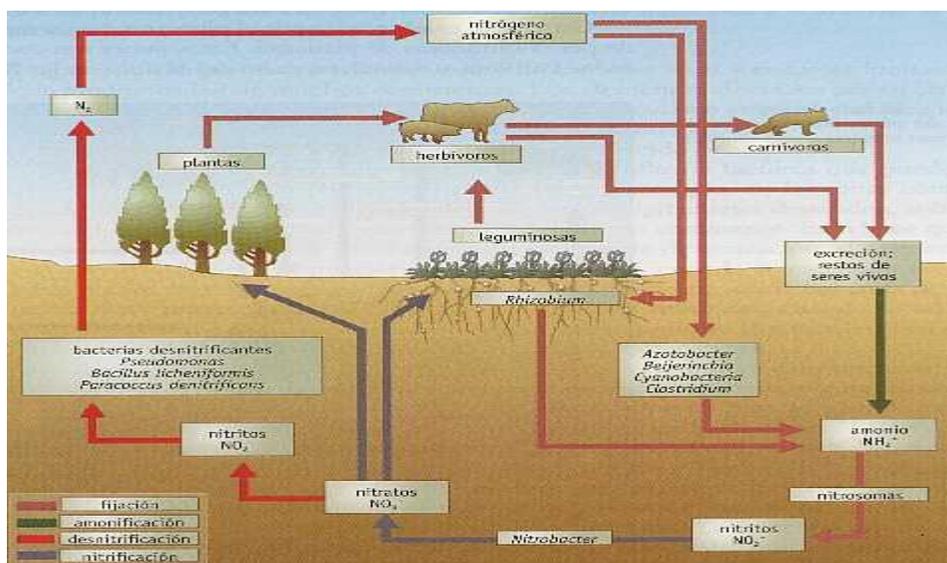


Figura 1.1 Esquema del ciclo del nitrógeno.

1.1.2 Microbiología de la nitrificación

Las bacterias nitrificantes se pueden dividir en dos grupos. En el primero encontramos a las bacterias amonio oxidantes, que incluyen a los géneros de *Nitrosococcus*, *Nitrosospira*, *Nitrosovibrio*, *Nitrosomonas* y *Nitrosolobus* (Bock y col., 1991). Estos géneros están ampliamente distribuidos en la naturaleza ya que se han localizado en ríos, suelos y mares. El más estudiado es *Nitrosomonas*, y se describen como bacterias gram negativas con diversas morfologías (cocos, bacilos y espirales), que pueden desarrollarse preferentemente en un intervalo de temperatura que va desde 25 a 30 °C, en valores de pH entre 7.5 y 8.0 y que pueden tolerar concentraciones de amonio que van desde 36 a 900mg/l (Bock y col., 1991). En cuanto a las que participan en la segunda etapa, las nitrito oxidantes, se han identificado géneros tales como: *Nitrococcus*, *Nitrobacter*, *Nitrospira*, *Nitrospina*, de los cuales *Nitrobacter* es el más estudiado (Prosser y col., 1989). También son gram-negativas y con morfologías de cocos y bacilos. En general son microorganismos mesofilos y su mejor actividad se registra a valores de pH neutro a alcalino. Estos géneros se han aislado principalmente en ambientes marinos y en el caso de *Nitrobacter* se ha aislado de rocas, suelos y ríos (Bock y col., 1991).

1.1.3 Aspectos bioquímicos y fisiológicos de la nitrificación

Hasta el momento no se ha identificado una bacteria capaz de oxidar completamente el amonio (NH_4^+) hasta nitrato (NO_3^-), y se ha observado que la nitrificación puede dividirse en tres pasos (figura 1.2) los cuales los llevan a cabo los diferentes géneros antes mencionados.

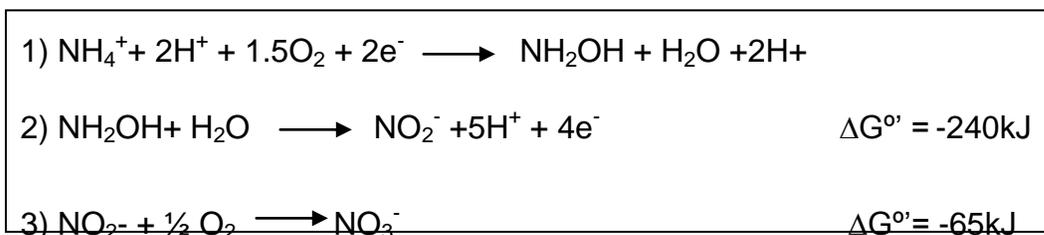


Figura 1.2. Etapas de reacción para la completa oxidación de amonio hasta nitrato.

En la primera etapa se da la conversión de NH_4^+ a hidroxilamina (NH_2OH) por la enzima amonio-monooxigenasa (AMO) (Castingnetti y Hollocher, 1985). Esta reacción requiere de oxígeno molecular (O_2) y parece ser que la enzima está asociada a las proteínas de la membrana, aunque esto último no ha sido totalmente demostrado, ya que la enzima pierde parte de su actividad al ser aislada (Bedard y Knowles 1989). Se ha visto que la AMO está constituida por tres polipéptidos que fueron clasificados como AmoA, AmoB y AmoC, los cuales fueron identificados por medios bioquímicos y genéticos (Arp y Stien, 2003). Se cree que el polipéptido AmoA contiene el sitio catalítico para la oxidación del NH_4^+ , el AmoB fue aislado a la par del primero y se sabe que los genes que codifican tanto A y B son amoA y amoB. En cuanto a AmoC, la evidencia de su existencia es indirecta, ya que los genes que codifican a las tres subunidades son co-transcritos en un solo ARNm (Arp y col., 2002). Además esta enzima, aparentemente es capaz de oxidar compuestos orgánicos de bajo peso molecular como el propano, benceno, ciclohexano y fenol, entre otros (Hynes y Knowles 1978). Se ha sugerido que el cobre es el cofactor de dicha enzima basándose principalmente en la evidencia de que al poner extractos libres de células en presencia de cobre y en condiciones nitrificantes, la AMO se reactiva (Arp y col., 2002).

La oxidación de la hidroxilamina a nitrito (segunda etapa), se lleva a cabo por la actividad de la enzima hidroxilamina óxido-reductasa, que se ha estudiado principalmente en el género *Nitrosomonas*. Esta enzima es una proteína con grupos hemo (Andersson y col., 1984) y está localizada en el periplasma. Cataliza la deshidrogenación de la hidroxilamina formando ácido nítrico (HNO_3), el cual de manera espontánea da lugar a la formación transitoria de óxido nitroso (N_2O) y en menor proporción a óxido nítrico (NO) (Blackmer y col., 1980). La oxidación de la hidroxilamina es el paso donde las bacterias amonio oxidantes obtienen su energía (ATP). En total se obtienen 4 electrones en la oxidación del amonio a nitrito (NO_2^-), en donde 2 de ellos son utilizados en la formación de la hidroxilamina, siendo por lo tanto sólo 2 los electrones que generan energía. El

cambio de energía libre (ΔG°) para la reacción global de oxidación de NH_4^+ a NO_2^- es de -240 kJ/reacción (Madigan y col., 2003). Dado el valor bajo de ΔG° se puede pronosticar que el crecimiento de las bacterias amonio oxidantes será también muy bajo y estará limitado por la disponibilidad energética (Gómez y col., 1995).

Por último, la oxidación de nitrito a nitrato (NO_3^-), se ha estudiado en los géneros *Nitrococcus*, *Nitrobacter*, *Nitrospira*, *Nitrospina*, (Watson y col., 1989). Se sabe que se lleva a cabo por un complejo enzimático formado por el citocromo C, una ubiquinona y una deshidrogenasa dependiente de $\text{NADH}+\text{H}^+$ y se requiere de media molécula de oxígeno ($1/2 \text{O}_2$). Este complejo es inducible y se conoce como nitrito óxido reductasa (Stouthamer, 1976). Desde el punto de vista energético se ha visto que el par $\text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$ formado por la nitrito óxido-reductasa genera un potencial de $E^\circ_0 = + 430 \text{ mV}$, el cual se emplea en la fosforilación oxidativa y para la reducción de NAD. 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 en esta etapa de la nitrificación, el crecimiento bacteriano sea aún más bajo.

1.1.4 Factores que afectan la nitrificación

Como cualquier proceso biológico, la nitrificación está condicionada al ambiente que la rodea. Por ejemplo, se sabe, que la eficiencia de la transformación de amonio a nitrato puede estar determinada por la concentración de oxígeno, pH, temperatura y también por la presencia del mismo sustrato (amonio) o de materia orgánica como el acetileno dada la afinidad de la enzima amonio mono-oxigenasa por este tipo de compuestos (Hynes y Knowles 1982). Si la nitrificación se ve afectada por cualquiera de estos factores, se puede dar lugar a la acumulación de nitrito, óxido nitroso o ácido nítrico, compuestos que resultan tóxicos para el proceso (Lema y col., 1996) y pueden afectar el proceso nitrificante.

1.1.4.1 Efecto del pH

Watson (1974), reporta que el intervalo óptimo de pH para el crecimiento de los organismos amonio oxidantes es de 5.8-8.5 y para las bacterias nitrito oxidantes de 6.5-8.5. Se tiene evidencia que por debajo de dichos valores la velocidad específica de crecimiento de las nitrito oxidantes disminuye abruptamente (Keen y Prosser 1987) y que a valores de pH menores que 5 la nitrificación se detiene por completo (Prosser, 1989). En parte esto es debido a que el pH influye en la disponibilidad del sustrato, ya que se ha observado que el sustrato para las amonio oxidantes puede ser el amoniaco (Watson y col., 1981), por lo que la disminución del pH provocará que la especie predominante sea el amonio. Asimismo, se ha visto que la disminución de la actividad nitrificante a pH menores que 5 también se atribuye a la acumulación de ácido nitroso (HNO_2), el cual inhibe la oxidación del amonio. Aunque también se dice que la reducción en el valor del pH afecta la actividad enzimática (Anthonisen y col., 1976).

1.1.4.2 Efecto del oxígeno

La nitrificación es un proceso que requiere de oxígeno molecular para la oxidación del amonio y para la respiración tanto de las amonio como de las nitrito oxidantes (Prosser, 1989). Aunque existen reportes donde se sugiere que la nitrito oxidación puede verse más afectada que la amonio oxidación por la baja disponibilidad de oxígeno (Gunderson 1966). Autores como Helder y Vries (1983) reportan que la amonio oxidación se ve inhibida a concentraciones cercanas a $30 \mu\text{mol l}^{-1}$ mientras que la nitrito oxidación a $125 \mu\text{mol l}^{-1}$.

1.1.4.3 Efecto de la materia orgánica en la nitrificación.

Se tiene conocimiento que tanto en cultivos axénicos como en lodos nitrificantes, la nitrificación es un proceso sensible a la presencia de materia orgánica, pero con diferente magnitud en función del tipo y de la concentración del compuesto orgánico, así como del tipo de cultivo. Desde la década de los 80, se ha estudiado

el efecto de la materia orgánica sobre el proceso nitrificante, proponiéndose dos posturas. Una en la que se dice que la presencia de materia orgánica favorece el crecimiento de organismos heterotróficos sobre los microorganismos nitrificantes (Michael y col., 1985; Daigger y col., 1985). Así pues, se propone que la presencia de la materia orgánica ocasiona la disminución en la eficiencia nitrificante al desviar el proceso respiratorio a uno asimilativo. La otra postura propone un efecto directo sobre las enzimas nitrificantes. Al respecto, Eilersen y col., (1994); Takai y col., (1997) y Gómez y col., (2000), observaron en cultivos en lote, que al adicionar diferentes ácidos grasos volátiles (AGVs) y en diferentes concentraciones, se acumula nitrito y se disminuye la velocidad nitrificante a lo cual los autores sugieren un efecto inhibitorio sobre las enzimas nitrificantes, aunque no dejan claro sobre cuál enzima puede darse dicha inhibición. Por otra parte Kenner y Arp. (1994) realizaron ensayos con *Nitrosomonas europaea* en los cuales observaron que si la concentración de materia orgánica se aumentaba, el proceso nitrificante se veía afectado en la oxidación de amonio. Los autores proponen una competencia entre el amonio y la materia orgánica por el sitio activo de la enzima encargada de la oxidación del amonio (inhibición competitiva), o bien, que la materia orgánica se une al sitio activo de la enzima cambiando su configuración espacial y alterando su capacidad oxidativa.

