

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



Unidad Iztapalapa

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

**ESTUDIO FISIOLÓGICO DE LA NITRIFICACIÓN Y OXIDACIÓN
DEL *p*-CRESOL EN UN CONSORCIO NITRIFICANTE**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A

M. en B. CARLOS DAVID SILVA LUNA

DIRECTORA DE TESIS

DRA. ANNE-CLAIRE TEXIER

Esta tesis se llevó a cabo en el Laboratorio de Fisiología Microbiana W-004 del Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa, gracias al apoyo otorgado por el **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** con los proyectos SEP-CONACYT-CO2-43144 y SEP-CONACYT-CB-2005-C01-49748-Z.

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** con la referencia 001466.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente la dirección de la Dra. Anne-Claire Texier durante la escritura de esta tesis, así como su invaluable apoyo durante mis estudios de posgrado. Gracias por su profesionalismo, dedicación, consejos y el tiempo invertido en mi formación. Merci pour ton amitié.

Al Dr. Jorge Gómez y a la Dra. Flor Cuervo por su colaboración a este trabajo y en todos los proyectos que realicé durante mi estancia en el laboratorio de Fisiología Microbiana. Gracias Dr. Gómez por brindarme la oportunidad de desarrollarme en el laboratorio y por esas agradables charlas académicas y personales. Gracias Dra. Cuervo por sus sugerencias, disposición y críticas constructivas para mi trabajo.

Al jurado que revisó este trabajo por sus comentarios y sugerencias.

A todos los compañeros y amigos del laboratorio de Fisiología Microbiana, a mis viejos amigos Ricardo y Gehovana, gracias por su ayuda y los buenos consejos. Felipe gracias por la compañía en las tardes de trabajo. Dennys, Emir, Emmanuel, Edna, Sergio, Diego, Karina, Vicente, Arturo y Citlali gracias por su amistad, el buen ambiente de trabajo y hacerme sentir como en casa cuando laborábamos juntos en el laboratorio.

A los compañeros y amigos del edificio W y del Posgrado en Biotecnología gracias Manuel, R. Huizache, Ulises G., Neith, Gabriel, Ulises D., por brindarme el privilegio de su amistad y compañerismo, gracias por todo.

Finalmente y no menos importante doy gracias a Dios por permitirme tomar este camino.

Dedicatorias:

A Sara

A mis padres

A mis hermanos

Libre, y para mí muy sagrado, el derecho de pensar.
Benito Juárez

Contenido

Resumen.....	I
Abstract	III
Panorama	IV
1. Introducción.....	1
1.1 Estrategias para eliminar el nitrógeno amoniacal del agua	1
1.1.1 Métodos fisicoquímicos para eliminar amonio del agua	1
1.1.2 Eliminación biológica del amonio.....	2
1.1.2.1 Tratamientos biológicos mixtos de eliminación de amonio	2
1.1.2.2 Desnitrificación.....	5
1.2 Nitrificación	6
1.2.1 Microbiología de la nitrificación.....	7
1.2.1.1 Las bacterias amonio oxidantes	7
1.2.1.2 Las bacterias nitrito oxidantes	8
1.2.1.3 Las arqueas amonio oxidantes	10
1.2.2 Aspectos bioquímicos y metabólicos de la nitrificación.....	11
1.2.2.1 La amonio oxidación	11
1.2.2.2 La nitrito oxidación	16
1.2.3 Aspectos cinéticos de la nitrificación	18
1.2.4 Condiciones ambientales que afectan la nitrificación.....	20
1.2.4.1 Temperatura.....	21
1.2.4.2 Efecto del pH	22
1.2.4.3 Efecto del oxígeno en la nitrificación	24
1.2.4.4 Inhibición de la nitrificación por sustratos	25
1.2.4.5 Inhibidores de la nitrificación.....	28
1.3 Efecto de los compuestos orgánicos sobre la nitrificación	30
1.3.1 Inhibición de la nitrificación por compuestos orgánicos.....	32
1.3.2 Inhibición de la nitrificación por compuestos fenólicos.....	35
1.3.3 Oxidación de compuestos fenólicos por lodos nitrificantes.....	38
1.4 Reactores nitrificantes de lotes secuenciados.....	40
2. Justificación.....	62
3. Objetivos.....	64
3.1 Objetivo general.....	64

3.2 Objetivos específicos	64
4. Materiales y Métodos	66
4.1 Reactor nitrificante en continuo	66
4.2 Cultivos en lote.....	67
4.3 Reactores de lotes secuenciados (SBR)	68
4.4 Métodos analíticos	71
4.4.1 Cuantificación de amonio	72
4.4.2 Cuantificación de nitrito y nitrato	73
4.4.3 Cuantificación de carbono orgánico total	75
4.4.4 Cuantificación de <i>p</i> -cresol e intermediarios.....	76
4.4.5 Cuantificación de proteína microbiana	77
4.4.6 Determinación de oxígeno disuelto y pH	78
4.5 Variables de respuesta	78
5. Resultados y discusión	83
5.1 Reactor nitrificante en continuo	83
5.2 Cultivos en lote.....	84
5.2.1 Efecto del <i>p</i> -cresol en cultivos nitrificantes en lote	84
5.2.2 Oxidación del <i>p</i> -cresol por el cultivo nitrificante	87
5.2.3 Oxidación del <i>p</i> -cresol por cultivos tratados con alitiourea	90
5.2.4 Efecto del <i>p</i> -hidroxibenzaldehído en la nitrificación.....	91
5.3 Reactor de lotes secuenciados.....	96
5.3.1 Efecto de la adición de <i>p</i> -cresol en la actividad de un lodo nitrificante en un reactor de lotes secuenciados	96
5.3.1.1 Reactor nitrificante control.....	96
5.3.1.2 Reactor nitrificante alimentado con <i>p</i> -cresol	98
5.3.2 Oxidación del <i>p</i> -cresol por un cultivo nitrificante en un reactor de lotes secuenciados.....	101
5.3.2.1 Oxidación del <i>p</i> -hidroxibenzaldehído (<i>p</i> OHDO) y <i>p</i> -hidroxibenzoato (<i>p</i> OHTO) por un cultivo nitrificante en un reactor de lotes secuenciados	104
6. Conclusiones generales y recomendaciones.....	114
7. Anexo I.....	117
7.1 Ejemplos del ajuste de las velocidades específicas por el modelo de Gompertz.	117
8. Publicaciones relacionadas con esta tesis doctoral.....	120