Zepeda y col., (2003) evaluaron en un consorcio nitrificante el efecto de diferentes concentraciones de benceno sobre el proceso nitrificante, encontrando que con una concentración de 10mg C-2CP/l, el rendimiento de producción de nitrato disminuye en 53% y las velocidades específicas de consumo de amonio y producción de nitrato caen hasta un 82 y 74% respectivamente. Estos resultados muestran, que el proceso de nitrificación se puede ver fuertemente comprometido al encontrar un efluente que contenga amonio y compuestos aromáticos, por lo que sería muy recomendable obtener más información que permitiera conocer y entender más a fondo el efecto inhibitorio de la materia orgánica.

1.5 Degradación de clorofenoles en condiciones aerobias.

En la literatura (Buitrón y col., 1998; Schmidt y col., 1999; Jechorek y col., 2003) se indica que la degradación biológica de los clorofenoles requiere de tiempos de

residencia muy altos, típicamente dos órdenes de magnitud mayores que en un proceso químico, aunque se debe considerar que el proceso biológico precisa de condiciones menos drásticas de operación que en proceso químico. Por ejemplo, se han considerado tiempos de 32 días para una eliminación prácticamente total de pentaclorofenol (PCP) mediante un tratamiento biológico por un cultivo axénico (Schmidt y col., 1999). Como una alternativa a la elección de cultivos puros, se han utilizado cultivos mixtos (consorcios) aclimatados a diferentes clorofenoles como el 4, el 2,4-clorofenol entre otros (Jechorek y col., 2003; Kargi y Eker, 2004; Young y col., 2002). Así se han degradado clorobenceno (Jechorek y col., 2003), 1,2-dicloroetileno y 1,1- dicloroetano (Young y col., 2002) y 2,4-diclorofenol (Kargi y Eker, 2005). Sin embargo, su eliminación sigue presentando un reto muy grande, ya que estos compuestos pueden resultar tóxicos para los organismos con los que se pretende eliminarlos.

Existe información respecto a la degradación de clorofenoles tanto en condiciones aerobias (Basu y Oleszkiewicz 1995; Fava y col., 1995) como anaerobias (Bae y col., 2002), incluso combinando ambos sistemas (Macarie y col., 1995). De acuerdo a Hale y col. (1994) y dependiendo de las condiciones ambientales, pueden hacerse algunas generalizaciones:

- Los clorofenoles, comparados con los compuestos fenólicos no sustituidos, son mucho más estables en el medio ambiente.
- A medida que aumenta el número de unidades de cloro en la molécula, la tasa de descomposición aerobia disminuye, mientras que lo contrario es generalmente verdadero para la degradación anaerobia.
- Bajo condiciones aerobias, los compuestos conteniendo cloro en posición meta respecto del grupo hidroxilo, son más persistentes comparados con aquellos que no tienen cloro sustituidos en posición meta.

Liu y Parcepavicius (1990) proponen que el 2-CP es uno de los clorofenoles más persistentes en condiciones aerobias, sin embargo debe aclararse que pueden ser

muchos los factores que pueden afectar la degradabilidad de los clorofenoles, como el tipo de reactor o el tipo de inóculo utilizado, por ejemplo. Estos autores encontraron que la biodegradabilidad de algunos de estos compuestos fenólicos presenta el siguiente orden:

Fenol > 2,4-diclorofenol > 4-clorofenol > 2,4,6-triclorofenol > pentaclorofenol > 2-clorofenol.

Los resultados de algunos trabajos en los cuales se ha evaluado el consumo o eliminación de 4-clorofenol, 2-clorofenol, 2,4-diclorofenol, 2,4,6-triclorofenol y pentaclorofenol en condiciones aerobias (no necesariamente nitrificantes) se muestran en la tabla 1.1.

Tabla 1.1.- Algunos trabajos que se han llevado a cabo en condiciones aerobias para la eliminación de clorofenoles.

Referencia	Compuesto	Condiciones	Reactor	Ec.	Y	q	SSV
Basu y Oleszkiewicz(1995)	2CP (30 mg/l)	aerobias	SBR	99	-	-	2.0
Fava y col.,(1995)	2CP (140mg/l)	aerobias	Matraces EM	90	-	-	-
Farebagoli y col., (2008)	2CP (40mg/l)	aerobias	SBR	50			2.0
Moreno y col., (2003)	4CP 350-7000 mg /l	aerobias	SBR	99	-	-	2.0
Moreno y col., (2004)	4CP 50,100 y200 mg /l	aerobias	SBR ayuno	99	*	28 55 41	2.5
Macarie y col., (1995)	Pentaclorofenol 150mg/l	aerobio anaerobio	Hibrido de flujo asendente	95	*	-	26.7
Quan y col., (2003)	2,4-DCP	aerobias	SBR inmovilizado	90	-	35 48 58	2.8

Ec) eficiencia de consumo (%), Y) rendimiento, q) velocidad específica de consumo (mg CP/mg SSV*h), SSV) sólidos suspendidos volátiles, (*) reportan intermediarios.

Como puede verse, en la mayoría de los trabajos se reportan eficiencias de consumo entre el 50 y 99%, independientemente del grado de cloración que tenga el anillo aromático, sin embargo en pocos trabajos son mencionados los rendimientos y las velocidades específicas de consumo y producción. El conocer estos parámetros bajo condiciones nitrificantes, nos ayudaría a entender mejor el efecto de dichos compuestos sobre el proceso respiratorio y su posible eliminación.

Farrell y Brid (1990) proponen bajo condiciones aerobias, una posible ruta de oxidación del 2-CP y sus isómeros el 3 y 4-clorofenol (figura 1.3). Para los 2 primeros se observó la formación de catecoles, en específico el 3-clorocatecol, el cual posteriormente mediante, una oxigenasa, forma el ácido 5-cloroformil-2-hidroxi-penta-2,4-dienoico. Este compuesto ha sido determinado como suicida, ya que inactiva a la enzima dioxigenasa, resultando por tanto en la acumulación del 3-clorocatecol. En el caso del 4-CP los autores proponen su completa oxidación debido a que por la acción de dioxigenasas, una vez roto el anillo bencénico, es posible su posterior incorporación al ciclo de los ácidos tricarbóxicos. Considerando que la nitrificación es un proceso aerobio, cabe la posibilidad que se presente la ruta metabólica propuesta por Farrell y se formen compuestos suicidas que podrían complicar aún más el que la nitrificación se lleve a cabo exitosamente.

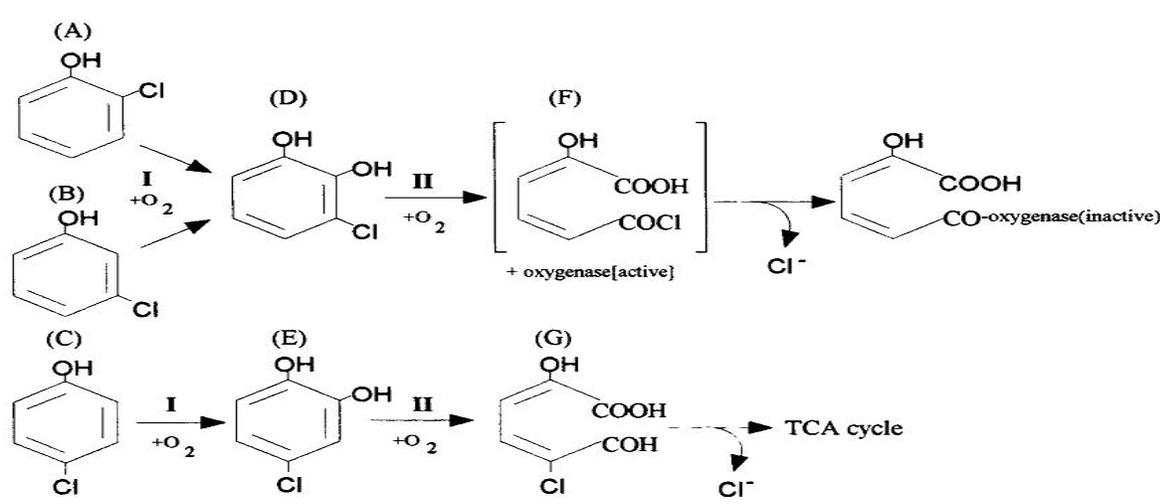


Figura 1. 3.- Ruta de oxidación para el 2-CP y sus isómeros, propuesta por Farrell y col. (1990).

1.5.1 Degradación de 2-clorofenol bajo condiciones nitrificantes.

Además de que la nitrificación se encarga de la oxidación del amonio, también se ha observado que este proceso, ya sea utilizando consorcios microbianos o bien cultivos axénicos (Keener y Arp 1994), es capaz de oxidar materia orgánica como etanol, acetato y también compuestos aromáticos como el Benceno (Zepeda y col., 2003) *p*-xileno, estireno (Keener y Arp. 1994), tolueno, *m*-xileno (Zepeda y

col., 2006, 2007), fenol (Pérez, 2007; Pérez y col., 2008) y *p*-cresol (Texier y Gomez. 2002, 2007; Silva, 2007; Silva y col., 2009). Se cree que la enzima amonio mono-oxigenasa tiene relación con la oxidación de este tipo de sustratos (Keener y Arp 1994). Sin embargo, en el caso de los consorcios nitrificantes, no está claramente definido el papel de las bacterias nitrificantes, pues en este caso, los organismos heterótrofos podrían ser los responsables de la oxidación de la materia orgánica.

Son pocos los reportes en la literatura sobre el proceso respiratorio nitrificante en presencia de 2-clorofenol. Satoh y col. (2005), utilizando microelectrodos y una biopelícula nitrificante, reportan que el 2-CP inhibe el consumo de amonio y oxígeno. Inui y col. (2002), utilizando un cultivo de *Nitrosomonas* como biosensores para la presencia de clorofenoles en un sistema de tratamiento de aguas municipales, encuentran que 0.9 mg/l de 2-clorofenol disminuye un 10% la actividad nitrificante. Sin embargo, no hacen mención a la producción de nitrito o nitrato o al destino del 2-CP. Es importante entonces evaluar el efecto del 2-CP sobre el proceso nitrificante mediante eficiencias de consumo, rendimientos de generación y velocidades específicas, a fin de mantener estable la nitrificación en presencia de 2-clorofenol. Asimismo, sería importante evaluar la posible oxidación del 2-clorofenol y conocer el destino de dicho compuesto bajo condiciones nitrificantes.

2.0 Justificación y objetivos

2.1 Justificación

Considerando que es inevitable la presencia de compuestos orgánicos en las aguas residuales y los efectos negativos que la materia orgánica puede tener sobre la nitrificación, es de suma importancia el control de la misma en un sistema de tratamiento de aguas residuales por nitrificación. En la literatura aún no se cuenta con información suficiente sobre la fisiología del proceso nitrificante en presencia de 2-clorofenol. Asimismo, en los pocos trabajos existentes, no se incluyen datos cinéticos como velocidades específicas de consumo de amonio y producción de nitrato que permitan entender si son afectados los procesos de amonio y nitrito oxidación. Así pues, a fin de mantener estable la nitrificación en presencia de 2-clorofenol, es necesario evaluar el efecto del mismo sobre el proceso nitrificante. Asimismo, teniendo en cuenta la posible oxidación del 2-clorofenol, sería importante conocer el destino de dicho compuesto bajo condiciones nitrificantes.

2.2 Objetivo general.

- Evaluar el efecto del 2-clorofenol en el proceso nitrificante.

2.2.1 Objetivos particulares.

- Evaluar en cultivos nitrificantes en lote:
 - El efecto de diferentes concentraciones de 2-CP sobre el proceso respiratorio.
 - La posible oxidación de 2-CP por el consorcio nitrificante.

3.0 Materiales y métodos.

Para la realización del presente trabajo, se mantuvo un reactor nitrificante alimentado en continuo, a fin de obtener un inóculo nitrificante en estado estacionario. Posteriormente, se llevaron a cabo ensayos en cultivo en lote. A continuación se describen.

3.1 Cultivo continuo en el reactor de tanque agitado (fuente de inóculo).

Se utilizó un reactor de tanque agitado (Bioflo 2000 Fermentor) de la marca New Brunswick Scientific Co. Edison New Jersey USA, con una capacidad de 10 l para llevar a estado estacionario un consorcio nitrificante que posteriormente fue utilizado como inóculo.