Índice de Figuras

Figura 1. Ciclo biogeoquímico del nitrógeno.	IV
Figura 2. Tres enfoques principales para la eliminación de nitrógeno por nitrificación-desnitrificación.	4
Figura 3. Árbol filogenético de las bacterias nitrificantes basado en el análisis comparativo del 16S rRNA.	9
Figura 4. Vía amonio oxidante en las AOB.	11
Figura 5. Modelo del transporte de electrones en las AOB.	12
Figura 6. Modelo del flujo de electrones en <i>Nitrobacter</i>	16
Figura 7. Esquema del reactor de lotes secuenciados.	41
Figura 8. Esquema del reactor nitrificante en continuo.	66
Figura 9. Esquema de los SBR nitrificantes.	69
Figura 10. Curva de calibración para la cuantificación de amonio.	73
Figura 11. Curva de calibración para la cuantificación de nitrito y nitrato por HPLC.	74
Figura 12. Curvas de calibración para la cuantificación de nitrito y nitrato por electroforesis capilar.	75
Figura 13. Curvas de calibración de carbono total y carbono inorgánico.	76
Figura 14. Curvas de calibración de <i>p</i> -cresol, <i>p</i> -hidroxibenzaldehído (<i>p</i> OHDO) y <i>p</i> -hidroxibenzoato (<i>p</i> OHTO) por HPLC.	77
Figura 15. Curva de calibración para la cuantificación de proteína microbiana por el método de Lowry.	78
Figura 16. Perfil del reactor nitrificante en continuo.	84
Figura 17. Perfil cinético del proceso nitrificante en cultivos en lote.	85
Figura 18. Perfil nitrificante en cultivos adicionados con <i>p</i> -cresol (25 mg C L ⁻¹).	85
Figura 19. Oxidación del <i>p</i> -cresol por un consorcio nitrificante sin (a) y con (b) alitiourea.	88
Figura 20. Perfil nitrificante con <i>p</i> -hidroxibenzaldehído adicionado (25 mg C L ⁻¹).	93
Figura 21. Oxidación del <i>p</i> -hidroxibenzaldehído por el consorcio nitrificante.	94
Figura 22. Perfil nitrificante del SBR sin adición de <i>p</i> -cresol.	97
Figura 23. Perfiles nitrificantes a los ciclos 1 (a) y 60 (b) del SBR sin alimentación de <i>p</i> -cresol.	97

Figura 24. Desempeño del SBR nitrificante con adición de <i>p</i> -cresol.....	99
Figura 25. Concentraciones iniciales y finales de <i>p</i> -cresol a través de los ciclos de operación del SBR nitrificante.	101
Figura 26. Perfil de oxidación del <i>p</i> -cresol (25 mg C L ⁻¹) e intermediarios al ciclo 132.	102
Figura 27. Consumo de <i>p</i> -cresol e intermediarios en el reactor SBR nitrificante a los ciclos (a) 160 y (b) 225.	105
Figura 28. Acumulación de <i>p</i> -hidroxibenzaldehído y <i>p</i> -hidroxibenzoato en el efluente del SBR nitrificante alimentado con diferentes concentraciones iniciales de <i>p</i> -cresol (25, 50, 100 y 200 mg C L ⁻¹).	106

Índice de Tablas

Tabla 1. Ejemplos de parámetros cinéticos para las AOB y NOB.	19
Tabla 2. Límites de concentración de compuestos inhibitorios inorgánicos para la nitrificación encontrados en aguas residuales.	29
Tabla 3. Capacidad de cultivos nitrificantes para eliminar algunos compuestos orgánicos y su efecto en la nitrificación.	31
Tabla 4. Inhibición de la nitrificación por compuestos fenólicos.	36
Tabla 5. Composición del medio de cultivo para el reactor nitrificante en continuo.	67
Tabla 6. Composición del medio de cultivo para los cultivos nitrificantes en lote.	68
Tabla 7. Composición del medio de cultivo para los reactores de lotes secuenciados.	70
Tabla 8. Concentraciones iniciales del <i>p</i> -cresol adicionado al SBR2.	71
Tabla 9. Coeficientes de correlación y de variación de las pendientes correspondientes a las curvas de calibración realizadas por los diferentes métodos analíticos.	71
Tabla 10. Velocidades de carga y descarga del reactor nitrificante.	84
Tabla 11. Velocidades específicas y fase de retardo de los cultivos nitrificantes en lote en ausencia (control) o presencia de <i>p</i> -cresol.	86
Tabla 12. Balance de carbono en los cultivos nitrificantes (24 h) adicionados con <i>p</i> -cresol.	88
Tabla 13. Velocidades específicas y fase de retardo de los cultivos nitrificantes en lote en ausencia o presencia de <i>p</i> -cresol o <i>p</i> -hidroxibenzaldehído.	92
Tabla 14. Velocidades específicas de consumo de amonio y producción de nitrato a diferentes concentraciones iniciales de <i>p</i> -cresol en un SBR.	100
Tabla 15. Velocidades específicas de consumo de <i>p</i> -cresol en un reactor nitrificante de lotes secuenciados.	103
Tabla 16. Coeficientes de correlación para el ajuste del modelo de Gompertz a los perfiles nitrificantes, de oxidación de <i>p</i> -cresol y <i>p</i> OHDO.	118

Resumen

Un reactor nitrificante en continuo en estado estacionario sirvió como fuente de inóculo para realizar cultivos nitrificantes en lote y operar dos reactores de lotes secuenciados (SBR) nitrificantes. En ambos sistemas de estudio, se evaluó el efecto del *p*-cresol sobre el metabolismo de un consorcio nitrificante, así como la capacidad del lodo en oxidar el compuesto fenólico.

En cultivos en lote, se observó el efecto inhibitorio de 25 mg C L⁻¹ de *p*-cresol sobre la nitrificación a través de un descenso en las velocidades del proceso, siendo más afectada la amonio oxidación que la nitrito oxidación. Las velocidades específicas de consumo de amonio (q_{NH_4}) y producción de nitrato (q_{NO_3}) disminuyeron un 83 y 60%, respectivamente respecto a los cultivos control. Sin embargo, después de 48 h, los cultivos alcanzaron una eficiencia en el consumo de amonio (E_{NH_4}) de 96% ± 9 y un rendimiento en la producción de nitrato (Y_{NO_3}) de 0.95 ± 0.06 g N-NO₃⁻ producido g⁻¹ N-NH₄⁺ consumido. Estos resultados indicaron que la nitrificación únicamente fue afectada en su velocidad ya que el nitrato siguió siendo el principal producto de la vía.