El reactor en continuo se operó bajo las siguientes condiciones: volumen de trabajo de 6L, temperatura de 30 °C, agitación de 200 rpm, relación carbono/nitrógeno (C/N) de 2.5, tiempo de residencia hidráulica (TRH) de 2 d, pH de 7.6 ± 0.4 , con una velocidad de carga de nitrógeno de amonio de 150 mg/l.d. Se determinaron las eficiencias de consumo de sustrato, rendimientos de generación de producto y las velocidades de consumo de amonio y producción de nitrato a lo largo de 80 días de operación. Se consideró que el lodo alcanzó el estado estacionario cuando las velocidades de consumo y producción tuvieron una variación menor que el 10%.

3.1.2 Medio de cultivo.

Para evitar la posible precipitación de los componentes y evitar el crecimiento de organismos dentro de los tanques de alimentación, el medio de cultivo que se utilizó para alimentar el reactor se dividió en dos soluciones A (fuente de nitrógeno) y B (fuente de carbono) (Tabla 3.1), el flujo de alimentación para los medios fue 1.6 y 1.5 l/d respectivamente. La composición de ambos fue la siguiente:

Tabla 3.1. Composición del medio de cultivo para el reactor de tanque agitado.

A	(g/l)	B	(g/l)
(NH ₄) ₂ SO ₄	(5.9)	NaHCO ₃	(9.3)
NH ₄ Cl	(4.8)	CaCl	(0.5)
KH ₂ PO ₄	(7.0)	FeSO ₄	(0.15)
MgSO ₄	(3.0)		
NaCl	(5.0)		

3.2 Cultivo nitrificante en lote.

Los ensayos en lote se realizaron en botellas serológicas de 160 ml de capacidad con un volumen de trabajo de 100 ml y 60 ml de espacio de cabeza. Se agregaron los medios de cultivo indicados (Tabla 3.2), 25 ml de A y 25 ml de B, 0.5 ml de FeSO₄, 30 ml de inóculo y 20 ml de agua destilada para completar 100 ml en total y tener una concentración de 100 mg N-NH₄/l y 250 mg C-NaHCO₃/l. La C/N resultante fue de 2.5. Se burbujeó oxígeno durante dos minutos, se inocularon con aproximadamente 200 ± 9.8 mg de proteína bacteriana/l, proveniente del reactor nitrificante de tanque agitado en estado estacionario (previamente lavado con solución fisiológica), la botella se selló y nuevamente se introdujo oxígeno durante dos minutos. El pH del medio fue de 7.5 ± 0.3, la temperatura de 30 °C y la agitación de 200 rpm. Bajo estas condiciones de operación se realizaron cinéticas para observar el proceso nitrificante y utilizarlas a manera de control.

Tabla 3.2. Composición del medio de cultivo para el cultivo en lote.

A	(g/l)	B	(g/l)
(NH ₄) ₂ SO ₄	(0.95)	NaHCO ₃	(7.0)
NH ₄ Cl	(0.77)	CaCl	(0.04)
KH ₂ PO ₄	(1.12)	FeSO ₄	(0.15)
MgSO ₄	(0.8)		
NaCl	(0.8)		

Todos los ensayos se realizaron por duplicado, se tomó una muestra a diferentes tiempos durante 48h, cada botella correspondió a una medición independiente y fue desechada posterior a su análisis.

3.3 Cultivo nitrificante con 2-CP

La evaluación del efecto de diferentes concentraciones de 2-CP (10, 5 y 2.5 mg C-2-CP/l) sobre el proceso nitrificante, se llevó a cabo en las mismas condiciones a las ya descritas para los ensayos control en lote. Todos los ensayos se realizaron por duplicado, en donde cada botella correspondió a una medición independiente y fue desechada posterior a su análisis. Se mantuvo una relación (C/N) de 2.5. Las botellas fueron incubadas al menos durante 40 días tomando muestras a diferentes tiempos.

3.4 Ensayos abióticos

Los ensayos abióticos también se llevaron a cabo en botellas serológicas y utilizando el mismo medio de cultivo que en los ensayos anteriores, pero en ausencia de biomasa. Estos se realizaron para conocer la pérdida de 2-CP por agitación y por aireación en un sistema abierto y cerrado. Para ambos casos el procedimiento fue el siguiente: se puso el 2-CP en concentraciones de 2.5 y 10 mg C/l, se agitó a 200 rpm durante 10 min y se determinó la concentración final de 2-CP por medio de HPLC. Para la pérdida por aireación se utilizaron también 2.5 y 10 mg C/l y se aireó por medio de una bomba para acuario con un flujo aproximado de 2L/min durante 10 min, posteriormente, se determinó la concentración de 2-CP.

3.5 Ensayos de recuperación

Después de realizar los ensayos de la nitrificación en presencia de 2-CP, se evaluó el grado de impacto de este compuesto sobre el consorcio nitrificante, por

lo que los lodos con previa exposición al 2-CP se lavaron con solución fisiológica y se pusieron en condiciones similares a las ya descritas para los ensayos control. A excepción del tiempo de cultivo ya que este se amplió de 48 hasta 250 horas. El desempeño del consorcio previamente expuesto al 2-CP fue comparado con el del ensayo control.

3.6 Técnicas analíticas

Las técnicas analíticas que se emplearon en el desarrollo experimental de este trabajo se muestran en la Tabla 3.3.

Método	Determinación	R ²	C.V %
Electrodo de ion selectivo	Nitrógeno amoniacal (N-NH ₄ ⁺).	0.998 ± 0.02	5.5
HPLC	2-clorofenol.	0.999 ± 0.05	2.2
HPLC	Nitrito y nitrato (NO ₂ ⁻ NO ₃ ⁻).	0.999 ± 0.05	7.3
Lowry	Proteína	0.978 ± 0.02	10.1

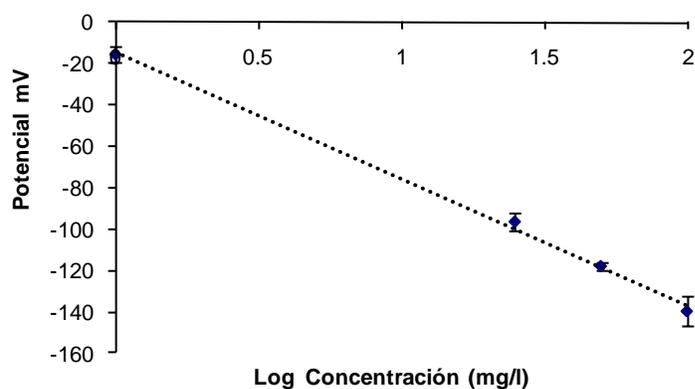
Tabla 3.3. Técnicas analíticas empleadas en la etapa experimental.

Se realizaron curvas de calibración al menos por triplicado y se calculó promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para la pendiente, ordenada al origen y coeficiente de regresión. A continuación se desglosan cada una de las técnicas analíticas empleadas con su respectiva curva de calibración.

3.6.1 Cuantificación de amonio

Para cuantificar amonio, se utilizó un electrodo selectivo de amoniacal (Phoenix electrode Co). La lectura del potencial (mV) generado por el electrodo se registró con un potenciómetro (Cole-parmer, DigiSense). El valor del potencial es proporcional al logaritmo de la concentración cuyo valor puede ser calculado directamente de la ecuación de la recta. Se tomó un volumen de muestra de 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 (300 rpm) y temperatura ambiente, se tomó la lectura del potencial (mV) cuando fue estable (aproximadamente 3 min. después de agregar el NaOH). En la Figura 3.1, se muestra un ejemplo de curva estándar para la determinación de amonio (0 a 100 mg N-NH₄⁺/l).



$$y = -62.927x - 13.094 \quad R^2 = 0.996$$

Figura 3.1. Curva estándar de amonio con electrodo de ion selectivo.

3.6.2 Cuantificación de 2-clorofenol

El 2-clorofenol y los intermediarios que se formaron tras su oxidación se determinaron por HPLC (Perkin Elmer serie 200) utilizando una columna C-18 fase reversa (Varian Crompack) y un detector UV-visible a una longitud de onda de 274 nm. Se utilizó una fase móvil compuesta por acetonitrilo y agua (60:40, v:v), a un flujo de 1.5 mL/min. La fase móvil fue filtrada (0.45 µm) y desgasificada. A partir de una solución madre se realizaron las soluciones estándar con 1, 5, 10, 15 y 20 mg C-clorofenol/L. Todas las diluciones se hicieron con agua desionizada y las soluciones fueron filtradas por una membrana de 0.45 µm. En la Figura 3.2, se muestra un ejemplo de curva estándar para la determinación de 2-clorofenol.

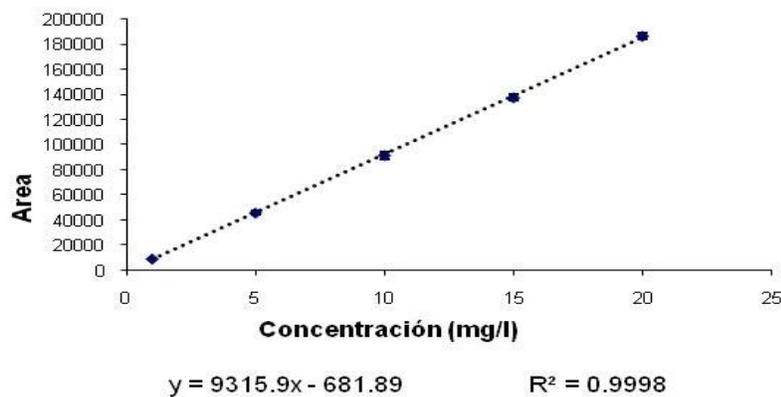


Figura 3.2. Curva estándar de 2-clorofenol por HPLC.

3.6.3 Nitrito y nitrato

Para la cuantificación de nitrito y nitrato, se utilizó un cromatógrafo de líquidos (HPLC, Perkin Elmer serie 200) con una columna de intercambio iónico (Waters IC-pak HC) y un detector UV-visible. La fase móvil consiste en una mezcla de butanol, acetonitrilo y un concentrado de gluconato (20:120:20 v:v) diluidos con agua desionizada a un volumen de 1L. La fase móvil se filtró por medio de una membrana de 0.45 μm . Se midió a una longitud de onda de 214 nm, a un flujo de 2 ml/min. Se construyó una curva estándar a partir de una solución madre a las concentraciones de 0,5, 10, 20 y 50 mg nitrito y nitrato/L. En la Figura 3.3 y 3.4, se muestra un ejemplo de curva estándar para la determinación de nitrito y nitrato.

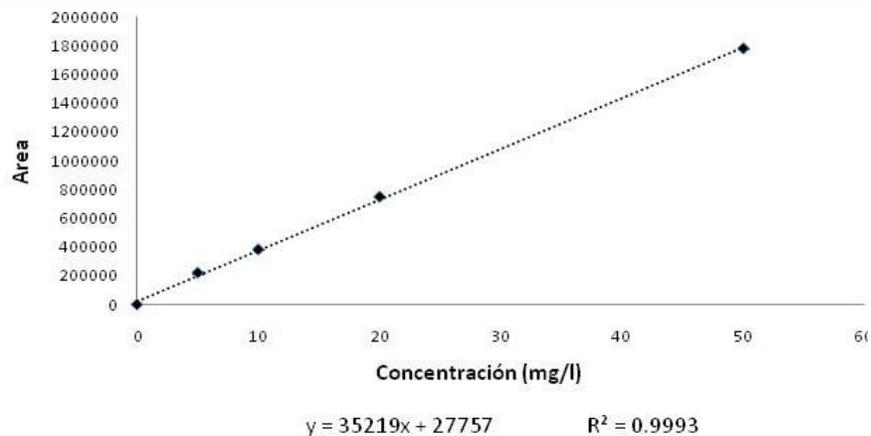


Figura 3.3. Curvas estándar de nitrito por HPLC

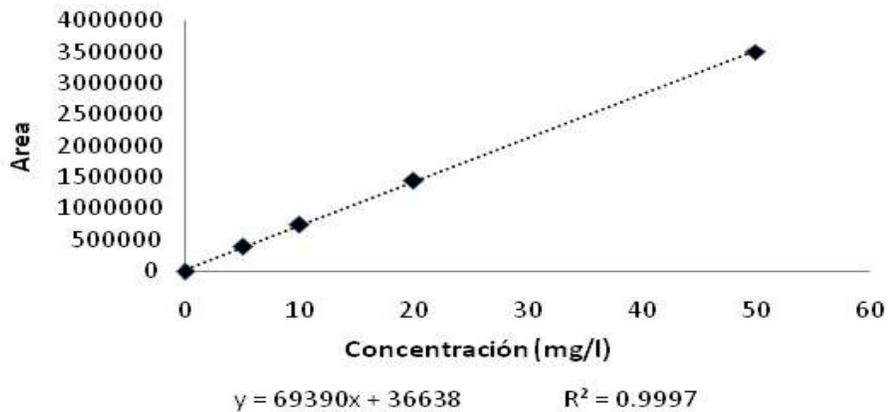


Figura 3.4. Curvas estándar de nitrato por HPLC.