El *p*-cresol fue totalmente consumido a las 2 h de cultivo, a una velocidad específica de 0.17 ± 0.06 mg C mg⁻¹ proteína microbiana h⁻¹. Se identificaron y cuantificaron dos intermediarios de la oxidación del *p*-cresol: el *p*-hidroxibenzaldehído (*p*OHDO) y el *p*-hidroxibenzoato (*p*OHTO). Ambos intermediarios desaparecieron del cultivo y de acuerdo con la concentración de carbono orgánico total a las 24 h, no hubo presencia de materia orgánica remanente en el cultivo. El bajo rendimiento de producción de biomasa ($Y_{\text{BM}} = 0.15 \pm 0.02$ mg C-biomasa mg⁻¹ C-*p*-cresol consumido) indicó que solamente el 15% del carbono de *p*-cresol consumido fue asimilado, sugiriendo que el *p*-cresol fue principalmente mineralizado. El consorcio mostró la capacidad metabólica de oxidar simultáneamente al *p*-cresol y al amonio con eficiencias de consumo cercanas al 100%, obteniéndose CO₂ y NO₃⁻ como productos finales mayoritarios.

El consorcio nitrificante fue capaz de oxidar al *p*-cresol con la enzima amonio monooxigenasa (AMO) totalmente inhibida por alitiourea, con la formación secuencial de los mismos intermediarios y en un patrón cinético muy similar a los cultivos sin

aliltiourea. Esto sugirió que la AMO no estuvo involucrada en la oxidación del *p*-cresol y que la inhibición de la nitrificación, en particular de la amonio oxidación, no fue de tipo enzimática. Los resultados sugirieron que la microflora heterótrofa del consorcio nitrificante pudo haber sido involucrada en la oxidación de los compuestos orgánicos. Al adicionar *p*OHDO a los cultivos en lote, se encontró que las q_{NH_4} y q_{NO_3} disminuyeron en la misma proporción que cuando el *p*-cresol fue adicionado inicialmente. Además, la velocidad específica de consumo de *p*OHDO fue ocho veces menor que la velocidad específica de consumo de *p*-cresol, teniendo como consecuencia una acumulación de *p*OHDO en el cultivo. Los resultados anteriores sugieren que la oxidación del *p*OHDO fue el paso limitante en la mineralización del *p*-cresol por el consorcio nitrificante y que éste pudiera ser el verdadero responsable de la inhibición de la nitrificación.

En el SBR, el consorcio nitrificante fue capaz de oxidar todas las concentraciones iniciales probadas de *p*-cresol ($25\text{-}200 \text{ mg C L}^{-1}$) y simultáneamente oxidar al amonio a nitrato con una actividad nitrificante estable, obteniéndose una E_{NH_4} de $99.0\% \pm 0.5$ y un Y_{NO_3} de 0.98 ± 0.07 . El consorcio toleró la adición de *p*-cresol en el SBR a una velocidad de carga de hasta $400 \text{ mg C-}p\text{-cresol L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ sin que se afectara su actividad nitrificante. El *p*-cresol fue transformado a *p*OHDO y *p*OHTO antes de ser mineralizado. Los resultados cinéticos demostraron que el SBR permitió un incremento en la capacidad metabólica del consorcio nitrificante para oxidar cada vez más rápidamente al *p*-cresol y sus intermediarios a través de los ciclos de operación. El *p*OHDO fue el más recalcitrante, ya que presentó una mayor acumulación en los cultivos del SBR. Aunque aumentó la velocidad de crecimiento del lodo al adicionar *p*-cresol en el SBR de 1.0 a $4.6 \text{ mg proteína microbiana L}^{-1} \text{ ciclo}^{-1}$, el rendimiento de biomasa se mantuvo bajo ($0.04 \pm 0.01 \text{ mg C-biomasa mg}^{-1} \text{ C-}p\text{-cresol consumido}$). Esto muestra que, bajo las condiciones experimentales utilizadas (C/N baja, inóculo estable fisiológicamente, medio de cultivo), el proceso fue desasimilativo, limitando el crecimiento excesivo de biomasa. Estos resultados indican que el reactor de lotes secuenciados nitrificante puede ser una buena opción para eliminar simultáneamente amonio y compuestos inhibitorios o recalcitrantes del agua, tales como los derivados del fenol.

Abstract

A continuous nitrifying reactor in steady-state was used as a source of inoculum for performing kinetics of nitrifying batch cultures and operating two nitrifying sequential batch reactors (SBR). In both sets of study, the effect of *p*-cresol on the metabolism of a nitrifying consortium and the capacity of the sludge to oxidize the phenolic compound were evaluated.

In batch cultures, the inhibitory effect of *p*-cresol on nitrification was observed through a decrease in the velocities of the process, the ammonium oxidizing process being the most affected. At a *p*-cresol concentration of 25 mg C L⁻¹, the specific rates of ammonium consumption (q_{NH_4}) and nitrate production (q_{NO_3}) decreased by 83 and 60%, respectively respect to the control cultures. However, after 48 h, ammonium consumption efficiency (E_{NH_4}) was 96% ± 9 while nitrate yield (Y_{NO_3}) reached 0.95 ± 0.06 g NO₃⁻-N g⁻¹ NH₄⁺-N consumed. These results showed that the nitrifying metabolic pathway was only affected at the specific rate level being nitrate the main end product.

p-Cresol was completely consumed after 2 h of culture at a specific rate of 0.17 ± 0.06 mg C mg⁻¹ microbial protein h⁻¹. *p*-Hydroxybenzaldehyde (*p*OHBD) and *p*-hydroxybenzoate (*p*OHBT) were identified and quantified as transient intermediates of *p*-cresol oxidation. Both intermediates were eliminated from the culture after 24 h. The total organic carbon concentration reached a value close to zero after 24 h, showing the absence of organic matter in the culture. The low biomass production yield ($Y_{\text{BM}} = 0.15 \pm 0.02$ g biomass-C g⁻¹ *p*-cresol-C consumed) indicated that only 15% of the consumed *p*-cresol carbon was assimilated, suggesting that *p*-cresol was mainly mineralized. The sludge showed the metabolic capacity to oxidize simultaneously *p*-cresol and ammonium with consumption efficiencies close to 100%, producing CO₂ and NO₃⁻ as main final products.

When allylthiourea was added into the culture as a selective inhibitor of the enzyme amonio monooxygenase (AMO), the nitrifying consortium was still able to oxidize *p*-cresol to the same intermediates and in a similar kinetic pattern as obtained without

the AMO inhibitor. This suggested that the AMO was not involved in the *p*-cresol oxidation and that the inhibition of nitrification, especially of the ammonium oxidation process, was not an enzymatic inhibition. Results suggested that the heterotrophic microflora of the nitrifying consortium might be involved in the oxidation of the organic compounds.

When *p*OHBD was added to the nitrifying batch cultures, q_{NO_3} and q_{NH_4} decreased in the same ratio than when *p*-cresol was initially added. Furthermore, the specific velocity of *p*OHBD consumption was eight times lower than the specific *p*-cresol consumption rate, having as a consequence an accumulation of *p*OHBD and a rapid elimination of *p*-cresol from the culture. These results suggested that *p*OHBD could be the main responsible for nitrification inhibition. *p*OHBD oxidation was the rate limiting step in *p*-cresol mineralization by the nitrifying consortium.

In the SBR, at all tested initial *p*-cresol concentrations (25-200 mg C L⁻¹), the nitrifying sludge was able to oxidize simultaneously ammonium and *p*-cresol with a stable nitrifying activity, obtaining a E_{NH_4} of 99.0% ± 0.5 and a Y_{NO_3} of 0.98 ± 0.07 for all cycles. Up to 400 mg C L⁻¹ d⁻¹ of *p*-cresol can be tolerated by the nitrifying sludge without affecting its activity. *p*-Cresol was first transformed to *p*OHBD and *p*OHBT, which were later completely mineralized. Kinetic results showed that the SBR system allowed an increase in the metabolic ability of the sludge to oxidize *p*-cresol and its intermediates as they were oxidized faster and faster throughout the cycles. *p*-Hydroxybenzaldehyde appeared to be the most recalcitrant in the culture as it showed the highest accumulation in the SBR cultures. Although the growth rate of the sludge increased from 1.0 to 4.6 mg microbial protein L⁻¹ cycle⁻¹ when *p*-cresol was added into the SBR, the biomass yield remained low (0.04 ± 0.01 mg biomass-C mg⁻¹ *p*-cresol-C consumed). This shows that, under the experimental conditions used (low C/N value, physiologically stable inoculum, culture medium), the process was dissimilative, limiting an excess sludge formation. Results indicate that nitrifying SBR may be a good alternative to eliminate simultaneously ammonium and inhibitory or recalcitrant chemicals, such as phenolic compounds from wastewaters.

Panorama

En la actualidad, es claro que el ser humano tiene una influencia notable sobre los ecosistemas del planeta. El crecimiento de la población ha llevado al hombre a conseguir cada vez más recursos para su supervivencia. Estos recursos se obtienen por medio de actividades como la agricultura, industria, pesca, comercio, etc. Sin embargo, la inadecuada planeación y ejecución de estas actividades puede ocasionar daños al ambiente, como la pérdida irreversible de la diversidad biológica, cambios en el clima global y alteraciones drásticas en los ciclos biogeoquímicos del planeta (Vitousek y col., 1997a).

El ciclo del nitrógeno (Figura 1) es uno de los ciclos biogeoquímicos que han sido afectados por las actividades humanas de una manera drástica en los últimos 50 años. El nitrógeno molecular (N_2) que se encuentra en la atmósfera, es el depósito más grande de nitrógeno en el planeta y a partir de ahí, éste es transformado a diferentes formas en la tierra continental y océanos del mundo, para regresar a la atmósfera de nuevo.

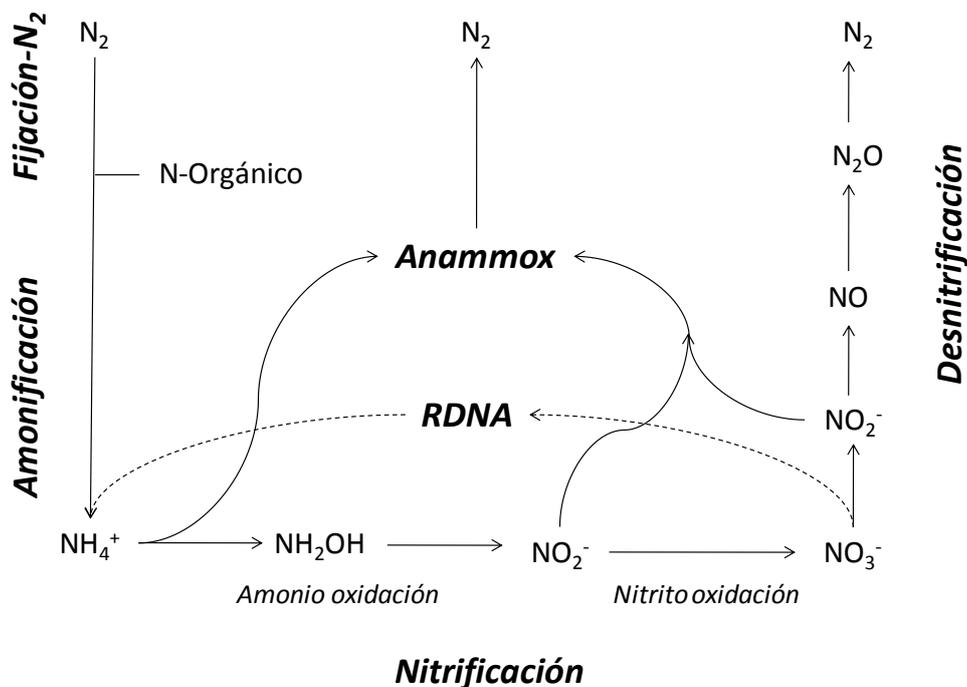


Figura 1. Ciclo biogeoquímico del nitrógeno (Modificado de Francis y col., 2007 y Beristain-Cardoso y col., 2009). RDNA =Reducción desasimilatoria del nitrato a amoníaco.