3.6.4 Proteína

La concentración de proteína fue determinada por el método colorimétrico de Lowry (Lowry y col., 1951). Como referencia se utilizó una curva de calibración de 0 0.12, 0.18, 0.24 y 0.3 g de albúmina /l (Sigma). Se midió la absorbancia con un espectrofotómetro (ShimadzuTM), a una longitud de onda de 750 nm. A continuación se muestra un ejemplo de las curvas realizadas.

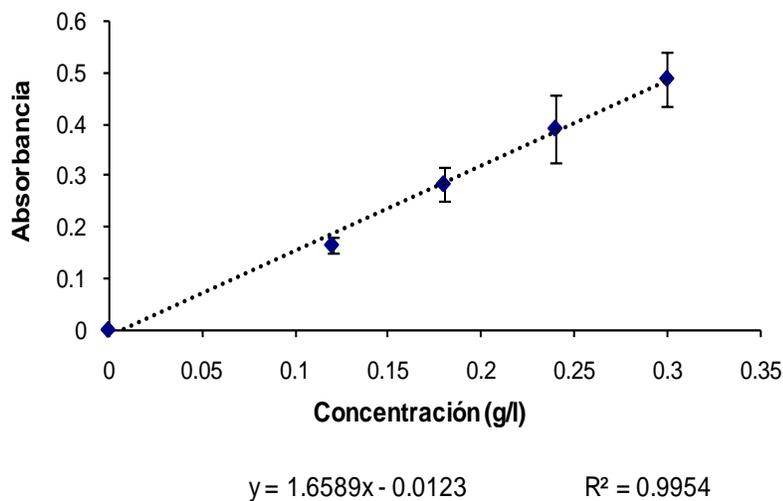


Figura 3.5. Curva estándar de proteína por el método de Lowry.

3.6.5 Variables de respuesta.

Las variables de respuesta que fueron utilizadas para evaluar el proceso respiratorio son las siguientes:

Rendimiento de N-NO₃

$$Y_{N-NO_3} = \frac{\text{mg de N-NO}_3 \text{ producido / l.}}{\text{mg de N-NH}_4 \text{ consumido / l.}}$$

Eficiencia de consumo de N-NH₄

$$E_{NO_3} = \frac{\text{mg de N- NH}_4 \text{ en la entrada / l.} - \text{mg N- NH}_4 \text{ en la salida / l.} \times 100}{\text{mg de N- NH}_4 \text{ en la entrada / l.}}$$

Eficiencia de consumo de C-2clorofenol.

$$E_{C-2\text{-clorofenol}} = \frac{\text{mg de C-2clorofenol en la entrada / l.} - \text{mg C-2clorofenol en la salida / l.}}{\text{mg de C-fenol en la entrada / l.}}$$

- *C-2-clorofenol* = Carbono de 2-clorofenol
- *N-NO_x* = Nitrógeno de Nitrato y nitrito
- *N₂* = Nitrógeno Molecular.

Balances de materia

$$[N-NH_4^+ \text{ entrada}] = [N-NH_4^+ \text{ salida}] + [N-NO_2^-] + [N-NO_3^-] + [N\text{-proteína}]$$

Velocidades específicas de consumo N- NH₄ y producción N-NO₃ (q).

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

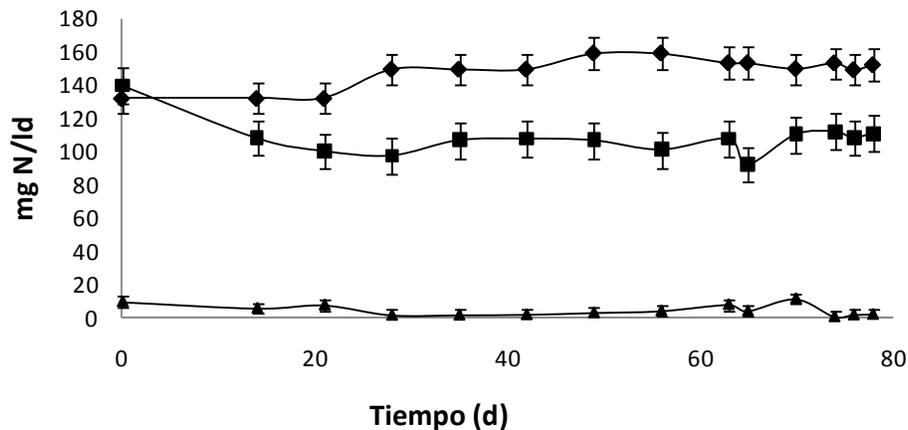
$$q_p = 1/x \, dP/dt \quad q_s = 1/x \, dS/dt$$

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

4.0 Resultados y discusión

4.1 Lodo nitrificante en estado estacionario.

En la figura 4.1 se observan las velocidades volumétricas de carga y de descarga de amonio ($Q_e \text{ N-NH}_4^+$ y $Q_s \text{ N-NH}_4^+$ respectivamente) y de producción de nitrato ($Q_p \text{ N-NO}_3^-$), en un reactor de tanque agitado alimentado en continuo, inoculado con un lodo nitrificante. En promedio, se calculó una Q_e de N-NH_4^+ de $147.8 \pm 9.3 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{ld}$, mientras que para la producción de nitrato se calculó una velocidad de producción de $107.5 \pm 10.7 \text{ mg N-NO}_3^-/\text{ld}$. El nitrógeno de amonio a la salida se mantuvo en velocidades de descarga muy bajas ($6.3 \pm 3.4 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{ld}$). A lo largo de los 80 días de operación, el coeficiente de variación (CV) para cada velocidad se mantuvo cercano al 10% por lo que se puede decir que el lodo nitrificante alcanzó el estado estacionario respiratorio.



—●— N-NH_4^+ entrada, —▲— N-NH_4^+ salida y —■— N-NO_3^- producido.

Figura 4.1. Perfil de la nitrificación en el reactor en continuo.

Bajo estas condiciones la eficiencia de consumo de N-NH_4^+ se mantuvo cercana al 100% ($97.14\% \pm 3.1$), el rendimiento de producción de nitrato en valores promedio de 0.75 ± 0.13 y el rendimiento de formación de biomasa en 0.13 ± 0.03 . El bajo rendimiento de biomasa puede entenderse por un lado, considerando la relación carbono nitrógeno (C/N) del medio de cultivo que fue de 2.5, lo que conlleva a un proceso prácticamente desasimilativo. Por otro lado, desde un punto de vista termodinámico, se ha calculado que la energía libre (ΔG°) del proceso nitrificante es de -349 kJ/reacción (Madigan y col., 2003). Tomando en cuenta que para la formación de 1 mol de ATP se necesitan aproximadamente -31 KJ (Morris, 1987), al realizar el cociente ($349 \text{ KJmol NH}_4^+^{-1} / -31 \text{ KJ molATP}^{-1}$) tenemos que se producirán 11.25 mol ATP por mol NH_4^+ consumido. Sin embargo la concentración de amonio en el medio de cultivo utilizado fue de tan sólo 100 mg/l, por lo que la producción de ATP será poca y por lo tanto el crecimiento celular también.

En el balance de materia se puede apreciar el destino de los compuestos nitrogenados, donde es claro que la mayor parte del amonio consumido fue oxidado a nitrato y una sólo una pequeña parte se dirigió a la formación de biomasa, además no se detectó la formación de nitrito. El lodo nitrificante obtenido bajo estas condiciones fue utilizado como fuente de inóculo para realizar los ensayos en lote descritos a continuación.

$$[147.8 \pm 9.3 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{ld}] = [106.7 \pm 7.8 \text{ mg N-NO}_3^-/\text{ld}] + [0 \text{ mg N-NO}_2^-/\text{ld}] + [6.3 \pm 3.4 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{ld}] + [21.6 \pm 1.3 \text{ mg N-BM}/\text{ld}]$$

4.2 Cinéticas nitrificantes control

La figura 4.2 muestra un ejemplo de las cinéticas nitrificantes control realizadas. El consumo total de amonio se realizó en un lapso de 14 h, durante las cuales se presentó la formación transitoria de nitrito y finalmente la máxima concentración de

nitrito formado. Al final de las 14 h, la eficiencia de consumo de amonio fue de 99.69% y el rendimiento de producción de nitrito de 0.99, lo cual indica que las condiciones experimentales fueron adecuadas para llevar a cabo la nitrificación de manera eficiente y que el proceso respiratorio no estuvo limitado en ningún aspecto. Al final del cultivo se determinó que la concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo se encontraba cercana a la saturación.

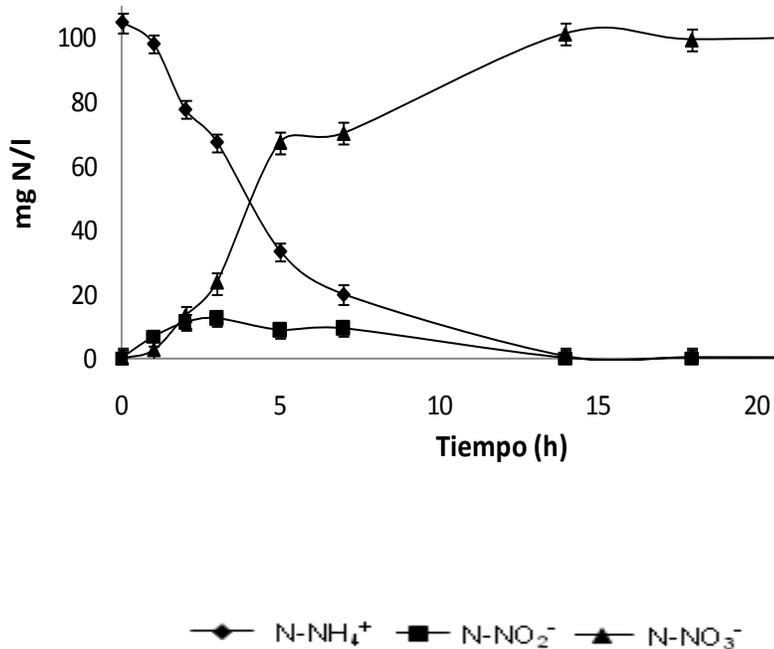


Figura 4.2. Perfil de la nitrificación control.

Para esquematizar de manera más clara el destino de los compuestos nitrogenados en la cinética control, se presenta el balance de materiales, donde se observa que efectivamente sólo hay producción de nitrógeno de nitrito y es prácticamente igual al nitrógeno de amonio alimentado.

$$[100 \pm 6.8 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{l}] = [99.69 \pm 1.1 \text{ mg N-NO}_3^-/\text{l}] + [0 \text{ mg N-NO}_2^-/\text{l}] + [0 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{l}]$$

Bajo estas condiciones se calcularon las velocidades específicas de consumo de amonio y producción de nitrito en 0.135 ± 0.02 y 0.076 ± 0.056 mgN/ mg de proteína h, respectivamente. Comportamientos cinéticos similares para este lodo

nitrificante han sido previamente reportados por Texier y Gómez (2002), Zepeda y col., (2003) y Silva (2007).

4.3 Proceso nitrificante en presencia de 2-clorofenol

Posteriormente a los ensayos control, se realizaron ensayos cinéticos nitrificantes en presencia de diferentes concentraciones de 2-CP (10, 5 y 2.5 mg C-2CP/l). En la figura 4.3 se muestran los perfiles cinéticos para cada concentración inicial de 2-CP. En todos los casos, el consumo de N-NH_4^+ fue prácticamente nulo, sin embargo, se detectó una concentración mínima de N-NO_3^- que se mantuvo constante a lo largo del tiempo y podría ser atribuida a residuos de éste que quedaron presentes en el inóculo nitrificante después del lavado. Dado que en ningún caso se detectó consumo de amonio, tampoco se registró la formación de nitrito ni crecimiento de biomasa, lo que muestra el efecto negativo del 2-clorofenol, incluso a concentraciones de 2.5 mg/l, sobre la nitrificación, particularmente en el consumo y la oxidación del amonio. Sin embargo, es de resaltar que aún cuando la capacidad amoniooxidante del lodo nitrificante se ve afectada por la presencia del 2-CP, se observa el consumo total del mismo entre 40 y 80 días de cultivo.

Amor y col. (2005), en condiciones nitrificantes en lote utilizaron concentraciones de fenol del orden de 2500 mg/l y encontraron que una vez consumido éste, la nitrificación puede llevarse a cabo sin ningún problema, lo que es claro que en el presente trabajo en presencia del 2-clorofenol, no ocurre.

Aunque la inhibición de la nitrificación por materia orgánica está ampliamente documentada en la literatura, por ejemplo, en presencia de etilbenceno (Juliastuti y col., 2003) y compuestos heterocíclicos como el benzotriazol (McCarty 1999), entre muchos otros, el término de inhibición se aplica en diferentes sentidos. Por ejemplo, algunos autores definen la inhibición como una disminución en la eficiencia de consumo de amonio (Juliastuti y col., 2003), mientras que otros trabajos (Texier y Gómez 2002), definen la inhibición como la disminución en las velocidades de consumo de amonio y producción de nitrato.

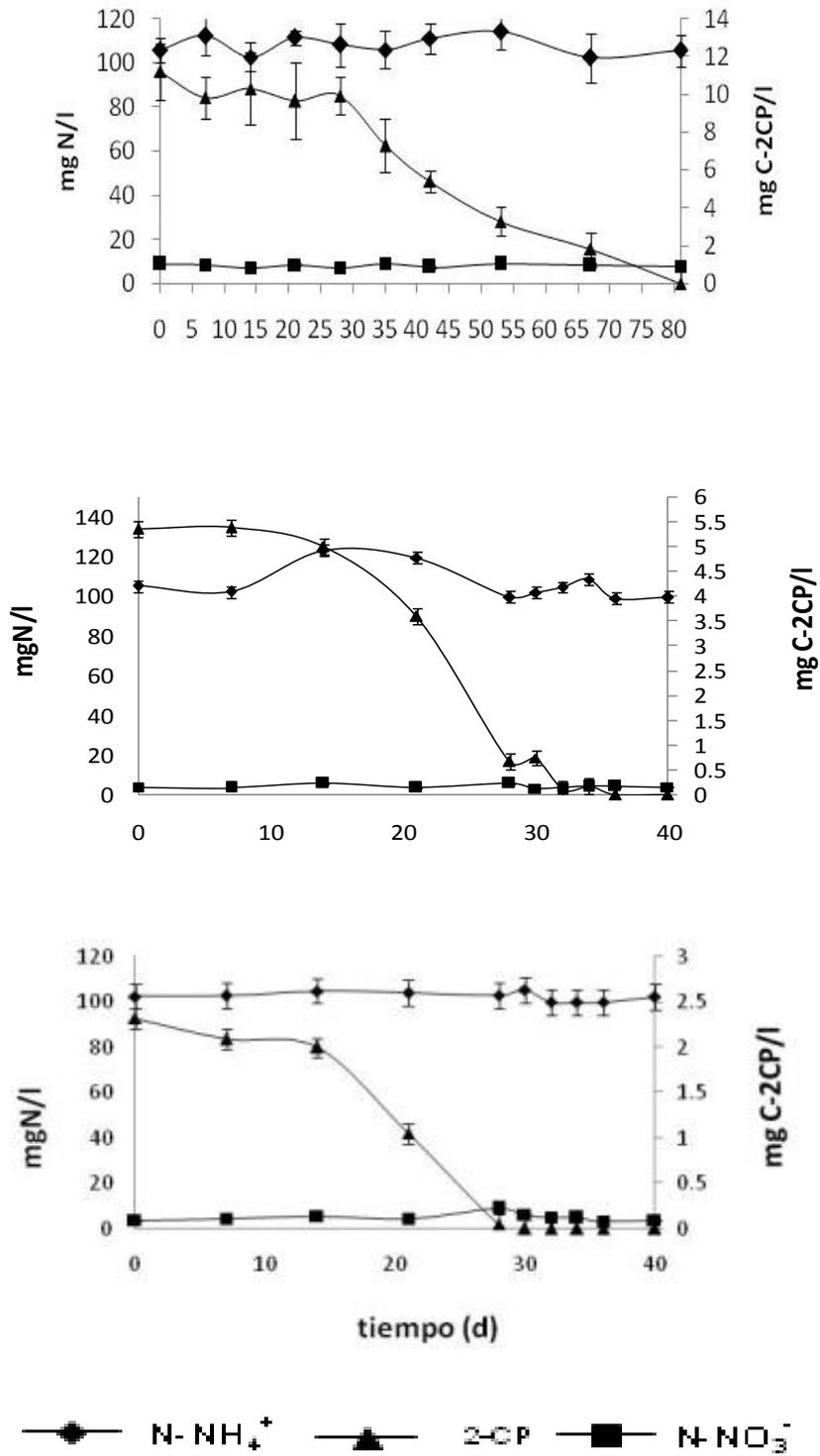


Figura 4.3 Perfil del consorcio microbiano nitrificante en presencia de 2-CP.

En la mayoría de los trabajos se reporta que la enzima amonio monooxigenasa (AMO) es la que se ve inhibida por la materia orgánica. De hecho, el acetileno es un compuesto ampliamente reportado como un inhibidor de la AMO. Hynes y Knowles (1982); Hyman y Wood (1985) y McCarty (1999), sugieren que en realidad el inhibidor de la AMO es un intermediario de la oxidación del acetileno que resulta mucho más reactivo, y que aparentemente se une al sitio activo de la monooxigenasa. Es decir, proponen una inhibición de tipo suicida, ya que la propia enzima produce el compuesto que la inactiva. Keener y Arp (1994) muestran evidencia de que en presencia de compuestos aromáticos como el benceno, alquilbencenos, fenol, acetofenona, piridina y ácido benzoico entre otros, la oxidación de amonio es la etapa de la nitrificación más dañada, por lo que asumen que los compuestos aromáticos actúan sobre la enzima amonio monooxigenasa. McCarty y Bremner (1989), utilizando 12 compuestos heterocíclicos diferentes, encuentran que compuestos que poseen 2 ó 3 átomos de N adyacentes, pueden inhibir considerablemente la amonio oxidación en suelos (de 23 hasta 99% para pirazol y de 1 a 76% para piridazina). También observan efectos similares con compuestos que poseen moléculas de cloro o triclorometil unidos a átomos de carbono adyacentes al anillo que contiene nitrógeno (2-cloropiridina, 2,6-dicloropiridina). Al respecto, los autores sugieren que dicho acomodo puede favorecer la inhibición debido a que los átomos de cloro pueden ser activados por sustitución nucleofílica volviéndose más reactivos, algo similar a lo que sucede con el acetileno.

Son escasos los trabajos que evalúan el efecto de los clorofenoles sobre la nitrificación y aún más para el caso del 2-clorofenol. Por ejemplo, Satoh y col. (2005), encuentran que en un biofilm nitrificante, la presencia de 10 mg de 2-CP/l inhibe la nitrificación casi en su totalidad después de 40 minutos, ya que observan una disminución significativa de las velocidades específicas de consumo de amonio (de 0.04 a 0.005 mmol/cm²h⁻¹). Sin embargo, no aportan datos sobre la producción de nitrito o nitrato para sostener que se está llevando a cabo la nitrificación como proceso respiratorio. Por su parte, Inui y col. (2002), utilizan

bacterias nitrificantes (*Nitrosomonas europaea*) como biosensores para la presencia de clorofenoles en un sistema de tratamiento de aguas municipales, encontrando que a una concentración de 2-clorofenol de 0.9 mg/l, la amonio oxidación disminuye un 10%. Sin embargo, no queda claro si la nitrificación, particularmente si la amonio oxidación o la nitrito oxidación, se está llevando a cabo, pues tampoco proporcionan un seguimiento de la producción de nitrito o nitrato.

En el presente trabajo se encontró que cuando un lodo nitrificante fisiológicamente estable se pone en presencia de concentraciones iniciales desde 2.5 hasta 10 mg C-2-CP/l, no existe consumo de amonio y por tanto no hay formación de nitrito ni de nitrato, es decir, no se lleva a cabo la nitrificación. Probablemente el mecanismo de acción de los clorofenoles sobre la nitrificación sea similar a los sugeridos previamente. A fin de entender y evaluar el efecto ocasionado por el 2-CP al lodo nitrificante, se realizaron ensayos de recuperación de la nitrificación. Estos consistieron en lavar el lodo nitrificante previamente expuesto al 2-CP, ponerlo en condiciones nitrificantes y comparar su actividad nitrificante contra un consorcio que nunca estuvo en contacto con 2-CP. Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

4.4 Ensayos de recuperación de la nitrificación

Estos ensayos se realizaron para tratar de identificar a qué nivel o qué etapas de la ruta nitrificante se afectaron después del contacto con el 2-CP.

4.4.1 Recuperación después del contacto con 10 mg C-2CP/l

Debido a que el perfil obtenido con el lodo expuesto a las tres concentraciones de 2-CP fue muy similar entre sí, en la figura 4.4 se presenta a manera de ejemplo la cinética realizada con el lodo nitrificante que estuvo expuesto a 10 mg C-2-CP/l. El comportamiento obtenido tuvo varias diferencias en comparación con el control sin exposición al 2-CP. Primeramente se observa una fase de retardo (lag) de 120

horas para que inicie el consumo de amonio. El tiempo de cultivo se prolongó 5 veces (250 h) y la eficiencia de consumo de amonio no llegó al 100%. El amonio consumido se oxidó a nitrito, sin embargo, no se detectó la formación de nitrato, por lo que éste se acumuló y permaneció hasta el final de la cinética, resultando en un rendimiento de formación de nitrito de 1.0 ± 0.002 (figura 4.5B). En el balance de materia se observa la oxidación parcial de amonio únicamente a nitrito.

$$[102.08 \pm 8.7 \text{ mgN-NH}_4^+/\text{l}] = [47.56 \pm 1.7 \text{ mg N-NO}_2^-/\text{l}] + [0 \text{ mg N-NO}_3^-/\text{l}] + [49.05 \pm 6.35 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{l}]$$

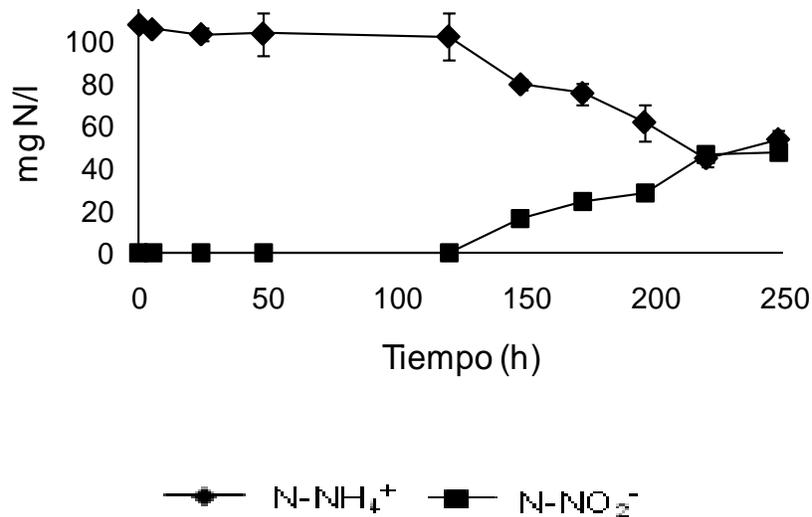


Figura 4.4 Perfil del lodo nitrificante previamente expuesto a 10mg 2-CP/l.

En cuanto a las velocidades específicas, se calculó para el consumo de amonio (q_{NH_4}) una disminución significativa con respecto a la cinética control. Obviamente no se calculó la velocidad específica de producción de nitrato.

En la figura 4.5 se realiza un comparativo de las variables de respuesta evaluadas en los ensayos de recuperación utilizando al consorcio nitrificante previamente expuesto a diferentes concentraciones de 2-CP, contra el control sin exposición a este compuesto. En la figura 4.5 A se muestra que para el ensayo control se obtuvo una eficiencia de consumo de amonio del 100%, mientras que ésta fue menor en los ensayos con lodos expuestos al 2-CP. Para 10 mg de C2-CP/l fue de

48% \pm 1.3 pero con un tiempo de cultivo de 250 horas, para 5 mg C- 2-CP/l de 10.4% \pm 2.3 mientras que para 2.5 mg C- 2-CP/l de 71.9% \pm 5.2 ambos casos con 48 horas de tiempo de cultivo. Se presentó entonces una disminución en esta variable de respuesta de 52, 90 y 28% para estos tres ensayos respectivamente. La figura 4.5B ilustra los valores de rendimiento de producción de nitrito para los tres experimentos. Se observa claramente que a diferencia del control, todo el amonio consumido se transformó y acumuló como nitrito, ya que los Y_{NO_2} fueron de 1.0 ± 0.1 y 0.95 ± 0.06 .