El ciclo del nitrógeno lo conforman los siguientes procesos reductivos: fijación del nitrógeno, amonificación, reducción desasimilatoria del nitrato a amoniaco (RDNA), ANAMMOX y desnitrificación. La nitrificación es el único proceso oxidativo del ciclo. Los compuestos que están involucrados en el ciclo del nitrógeno pueden servir directamente como fuente de nitrógeno para diversos microorganismos, que a su vez, al transformarlos, nutren suelos y ambientes acuáticos para que organismos superiores obtengan nitrógeno para sintetizar nucleótidos y proteínas. Esta capacidad de los microorganismos para transformar el N_2 es vital para todas las formas de vida en el planeta (Beristain-Cardoso y col., 2009).

Ciertas acciones humanas pueden particularmente afectar el flujo natural del nitrógeno en el ciclo, por ejemplo el abuso de fertilizantes nitrogenados en la agricultura puede alterar la fijación natural del nitrógeno en los suelos, mientras que el uso excesivo de combustibles fósiles y la quema de zonas forestales puede aumentar la concentración de NO y N_2O en la atmósfera. En los ambientes acuáticos, las formas reactivas de nitrógeno inorgánico (NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^-) pueden causar diferentes efectos negativos al ambiente. El nitrógeno inorgánico puede provenir de aguas residuales municipales e industriales, granjas de producción animal, acuicultura, infiltraciones de depósitos de basura, entre otras fuentes de contaminación. De acuerdo con Camargo y Alonso (2006), algunos de los problemas ambientales que provoca la contaminación del agua por nitrógeno son: (1) acidificación de cuerpos de agua dulce, (2) desarrollo y proliferación de productores primarios (algas) que resultan en la eutroficación de ríos, lagos, estuarios y costas, (3) incapacidad de la fauna acuática para crecer y reproducirse adecuadamente. Es conocido que el amoniaco (NH_3) es tóxico para la fauna acuática mientras que el amonio (NH_4^+) es aparentemente menos tóxico (Cervantes, 2009). Por ejemplo, el NH_3 puede causar diferentes efectos negativos en los peces como la acidosis en la sangre, inhibición en la producción de ATP y represión del sistema inmune (Camargo y Alonso, 2006).

Desde luego que la contaminación del agua por nitrógeno también representa un riesgo para la salud del hombre. Por ejemplo, beber agua contaminada con nitrato a una concentración superior a $10 \text{ mg N-NO}_3^- \text{ L}^{-1}$ puede ocasionar problemas a la salud, ya que el nitrato en el estómago puede reducirse a nitrito (EPA, 1993). En este caso, el

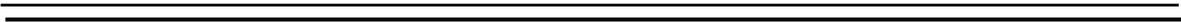
nitrito es absorbido dentro del torrente sanguíneo y puede convertir a la hemoglobina en metahemoglobina. Este fenómeno llamado metahemoglobinemia ocasiona un ineficaz transporte del oxígeno en la sangre, pudiendo ocasionar la muerte, sobre todo en infantes, cuando la metahemoglobinemia es crónica (Dahab y Lee, 1988; EPA, 1993; Ward y col., 2005). Por otro lado, en algunos estudios, se ha investigado si el consumo de agua contaminada con nitrito puede ocasionar cáncer en los consumidores al tener contacto el nitrito con la saliva y formar nitrosaminas (Ward y col., 2005).

Está documentado que cuando existe un exceso de nutrientes en cuerpos de agua dulce y costas marinas, debido a descargas de aguas contaminadas con fósforo y compuestos nitrogenados como el amonio, se puede presentar el fenómeno llamado eutroficación (Smith, 2003; Smith y col., 2006). La eutroficación es un proceso donde ocurre un crecimiento desmedido de macro algas y fitoplancton en un ambiente acuático, ocasionando problemas como la anoxia (ausencia de oxígeno) o hipoxia (baja concentración de oxígeno) en el sistema hídrico (Vitousek y col., 1997b). Estas condiciones anóxicas pueden prevalecer más tiempo en estuarios y costas marinas. La limitación de oxígeno causada por la eutroficación ocasionaría una pérdida de diversidad acuática, además de propiciar la formación de compuestos tóxicos como el sulfuro de hidrógeno (H_2S) en fondos marinos y sedimentos. El H_2S es considerado muy dañino para la fauna acuática ya que afecta el sistema nervioso central (Ortiz y col., 1993). Algunos otros efectos de la eutroficación son la reducción en la disponibilidad de la luz debido a la disminución en la transparencia de las columnas de agua, el aumento en la sedimentabilidad de la materia orgánica, daños a la salud en poblaciones de coral, problemas de infiltración en sistemas de abastecimiento de agua potable y un impacto económico negativo, al favorecer la depreciación de sitios turísticos debido a la pérdida de la estética y a los malos olores (Smith, 2003; Camargo y Alonso, 2006).

El ser humano persiste en transformar el ciclo del nitrógeno, a una velocidad cada vez mayor, provocando una cascada de problemas ambientales y de salud pública. Sin duda es necesario desarrollar estrategias que permitan entre otras cosas, optimizar el consumo de nitrógeno de los cultivos agrícolas, disminuir las emisiones de óxidos de nitrógeno derivados de la quema de combustibles fósiles, mejorar el manejo de

desechos de la producción animal, así como aumentar el volumen de aguas urbanas tratadas (Galloway y col., 2008).

Esta tesis se enfocó en el estudio de la nitrificación, que forma parte del ciclo del nitrógeno. El hombre ha aprendido a utilizar algunos procesos del ciclo del nitrógeno en su beneficio, tal es el caso de la nitrificación que forma parte del sistema biológico de tratamiento de aguas residuales para eliminar nitrógeno amoniacal donde también está involucrado el proceso desnitrificante. Los aportes al tema por esta tesis se centran en el entendimiento de la inhibición de la nitrificación por la presencia de *p*-cresol, así como la posibilidad de eliminar simultáneamente *p*-cresol y amonio por nitrificación. El *p*-cresol es un compuesto fenólico presente conjuntamente con el amonio en efluentes de diversas industrias como la petroquímica, farmacéutica, de producción de resinas sintéticas, acero y textiles (Olmos y col., 2004; Vázquez y col., 2006; Kim y col., 2008) y puede tener efectos nocivos para la salud del ser humano (Davi y Gnudi, 1999). Mediante estudios de cultivos nitrificantes en lote, se logró comprender mejor las causas que originan la inhibición de la nitrificación en presencia de *p*-cresol, además al trabajar con un reactor de lotes secuenciados nitrificante se encontró evidencia que sustenta la capacidad del lodo nitrificante para eliminar simultáneamente amonio y *p*-cresol.