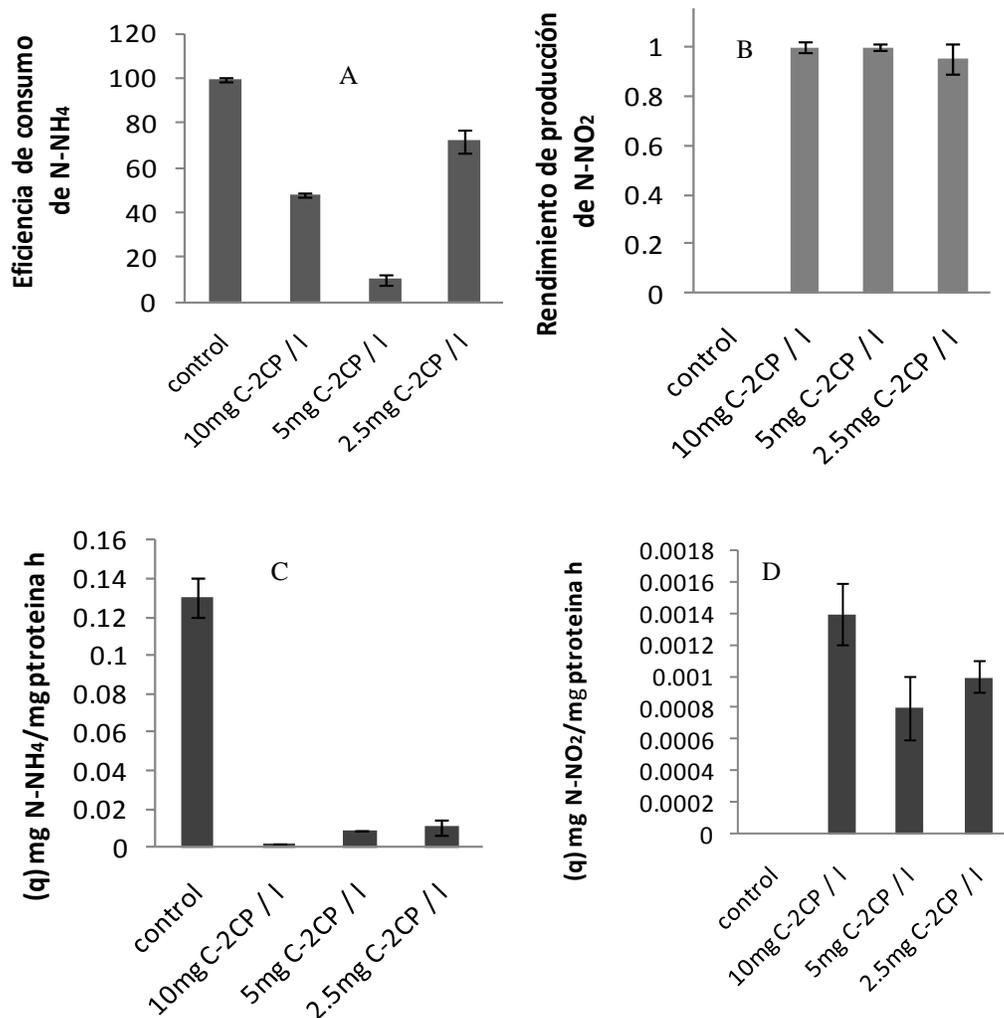


Figura 4.5 Comparación de las variables de respuesta evaluadas en los ensayos de recuperación del lodo nitrificante previamente expuesto a diferentes concentraciones de 2-CP, contra un control.

La disminución en las velocidades específicas de consumo de amonio con respecto al control se muestran en la figura 4.5C. Estas cayeron a 0.0021 ± 0.0004 , 0.0085 ± 0.0002 y 0.011 ± 0.004 mgN-NH₄⁺/mg de proteína h respectivamente, lo que implica una disminución de 98.4% 99.2% ± 0.02 y 91.5% ± 1.5 . En la figura 4.5D se ilustra las velocidades específicas de producción de nitrito las cuales presentan valores de 0.0014 ± 0.0002 , 0.0008 ± 0.0001 y 0.001 ± 0.0002 mgN-NO₂⁻/mg de proteína h y que en el ensayo control no se calculó ya que la formación de nitrito solo fue transitoria.

Con base en los resultados obtenidos y de manera general, se puede decir que la exposición al 2-CP provoca daños significativos al proceso de nitrificación en varios niveles. Primero, la capacidad nitrificante del consorcio microbiano se ve afectada, pues la eficiencia de consumo de amonio y el rendimiento de producción de nitrato no se recuperan totalmente. En segundo lugar, el proceso nitrificante se hace más lento, pues en comparación con el control, las velocidades específicas de consumo de amonio y generación de nitrato no se recuperan. Finalmente, la ruta nitrificante se afecta más a nivel de la nitrito oxidación, ya que aunque el daño sobre la amonio oxidación fue muy marcado, sí se detectó un cierto consumo de amonio y su conversión a nitrito. Sin embargo, el nitrito siempre se acumuló sin ser oxidado a nitrato. Aunado a estos factores, no se pueden descartar posibles efectos en el transporte debidos al 2-clorofenol 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).

Kenner y Arp (1994), encuentran que con cultivos axénicos de *Nitrosomonas europaea* en lote, expuestos a anilina, nitrobenceno y fenol, la amonio-oxidación presenta un 50, 20 y 60% de recuperación respectivamente. Sin embargo, los autores no hacen mención acerca de si la velocidad de consumo también se restableció, pues el que haya recuperado la capacidad amonio-oxidante no

necesariamente implica que esta conserve su velocidad. En este trabajo, la máxima recuperación de la amonio-oxidación fue cercana al 70%, valor semejante al reportado, para el caso del fenol (Kenner y Arp 1994). Se ha referido, que el fenol tiene la capacidad de disolver la membrana celular (Van Schie y col., 2000), y es probable que el 2-clorofenol también presente esta característica. Considerando que la enzima amonio monooxigenasa está unida a la membrana, cabe la posibilidad que la AMO haya sido afectada junto con la membrana celular por la exposición al 2-CP.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten decir que en un consorcio nitrificante previamente expuesto al 2-CP, el cuello de botella para la nitrificación, se encuentra en la etapa de la nitrito oxidación. En la literatura, los mecanismos por los cuales puede ser inhibida la nitrito oxidación no han sido del todo esclarecidos, sin embargo se han propuesto algunas teorías. Al respecto, Belser y col, (1980), realizaron un estudio con el género de *Nitrobacter sp.* acerca del efecto de los cloratos sobre la nitrito oxidación. Los autores encontraron que este es un inhibidor competitivo de la nitrito oxido reductasa al ser un posible aceptor de electrones que sustituye al oxígeno. Probablemente un efecto parecido se presente en los cultivos con 2-clorofenol. Underhill y Prosser (1985), reportan que compuestos como el etil-xantato de potasio tiene capacidad quelante sobre el centro de cobre que posee la nitrito óxido reductasa, sin embargo, la capacidad quelante del 2-CP no está clara. Por otra parte Kelly y col., (2004), evalúan el efecto de varios compuestos, entre ellos el dinitrofenol (DNP) a una concentración de 107 mg/l, en lodos nitrificantes en reactores de lote secuenciado. Los autores encuentran la acumulación de nitrito en los primeros ciclos de operación y relacionan este hecho con la capacidad del DNP para desacoplar la fosforilación oxidativa, sin embargo no se muestran datos que confirmen dicha hipótesis.

Se sabe también que la presencia de nitrito puede inhibir la nitrificación, específicamente la nitrito oxidación, como lo reporta Silva y col., (2008), quien al adicionar 100 mg N-NO₂/l observa que el rendimiento de producción de nitrato

disminuye 35%, aunque las velocidades específicas tanto de consumo de amonio y producción de nitrato, no presentan diferencia significativa con respecto a un control sin adición de nitrito. Este autor también encuentra que la adición 200 mg N-NO₂/l resulta en una disminución de 60% en la producción de nitrato, de 40% en la qN-NH₄ y de 60% en la qN-NO₃. Por lo anterior sugiere que el nitrito tuvo un efecto más marcado sobre la nitrito oxidación. Al respecto, está documentado que en condiciones desnitrificantes el nitrito puede ser desacoplante de la transferencia de electrones de la nitrito óxido reductasa (Sijbesma y col., 1996), lo que trae como consecuencia la acumulación de éste en el medio. Esta situación podría extrapolarse a un proceso nitrificante.

La mayor concentración de nitrito se presentó en el ensayo con lodo que estuvo en contacto previo con 2.5 mg de 2-CP/l, en un máximo de 71.6 mgN-NO₂⁻/l, concentración casi tres veces menor que la que Silva y col., (2008) reporta como perjudicial para la nitrito oxidación. Considerando que en el presente trabajo la concentración de biomasa fue 35% mayor, sería posible descartar el efecto negativo del nitrito y sería posible proponer que el daño causado en esta etapa se deba al contacto con el 2-CP.

4.5 Consumo de 2-clorofenol

La figura 4.6 presenta el consumo de las diferentes concentraciones de 2-CP bajo condiciones nitrificantes. Se puede observar que para consumir 10 mg C-2-CP/l se requirió de 80 días, mientras que para 5 y 2.5 mg C-2-CP/l se requirió de 34 y 28 días respectivamente. Se presentó una fase de retardo para el consumo de 2-CP, la cual aumentó con el incremento de la concentración del 2-CP, ya que para 10 mg C-2-CP/l, se requiere de 30 días, mientras que para 5 y 2.5 mg C-2-CP/l, sólo se requiere de 15 días. Es importante resaltar que independientemente de la concentración de 2-CP utilizada, la eficiencia de consumo de 2-CP fue del 100%, mientras que las velocidades específicas de consumo del 2-clorofenol (q_{2-CP}), fueron de 0.0007 ± 0.0003 , 0.0017 ± 0.0002 y 0.00133 ± 0.0003 , para 10, 5 y 2.5 mg C-2CP/l respectivamente.

De manera similar a este trabajo, se ha reportado para el caso de la nitrificación en presencia de fenol (Amor y col., 2005), la presencia de una fase de retardo para el consumo de fenol que puede ir desde 2 hasta 6 días. Asimismo, independientemente de la concentración utilizada de fenol, los autores reportan el consumo total del mismo utilizando incluso concentraciones de 1400 mg/l.

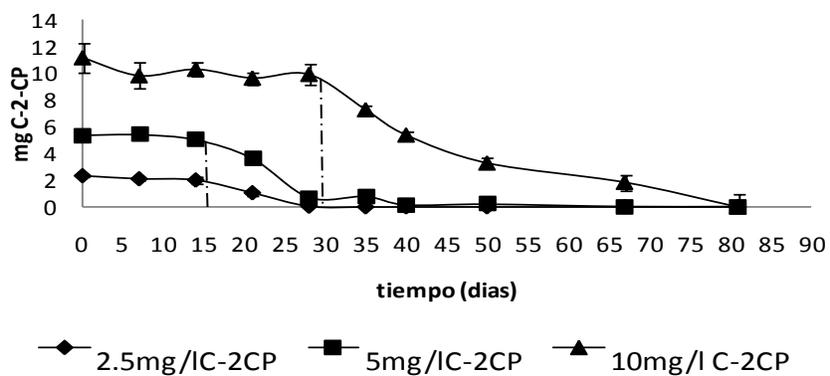


Figura 4.6. Perfil del consumo de 2-clorofenol a diferentes concentraciones. Las líneas punteadas indican el final de la fase de retardo.

Junto con el consumo del 2-CP se detectó la presencia de un intermediario que se muestra en el cromatograma de la figura 3.5 y presenta un tiempo de retención de 1.64 minutos. En la literatura se reporta que bajo condiciones aerobias, la oxidación de mono-clorofenoles resulta en algunos intermediarios como el 3 y 4-clorocatecol y el ácido protocatecoico. Tomando esto en consideración, se analizó la presencia de 4-clorocatecol y ácido protocatecoico como posibles intermediarios, pero como se puede observar en el cromatograma, en ningún caso hay coincidencia con el pico formado por el intermediario durante la oxidación del 2-CP, por lo que no fue posible la identificación de dicho intermediario. Es importante mencionar que estos intermediarios se han detectado bajo condiciones aerobias y no podría descartarse la posibilidad de que bajo las condiciones ensayadas en el presente trabajo, que son nitrificantes, se generen

otros intermediarios. Al respecto, no existen reportes en la literatura. Se planteó entonces la posibilidad de que la siguiente etapa de oxidación se hubiera llevado a cabo hasta ácidos grasos volátiles, de acuerdo a lo reportado por Zepeda y col. (2003), quienes encontraron con un consorcio nitrificante, la oxidación de compuestos aromáticos como el benceno, tolueno y m-xileno hasta acetato y butirato. Sin embargo, se verificó que a lo largo de la cinética no hubo presencia de ninguno de estos compuestos.