Introducción

1. Introducción

1.1 Estrategias para eliminar el nitrógeno amoniacal del agua

Para eliminar nitrógeno amoniacal del agua se puede hacer uso de tratamientos fisicoquímicos y/o biológicos.

1.1.1 Métodos fisicoquímicos para eliminar amonio del agua

Los principales procedimientos para eliminar nitrógeno amoniacal del agua son: el arrastre de amoniaco, el uso de resinas de intercambio iónico y la cloración al punto de rompimiento (breakpoint) (Tchobanoglous y Burton, 1991). El tratamiento denominado arrastre de amoniaco o “stripping” consiste en alcalinizar el agua hasta alcanzar un pH entre 10.5 y 11.5 de forma que el equilibrio $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ este desplazado hacia la formación de amoniaco y éste último sea eliminado mediante una corriente de aire (EPA, 1987). Es evidente que el principal problema de utilizar el arrastre de amoniaco es que el contaminante es transportado del agua a la atmósfera. Existen resinas de intercambio iónico, como la zeolita llamada clinoptilolita, que por su estructura con carga negativa tienen una gran afinidad hacia cationes como el amonio. El principal inconveniente consiste en la saturación del intercambiador que obliga a regenerarlo periódicamente, además de los costos de la mayoría de las resinas comerciales. Turan y col. (2005) observaron que una resina clinoptilolita pierde notablemente su capacidad de intercambio iónico en su tercera regeneración. En el tratamiento de aguas residuales, se denomina cloración al punto de rompimiento a la práctica de adicionar hipoclorito suficiente al agua con dos objetivos: el de oxidar el amonio hasta nitrógeno molecular y contar con la presencia de cloro residual libre. El cloro es utilizado debido a su elevado poder oxidante y éste reacciona con el amonio formando cloroaminas, las cuales posteriormente se transforman en tricloruro de nitrógeno, óxido nitroso y finalmente nitrógeno molecular (Sans-Fonfria y Ribas, 1999). Este procedimiento, a pesar de contar con altas eficiencias de eliminación de nitrógeno amoniacal, requiere de un tratamiento posterior del agua con carbón activado para

eliminar el exceso de hipoclorito en el agua tratada. De manera general, los tratamientos fisicoquímicos para eliminar amonio del agua son efectivos y rápidos, sin embargo, generan costos elevados de inversión y operación, además, presentan el grave inconveniente de trasladar el problema ambiental de un lugar a otro.

1.1.2 Eliminación biológica del amonio

Debido a que la eliminación biológica del nitrógeno ofrece ventajas como tener bajos costos de operación y una alta eficiencia, ha sido ampliamente adoptada sobre los tratamientos fisicoquímicos (EPA, 1993). El tratamiento convencional de eliminación biológica del amonio consta de dos procesos microbianos. Se define como el acoplamiento de los procesos nitrificante y desnitrificante para transformar al amonio hasta nitrógeno molecular. En este sistema de tratamiento, están involucradas una serie de reacciones, que se dividen en dos etapas, una aerobia (nitrificación) donde el amonio (NH_4^+) es oxidado a nitrato (NO_3^-), y posteriormente una anóxica (desnitrificación) donde el NO_3^- es reducido a nitrógeno molecular (N_2). En años recientes, se han desarrollado nuevas tecnologías para eliminar nitrógeno amoniacal del agua, que involucran el acoplamiento de una nitrificación parcial y una desnitrificación con nitrito, la oxidación anaerobia del amonio (ANAMMOX) y sistemas combinados (CANON, SHARON-ANAMMOX). Estos procesos son brevemente descritos a continuación.

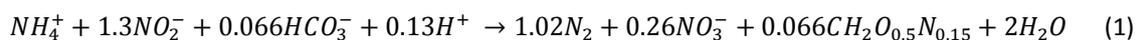
1.1.2.1 Tratamientos biológicos mixtos de eliminación de amonio

Estas tecnologías aprovechan las características de diferentes procesos respiratorios microbianos, así como diferentes configuraciones de reactores, para optimizar la eliminación de amonio.

El sistema denominado SHARON (Single reactor system for High Ammonia Removal Over Nitrite) se basa en una nitrificación parcial, donde mediante el control de la temperatura, del pH y del tiempo de residencia hidráulico (TRH) se obtiene una acumulación de nitrito (Hellings y col., 1998), para su posterior acoplamiento con una desnitrificación vía nitrito (Khin y Annachhatre, 2004). La nitrificación parcial seguida de la desnitrificación ha sido adoptada como una opción real para la eliminación de

nitrógeno debido al ahorro de hasta un 25% en la energía y un 40% en la adición de carbono orgánico en comparación del tratamiento convencional nitrificación-desnitrificación (Paredes y col., 2007). Este proceso conjunto parece ser adecuado para el tratamiento de aguas residuales con alta concentración de amonio, no obstante el control de las variables del sistema puede ser complejo en operaciones a gran escala (Khin y Annachhatre, 2004). Otro sistema mixto de eliminación de amonio del agua es la unión entre SHARON y ANAMMOX (oxidación anaerobia del amonio) (Van Dongen y col., 2001). Este sistema es adecuado para aguas residuales con una alta concentración de amonio pero una baja concentración de carbono orgánico (Jetten y col., 2002).

El ANAMMOX es la conversión biológica del amonio y nitrito a gas dinitrógeno (Jetten y col., 1999; Strous y col., 1999). De acuerdo con Güven y col. (2005) y Villaverde (2004), se muestra a continuación la ecuación global del proceso ANAMMOX (ecuación 1) así como su cambio de energía libre.



$$\Delta G^{0'} = -358 \text{ kJ mol}^{-1}$$

En el proceso ANAMMOX, el amonio es utilizado como donador de electrones y se oxida a nitrógeno molecular, mientras que el nitrito es el aceptor final de electrones. El dióxido de carbono es la principal fuente de carbono para el crecimiento de las bacterias ANAMMOX. Este proceso es llevado a cabo por bacterias que han sido encontradas en una gran variedad de entornos y algunas de ellas han sido tentativamente llamadas *Candidatus "Brocadia anammoxidans"* (Strous y col., 1999) y *Candidatus "Kuenenia stuttgartiensis"* (Schmid y col., 2000) por mencionar algunos ejemplos.