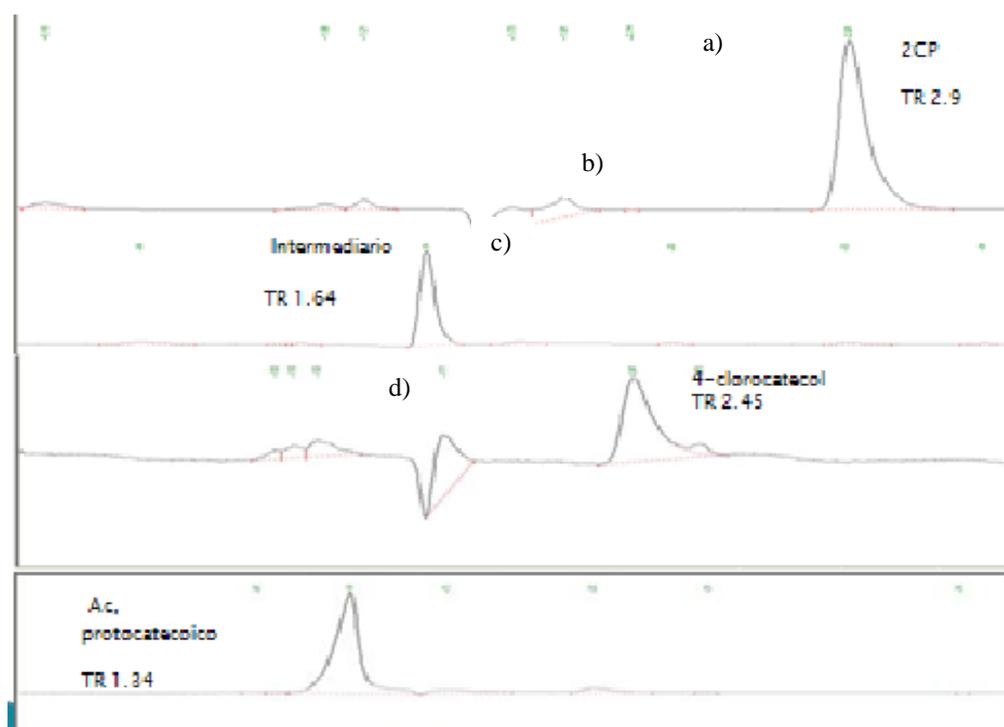


Figura 4.7.- Tiempos de retención del a) 2-CP, b) intermediario detectado, c) 4-clorocatecol y d) Acido protocateicoico reportados en literatura.

Se han realizado diversos trabajos, utilizando un consorcio nitrificante con características semejantes al utilizado en este ensayo, logrando la oxidación de diversos compuestos aromáticos. Trabajos como el de Zepeda y col., (2003), reportan la capacidad de un consorcio nitrificante para oxidar benceno hasta acetato, Texier y Gómez (2002) observan que el p-cresol puede ser oxidado a intermediarios que no fue posible identificar. Silva (2007), realiza estudios para la

oxidación de p-cresol en condiciones nitrificantes reportando la formación de intermediarios como el p-hidroxibencilalcohol, p-hidroxibencilaldehído, mientras que Pérez y col., (2008), utilizando un consorcio nitrificante en presencia de diferentes concentraciones de fenol (30, 60 y 90 mg C-fenol/l) encontraron la formación de p-hidroxibencilalcohol. En el presente estudio tampoco se encontró la presencia de ninguno de estos intermediarios.

También se ha documentado en un cultivo axénico de *Nitrosomonas europaea* (Keener y Arp, 1994) la capacidad de la enzima 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 de este microorganismo. Por otro lado, se ha reportado que procesos aerobios, como los lodos activados, tienen la capacidad de consumir el 2-CP. Por ejemplo Gallego y col., (1998), reportan la biodegradación de hasta 200 mg/l de 2-CP con lodos donde predominan géneros como *Acaligenes* y *Pseudomonas*. Sin embargo, en el trabajo no se hace referencia a la presencia o ausencia de una fase de retardo, a los intermediarios formados o si hubo o no generación de biomasa, datos que contribuirían a tener un mayor entendimiento del destino que tiene el 2-CP.

Farrell y Brid (1990) reportan bajo condiciones aerobias, la capacidad de organismos como *Pseudomonas putida*, para oxidar al 2-CP, mediante rutas denominadas orto, meta y para (fig 1.1 Sección 1.0), en diferentes productos, que pueden ser tan tóxicos o más que el propio 2-clorofenol. En este sentido, reportan la formación de 3 y 4-clorocatecol como intermediarios de la oxidación del 2-CP y sus isómeros (3 y 4- CP). Los autores observan que el 3-clorocatecol tiende a acumularse en el medio provocando una coloración café del mismo, lo cual sugieren, se debe a la polimerización de este intermediario. Ellos encuentran que esta acumulación resulta en un efecto negativo sobre las enzimas de la ruta *meta* de degradación, en específico sobre la catecol 2,3-dioxigenasa. Se han propuesto dos mecanismos por los cuales puede afectarse esta enzima: 1) el 3-clorocatecol puede actuar como agente quelante del centro metálico de la enzima resultando en una inactivación reversible (Klecka y Gibson 1981). 2) La ruptura del 3-clorocatecol puede generar el 5-clorformil-2-hidroxy-penta-2,4-dienoico (Bartels y

col., 1984) compuesto conocido como suicida, pues inactiva completamente la ruta metabólica para la oxidación del 2-CP. Aunque en el presente estudio no fue posible detectar la presencia del 3-clorocatecol, y considerando que un intermediario aún no identificado se acumuló en el medio de cultivo, es posible proponer que uno de los intermediarios suicidas que se reportan en la literatura se haya formado. Asimismo, es posible que este mismo intermediario haya tenido un efecto también sobre las enzimas de la nitrificación. Sería recomendable realizar más estudios al respecto para esclarecer esta situación.

5.0 Conclusiones

- ▶ La presencia de 2.5 a 10 mg C-2-CP/l causa una inhibición del 100% en el consumo de amonio
- ▶ Con los ensayos de recuperación de la nitrificación se encontró que la exposición al 2-CP resultó en una disminución de la eficiencia de consumo de amonio desde un 28 hasta 90%. El amonio consumido fue convertido a nitrito y éste se acumuló en el medio, debido a que no fue oxidado hasta nitrato. Como consecuencia el rendimiento de producción de nitrato fue igual a cero. Asimismo, la velocidad específica de consumo de amonio sólo se recuperó en un 9% en comparación con la reportada para el control, mientras que la velocidad específica de producción de nitrato fue inhibida completamente.
- ▶ En todos los casos el consumo de C-2-CP fue del 100%, requiriéndose de una fase lag para su consumo. Esta fase aumentó junto con el incremento en la concentración del 2-CP (15 días para 2.5 y 5 mg/l y de 30 para 10 mg C-2-CP/l).
- ▶ El tiempo de consumo de C-2-CP aumentó al incrementarse su concentración inicial, desde 28 días para 2.5 mg C-2CP/l hasta 80 días para 10 mg C-2CP/l.
- ▶ Finalmente, se detectó la formación de un intermediario que aún no se ha identificado.

6.0 Recomendaciones

Debido a que en este trabajo se utilizó como inóculo un consorcio nitrificante, hasta el momento no es posible distinguir si los encargados de oxidar la materia orgánica (2-CP), son los heterótrofos o las bacterias nitrificantes, pues como se ha visto, tanto los organismos heterótrofos como los nitrificantes han mostrado tener la capacidad de biotransformar al 2-CP. Sería adecuado realizar estudios más detallados para poder discernir qué parte de la microflora realiza dicho trabajo.

Es evidente que la oxidación de compuestos como los clorofenoles puede generar intermediarios aun más tóxicos para los microorganismos, por lo que surgen 2 interrogantes. La primera es, ¿el o los intermediarios que pudieron formarse tras la oxidación del 2-CP bajo condiciones nitrificantes fueron en realidad los causantes del daño tan marcado a dicho proceso?, 2) ¿La formación y acumulación del intermediario detectado se debe a la presencia de compuestos similares a los reportados como suicidas?

Es claro que debe realizarse un estudio más profundo acerca de cuál podría ser el mecanismo por el que se afecta la nitrito oxidación, ya que la acumulación de compuestos como el nitrito en las aguas puede causar daños graves a la salud. El entendimiento de lo que sucede con esta etapa de la nitrificación puede proporcionar los medios para impedir la acumulación de nitrito.

7.0 Bibliografía

1. Amor L., Eiroa M., Kennes C., Veiga M.C. (2005). Phenol biodegradation and its effect on the nitrification process. *Wat. Res.* **39**, 2915-2920.
2. Andersson K. K., Kent T, A., Lipscom, J. D., Hooper, A. B. and Muck E. (1984). *J. Biol. Chem.***259**, 6833-6840.
3. 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.
4. Arp D. and Stein L.Y. (2003). Metabolism of inorganic N compounds by Ammonia-Oxidizing bacteria. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology.* **38**, 471-495.
5. Arp D., Sayavedra-Soto L. A. and Hommes N.G. (2002). Molecular biology and biochemistry of ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea*. *Arch. Microbiol.***178**, 250-258.
6. Bae H.S., Yamagishi, T., Suwa Y., (2002). Evidence for degradation of 2-chlorophenol by enrichment cultures under denitrifying conditions. *Microbiology.* **148**, 221–227.
7. Bartels I., Knackmuss H.J. & Reineke W. (1984) Suicide inactivation of catechol 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas putida* mt-2 by 3-halocatechols. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**, 500–505
8. Basu S. K. and Oleszkiewicz J. A. (1995). Factors affecting aerobic biodegradation of 2-chlorophenol in sequencing batch reactors. *Environmental Technology.* **16**, 1135-43.
9. Bedard C. and Knowles R. (1989). Physiology, biochemistry, and specific inhibitors of CH₄, NH₄⁺ and CO oxidation by methanotrophs and nitrifiers. *Microbiol Rev.* **53**, 68-84.
10. Belser L.W. and Mays E. L. (1980). Specific inhibition of nitrite oxidation by chlorate and its use in assessing nitrification in soils and sediments. *Appl. and Environmental Microbiology.* **39**, 505-510

11. Blackmer A.M., Bremer J.M. and Schmidt E.L. (1980) *Appl. Environ. Microbiol* **40**, 1060-1066.
12. Bock E., Koops, H.P., Harms H. y Ahlers B. (1991) The biochemistry of nitrifying microorganism, in variations in Autotrophic life, Bock E (Ed) (*academic Press London*). 171-200.
13. Bock, E; Koops, H.P. and Harms, H. (1986) In nitrification. (J.I. Prosser ed.). *Especial publications of the society for general microbiology*. **20**, 17-38
14. Buitrón G., González A., López-Martín (1998). Biodegradation of phenolic compounds by an acclimated activated sludge and isolated bacteria. *Water Science and Technology*. **37**, 371-378
15. Buitrón G., Schoeb M.-E and Moreno J. (2003). Automated Sequencing batch bioreactor under extrem peaks of 4-chlorophenol. *Water Science and Technology* **47** (10), 175-181.
16. Castingnetti D. and Hollocher, T.C. (1985). Heterotrophic nitrification among denitrifiers *Curr Microbiol* **6**, 229-231.
17. Daigger G.T., Robbins, M.H. and Marshall, B.R. (1985) The design of selector to control low F/M filamentous bulking. *J. Pollut. Control fed.* **57**, 220 -226.
18. Eilersen A., Henze M. and Klotz I. (1994) Effect of volatile fatty acids and trimethylamine on nitrification in activated sludge. *Wat. Sci. Tech.* **24**, 21-28.
19. Farabegoli A., Chiavola and Rolle E. (2008). Remediation of chlorophenol and phenol contaminated-groundwater by a Sequencing Batch Biofilm Reactor Proceedings of 4th IWA Specialized Conference on Sequencing Batch Reactor Technology SBR4 7-10 April 2008. S. Michele a Ripa, Rome, Italy. 375-382
20. Farrell and Brid (1990). Degradation of mono-chlorophenols by a mixed microbial community via *meta*- cleavage pathway *Biodegradation* **10**, 353–362.