Otra nueva tecnología para eliminar nitrógeno amoniacal del agua es llamada CANON (Completely Autotrophic Nitrogen-Removal Over Nitrite). El principio del proceso CANON es la combinación de una nitrificación parcial y ANAMMOX con la característica de que los dos procesos biológicos se realizan de manera secuenciada en un sólo reactor. Las bacterias nitrificantes oxidan el amonio a nitrito consumiendo el oxígeno disuelto en el reactor, creando las condiciones anóxicas que el proceso ANAMMOX necesita (Ahn, 2006). Una de las desventajas del proceso CANON podría ser las

estrictas características operacionales que se requieren para su adecuado desempeño, como son: concentración de oxígeno, carga de nitrógeno y temperatura (van Loosdrecht, 2004).

En general, estos tratamientos mixtos tienen como ventaja tener alta eficiencia de eliminación de nitrógeno y una reducción de costos respecto al tratamiento biológico convencional. Sin embargo, presentan la desventaja de necesitar un escurpulooso control de las variables como pH, temperatura y concentración de oxígeno (Khin y Annachhatre, 2004; Ahn, 2006), además de tener sensibilidad a la presencia de materia orgánica (Jetten y col., 2002; Khin y Annachhatre, 2004).

Por otro lado, el tratamiento convencional para la eliminación de nitrógeno amoniacal del agua ha sido por muchos años el sistema nitrificación-desnitrificación, que lleva a cabo la transformación del amonio a nitrógeno molecular. Por su alta eficiencia, estabilidad, costo de operación bajo y por ser un proceso relativamente fácil de controlar, este tratamiento ha llegado a ser un método atractivo para eliminar nitrógeno. En el tratamiento de aguas residuales, la nitrificación y la desnitrificación pueden acoplarse como se muestra en la Figura 2, donde se pueden realizar en etapas por separado la oxidación del carbono, nitrificación y desnitrificación (Lin y col., 2009).

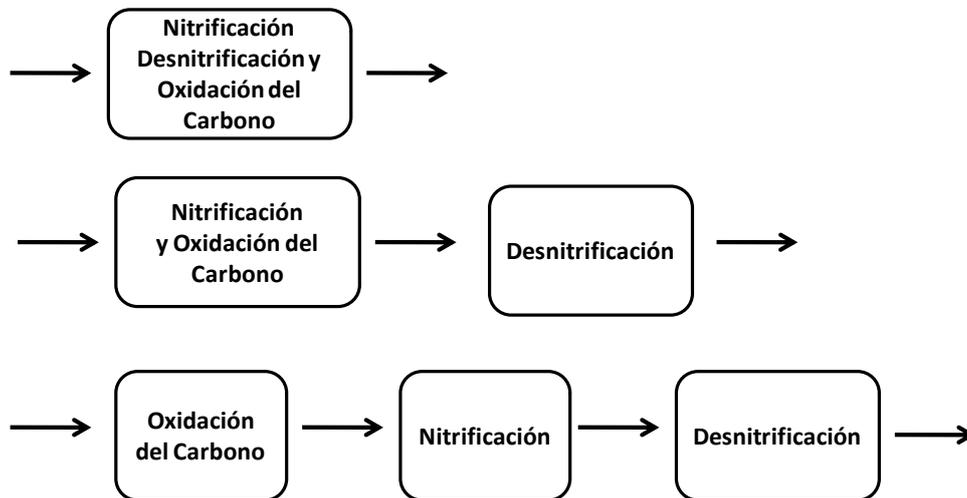
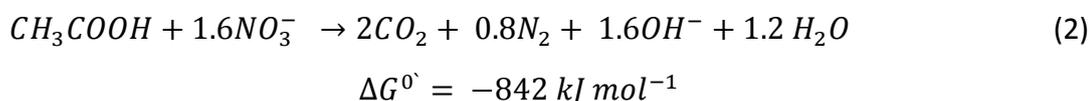


Figura 2. Tres enfoques principales para la eliminación de nitrógeno por nitrificación-desnitrificación.

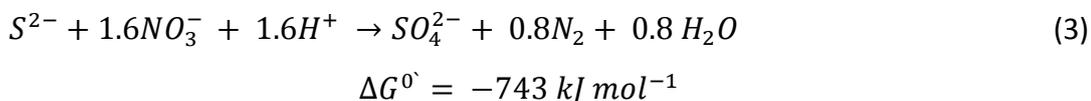
A continuación se describen por separado los procesos desnitrificante y nitrificante.

1.1.2.2 Desnitrificación

La desnitrificación es parte fundamental del tratamiento biológico para eliminar nitrógeno del agua al acoplarse con la nitrificación. La desnitrificación es un proceso anóxico donde el nitrato es reducido a nitrógeno molecular por una sucesión de reacciones catalizadas por enzimas específicas (Martínez, 2007). La desnitrificación puede ser organotrófica o litotrófica dependiendo de su fuente de energía. En la ecuación 2, se esquematiza la reacción global de la desnitrificación organotrófica donde se eliminan compuestos orgánicos (acetato, metanol, lactato, etc.) y nitrato (Cuervo-López y col., 2009).



La desnitrificación litotrófica (ecuación 3) puede eliminar simultáneamente nitrato y compuestos inorgánicos reducidos del azufre (sulfuro, tiosulfato y azufre elemental) (Beristain-Cardoso y col., 2009).



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

En el proceso desnitrificante participan una amplia variedad de bacterias siendo en su mayoría facultativas. Las bacterias desnitrificantes son en su mayoría gram negativas de la clase alfa y beta de *Proteobacteria* como los géneros *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Paracoccus* y *Thiobacillus* por mencionar algunos (Zumft, 1992). Respecto a las condiciones ambientales que tienen un efecto en la desnitrificación, se pueden mencionar la presencia y el tipo de donador de electrones, la ausencia de oxígeno

molecular, el valor de pH, la temperatura, la disponibilidad de nutrientes y el potencial redox (Lin y col., 2009). Se pueden considerar como los factores más críticos a la disponibilidad de una fuente reductora (sustrato orgánico o inorgánico) y la ausencia de oxígeno.