21. Fava F., Armenante P.M., Kafkewitz (1995). Aerobic degradation and dechlorination of 2-chlorophenol, 3- chlorophenol and 4- chlorophenol by a *Pseudomonas pickettii* strain. *Lett Appl. Microbiol* **21**, 307-312.
22. Gallego A., Molina Tirado L.B., Fortunato M.S., Bevilacqua S., Camardella H., Kabbas S., Cenzano M.L., Gómez C.E., D'Aquino M., Korol S. Higa L.E. (1998). Biodegradación de 2-clorofenol en reactores aeróbicos empleando microorganismos autóctonos. Asociación Peruana de Ingeniería Sanitaria y Ambiental; AIDIS. Gestión ambiental en el siglo XXI. Lima, APIS. pp.1-8.
23. Gómez J., Mendez J.R. and Lema J.M. (2000). Kinetic study of addition of volatile organic compounds to a nitrifying sludge. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **88**, 1-12.
24. Gunderson K. (1966). The growth and respiration on *Nitrocystis oceunus* at different partial pressure of oxygen. *Journal of General Microbiology.* **42**, 387-395.
25. Hale D.D., Reineke W. and Wiegel J. (1994). Biological degradation and bioremediation of toxic chemicals (Chapter 4). G. Rasul Chaudry Ed. Chapman & Hall.
26. Helder W. and Vries R. T. P. (1983). Estuarine nitrite maxima and nitrifying bacteria *Netherlans Journal of sea research.* **17**, 1-18.
27. Hernández L. (2005). Estudio del proceso respiratorio y estructura de un lodo desnitrificante en presencia de acetato y tolueno en un SBR. Tesis de maestría UAM-Iztapalapa.
28. Hernández L., Buitrón G., Gómez J. and Cuervo-López F.M. (2008). Denitrification of toluene and sludge settleability. Proceedings of 4th IWA Specialized Conference on Sequencing Batch Reactor Technology SBR. S. Michele a Ripa, Rome, Italy.69-72.
29. Hyman M.R. and Wood P.M. (1985). Suicidal inactivation and labeling of ammonia mono-oxygenase by acetylene. *Biochem J.* **227**, 719-725.

30. Hynes R.K. and Knowles R. (1982). Effect of acetylene on autotrophic and heterotrophic nitrification. *Canadian Journal of Microbiology*. **28**(3), 334-340.
31. Hynes, R.K., and Knowles, R. (1978). Inhibition by acetylene of ammonia oxidation in *Nitrosomonas europaea*. *FEMS Microbiol Lett.* **4**. 319-321.
32. Inui T., Tanaka Y., Okayasu Y. and Tanaka H. (2002). Application of toxicity monitor using nitrifying bacteria biosensor to sewerage systems. *Water Science and technology*. **45**, 271-278.
33. Issley S., and Lang E. (2007). Ammonia Toxicity In: Adler JN, Brenner B, Dronen S, Feied C, Mallon WK, O'Conner RE, Plantz, Pollack (Senior Eds.). eMedicine: Emergency Medicine. Boston: eMedicine Corporation,
34. Jechorek M., Wendlandt K. D., Beck M. (2003). Cometabolic degradation of chlorinated aromatic compounds. *Journal of Biotechnology*. **102**, 93-98
35. Juliastuti S.R., Baeyens J. and Creemers C. (2003). Inhibition of nitrification by heavy metals and organic compounds: The ISO 9509 test. *Environmental Engineering Science*. **20**(2), 79-90.
36. Kargi F., Eker S. (2005). Removal of 2,4-dichlorophenol and toxicity from synthetic wastewater in a rotating perforated tube biofilm reactor. *Process Biochemistry*. **40**, 2105-2111.
37. Keen G.A., and Prosser J. I. (1987). Steady state and transient growth of autotrophic nitrifying bacteria. *Archives of microbiology* **147**, 73-79.
38. Kelly R.T., Henriques I.D.S., Love N.G. (2004) Chemical Inhibition of Nitrification in Activated Sludge. *Biotechnology and bioengineering*. **6**(85), 683-694.
39. 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
40. Keener, W.K. and Arp, D. J, (1994) Transformation of aromatics compounds by *Nitrosomonas europaea* *Appl. Microbiol* **60**, 1914-1920.

41. Klecka, G. M., and D. T. Gibson. (1981). Inhibition of catechol 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas putida* by 3-chlorocatechol. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**, 1159-1165.
42. Lema J.M., Méndez J.R., y Gómez J. (1996). La nitrificación biológica con cultivo axénico o lodos activados. *CIENCIA* **46**, 507-523.
43. Liu D. and Pacepavicius G. (1990). A systematic study of the aerobic and anaerobic biodegradation of 18 chlorophenols and 3 cresols. Toxicity Assessment: *An Intel. J.*, **5**, 367-387.
44. Lowry O. H., Rosen Brough N. J. and Randall R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent *J. Biol Chem.* **198**, 265-275.
45. Macarie H. and Guiot (1995). Pentachlorophenol degradation by a simultaneous aerobic/anaerobic process: a new technology for waste water treatment. *Fronteras en biotecnología y bioingeniería Ed. Galindo.* 317-322.
46. Madigan M., Martinko J. and Parker J. (2003). Brock Microbiología de los Microorganismos. 10ma edición. Editorial Pearson Prentice Hall. Madrid. 359-360.
47. McCarty G.W. (1999). Modes of action of nitrification inhibitors. *Biol. Fertil Soils.* **29**,1-9.
48. McCarty G.W., Bremner J.M. (1989) Inhibition of nitrification in soil by heterocyclic nitrogen compounds. *Biol Fertil Soils* **8**,204–211
49. Michael G.R., Shimitzu G.P. and Jenkins, D. (1985). The growth physiology of the filamentous organism type 021 N and its significance activated sludge bulking. *J. Water Pollut. Control Fed.* **57**, 1152-1162.
50. Moreno- Andrade I., y Buitrón G. (2004). Evolución en la actividad de los microorganismos en los procesos de aclimatación y desaclimatación al 4-clorofenol. XIV Congreso Nacional de la Federación Mexicana de Ingeniería Sanitaria y Ciencias Ambientales AC, Mazatlán, Sinaloa.

51. Moreno I. y Buitrón G. (2003). Influence of the initial substrate to microorganisms concentration ratio on the methanogenic inhibition test, *Water Science and Technology*. **48** (6),17-22.
52. Morris J.G. (1987) Fisicoquímica para biólogos. Segunda edición pp. 193,241.
53. Nemerow N. L., Dasgupta A. (1998) Tratamiento de vertidos industriales y peligrosos. Editorial Díaz Santos. Madrid 4ed. pp. 203-208
54. Pérez A. (2007). Evaluación del efecto del fenol en la nitrificación y sedimentabilidad de un lodo utilizando un reactor de lote secuenciado (SBR). Tesis de especialidad. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.
55. Pérez J.E., Martínez F. and Cuervo-López F.M. (2008). Nitrification and phenol elimination: respiratory process and sludge settleability. Proceedings of 4th IWA Specialized Conference on Sequencing Batch Reactor Technology SBR. S. Michele a Ripa, Rome, Italy. 127-130.
56. Prosser J.I. (1989). Autotrophic nitrification in bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* **30**, 125-181.
57. Quan X., Shi H., Wang J. and Qian Y. (2003). Biodegradation of 2,4-dichlorophenol in sequencing batch reactors augmented with immobilized mixed culture. *Chemosphere*. **50**, 1069-1074.
58. Satoh H., Sasaki, Y., Nakamura Y., Okabe S., Suzuki T. (2005). Use of microelectrodes to investigate the effects of 2-chlorophenol on microbial activities in biofilms. *Wiley Interscience*. **91**, 133-137.
59. Schmidt I., Sliemers O., Schmid M., Bock E., Fuerst J., Kuenen J.G., Jetten M. and Strous M. (2003). New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater. *FEMS Microbiology Reviews*. **27**, 481-492.
60. Schmidt L. M., Delfino J. J., Preston J. F., Laurent G. (1999) Biodegradation of low aqueous concentration pentachlorophenol (PCP) contaminated groundwater *Chemosphere* **38** (12), 2897-2912

61. Sijbesma W.F.H., Almeida J.S., Reis M.A.M. and Santos H. (1996). Uncoupling effect of nitrite during denitrification by *Pseudomonas fluorescens*: an in vivo ³¹P-NMR study. *Biotechnology and Bioengineering*. **52**, 176-182.
62. Sikkema J., de Bont J.A.M. and Poolman B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbial. Reviews*. **59**(2), 201-222.
63. 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.
64. Silva L. (2007) Estudio fisiológico de la nitrificación en presencia de *p*-cresol. Tesis de maestría realizada en la Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa.
65. Silva C. D., Gómez J., Houbron E., Cuervo-López F.M. and Texier A.-C. (2009). *p*-Cresol biotransformation by a nitrifying consortium. *Chemosphere* **75**, 1387-1391.
66. Stouthamer A.H. (1976). Biochemistry and genetics of nitrate reductase in bacteria. *Adv. Microbiol Physiol* **14**, 315-375.
67. Takai T., Hirata A., Yamauchi K. and Inamori Y. (1997). Effects of temperature and volatile fatty acids on nitrification-denitrification activity in small- scale anaerobic - aerobic recirculation biofilm process. *Water Sci. and technology*. **35**, 101-108
68. Texier A-C. and Gomez J. (2002). Tolerance of nitrifying sludge to *p*-cresol. *Biotechnol. Lett.* **24**, 321-324.
69. Texier A-C. and Gomez J. (2004). Settleability and Kinetics of a nitrifying sludge in a sequencing batch reactor. *Can. J. Microbiol.* **50**, 943-949.
70. Texier A-C. and Gomez J. (2007). Simultaneous nitrification and *p*-cresol oxidation in a nitrifying sequencing batch reactor. *Wat. Res.* **41**, 315-322.

71. Underhill S.E. and Prosser J.E. (1985). Inhibition of nitrification by potassium ethyl xanthate in **soil** and in liquid culture. *Soil Biology and Biochemistry*. 178-229.
72. Van Schie P.M. and Young L.Y. (2000). Biodegradation of Phenol: Mechanisms and Applications. *Bioremediation Journal*. **4**, 1-18.
73. Watson S.W., Valois F.W. and Waterbury J.B. (1981). In "The Prokaryotes" (M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Truper, A. Balows and H.G. Schlegel, Eds). Springer-Verlag, Berlin. **1**, 1005-1022.
74. Watson S. W. (1974). In Bergey's manual of determinative bacteriology (R.E. Buchanan and N.E. Gibson Eds). Williams and Wilkins Baltimore. 8th ed. 450-456.
75. Watson S. W., Bock E., Harms H., Koops H.P. and Hooper, A.B. (1989). Nitrifying Bacteria. Secc. 20: Aerobic chemolithotrophic Bacteria and associated organism. *Bergey's Manual of systematic bacteriology*. **3**. 8ed. 1807-1834.
76. www.conagua.gob.mx
77. www.ingenieroambiental.com
78. Young K., Daniel J., Lewis S. (2002). Kinetic and inhibition studies for the aerobic cometabolism of 1,1,1-trichloroethane, 1,1-dichloroethylene and 1,1-dichloroethane by a butane-grown mixed culture. *Biotechnology and Bioengineering*. **80**, 498-508.
79. Zepeda A., Texier A-C. and Gomez J. (2003). Benzene transformation in nitrifying batch culture. *Biotechnol. Prog.* **19**, 789-793.
80. Zepeda A., Texier A-C., Razo-Flores E. and Gomez J. (2006). Kinetic and metabolic study of benzene, toluene and *m*-xylene in nitrifying batch cultures. *Wat. Res.* **40**, 1643-1649.
81. Zepeda A., Texier A-C. and Gomez J. (2007). Batch nitrifying cultures in presence of mixtures of benzene, toluene, and *m*-xylene. *Environ. Technol.* **28**, 355-360.

Efecto del 2-clorofenol sobre la nitrificación

Que presentó:

Q.F.B Jesús Emanuel Pérez Alfaro

Comité tutorial

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

Dra. Anne-Claire Texier Valentin
Asesor, UAM-Iztapalapa

Dr. Germán Buitrón Méndez
Asesor, UNAM

H. Jurado

Presidenta: Dra. Anne-Claire Texier

Secretaria: Dra. Florina Ramírez Vives

Vocal: Dr. Germán Buitrón Méndez

Vocal: Dr. Felipe Martínez Orta

Texier.
Florina Ramírez Vives
Buitrón
Felipe Martínez Orta