1.2 Nitrificación

Desde hace más de 100 años, la nitrificación ha sido estudiada como parte del ciclo del nitrógeno, para comprender su papel en ecosistemas acuáticos y terrestres (Winogradsky, 1890). En el tratamiento de aguas residuales, la nitrificación es la primera etapa en varios sistemas biológicos de eliminación de nitrógeno (sección 1.1.2.1). La nitrificación es un proceso respiratorio aerobio que implica la oxidación quimiolitotrófica del amonio a nitrato, llevada a cabo en dos etapas y por dos grupos de bacterias gram negativas filogenéticamente no relacionadas (Bernet y Spérandio, 2009). En la primera etapa, el amonio es oxidado a nitrito (nitritación) por las bacterias amonio oxidantes (AOB por sus siglas en inglés). Posteriormente, el nitrito es oxidado a nitrato (nitratación) por las bacterias nitrito oxidantes (NOB, por sus siglas en inglés) (Prosser, 1989; Bock y col., 1991). En cada etapa, las respectivas bacterias nitrificantes utilizan amonio o nitrito como fuente de energía, oxígeno molecular como aceptor final de electrones y CO₂ como fuente de carbono.

Cabe señalar que, en los diferentes ecosistemas en donde se puede apreciar la nitrificación, no únicamente las AOB y NOB son capaces de realizar este proceso. Algunos autores han evaluado la nitrificación heterotrófica que se define como la oxidación del amonio, hidroxilamina o algún compuesto orgánico nitrogenado a nitrito y nitrato por microorganismos quimio-organotrófos (Robertson y Kuenen, 1988; Papen y col., 1989; Mevel y Prieur, 2000). La nitrificación heterotrófica requiere de la presencia de compuestos orgánicos para producir nitrito principalmente y puede suministrar el sustrato a las NOB o al proceso de la desnitrificación organotrófica.

Paracoccus denitrificans posee una enzima amonio oxidante con similitudes con la enzima amonio monooxigenasa (AMO) de las AOB. Por ejemplo, esta enzima de *Paracoccus denitrificans* puede oxidar alcanos, tiene necesidad de cobre y azufre e

inhibición por alitiourea, como la AMO de las AOB. Sin embargo, los genes que la codifican no están cercanamente relacionados con los genes de la AMO de las bacterias amonio oxidantes autótrofas (Crossmann y col., 1997). La importancia ambiental de la nitrificación heterotrófica no está aún del todo clara. Algunos autores asumen que las AOB y NOB son mayoritariamente las responsables de la nitrificación y no los nitrificantes heterótrofos. Se sugiere que los nitrificantes heterótrofos son menos activos y eficientes que los autótrofos y es probable que sus velocidades nitrificantes sean menores (Robertson y Kuenen, 1988). Por otro lado, en la literatura se sugiere que la nitrificación heterotrófica ocurre preferentemente bajo condiciones desfavorables para la nitrificación autotrófica, por ejemplo en suelos ácidos (Schimel y col., 1984; Killham, 1987). Trabajos más recientes evaluaron la nitrificación en suelos ácidos y observaron que la nitrificación heterotrófica contribuye en menor medida en la producción total de nitrito (Stams y col., 1990; Barraclough y Puri, 1995).

Esta tesis doctoral se basa en el estudio de la nitrificación autotrófica, por tal motivo a continuación se desglosan algunos de sus aspectos más relevantes.

1.2.1 Microbiología de la nitrificación

1.2.1.1 Las bacterias amonio oxidantes

Las bacterias amonio oxidantes se han dividido de acuerdo a sus características fenotípicas en cinco géneros: *Nitrosomonas*, *Nitrosolobus*, *Nitrosovibrio*, *Nitrosococcus* y *Nitrospira* (Watson y col., 1989). El género más estudiado sigue siendo *Nitrosomonas*. Con base en los análisis comparativos de las secuencias del 16S rRNA, las AOB se dividen en dos grupos pertenecientes a *Protobacteria*: *beta* y *gamma*. *Nitrosomonas*, *Nitrospira*, *Nitrosovibrio*, *Nitrosolobus* y *Nitrosococcus mobilis* constituyen un conjunto cercanamente relacionado con la subclase *beta* de *Protobacteria* (Head y col., 1993; Teske y col., 1994). Mientras que *Nitrosococcus oceanus* y *Nitrosococcus halophilus* pertenecen a la subclase *gamma* de *Protobacteria* (Purkhold y col., 2000). La Figura 3 muestra el árbol filogenético de las bacterias nitrificantes de acuerdo con el análisis de las secuencias 16S rRNA.

Las AOB han sido aisladas de suelos, ríos, lagos y océanos. Presentan diversos tipos de morfologías como espirales, cocos, y bacilos. Se ha observado un mayor crecimiento en intervalos de temperatura de 25 a 30°C y pH entre 7.5 y 8.0 (Bock y col., 1991).

1.2.1.2 Las bacterias nitrito oxidantes

Las bacterias nitrito oxidantes que han podido ser cultivadas se han dividido en cuatro géneros reconocidos como: *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospira* y *Nitrospina*. Los dos primeros son parte de la subclase *alfa* y *gamma* de *Protobacteria* respectivamente (Teske y col., 1994) mientras que *Nitrospira* forma una división por separado llamada *Nitrospira-phyllum* (Ehrich y col., 1995) (Figura 3). En el caso particular de *Nitrospina*, su afiliación filogenética no está aún del todo clara. Originalmente se le asociaba a la subclase *delta* de *Protobacteria* (Teske y col., 1994) pero estudios más recientes (Schramm, 2003) señalan que no pertenece a esa categoría, y podría estar más cercana al *phyllum* de *Acidobacterium/Holophaga*. Las NOB están catalogadas como quimioautótrofas, ya que utilizan el nitrito como fuente de energía para asimilar carbono inorgánico para su crecimiento. Sin embargo, no todas las NOB son quimioautótrofas obligadas. De hecho, algunas cepas de *Nitrobacter* pueden crecer heterotróficamente (donde la energía y el carbono son obtenidos de una fuente orgánica de carbono) o mixotróficamente (nitrito como fuente de energía y acetato o piruvato como fuente de carbono) (Smith y Hoare, 1968; Steinmüller y Bock, 1977; Watson y col., 1989). A pesar de que varias cepas de *Nitrobacter* son capaces de crecer heterotróficamente, su crecimiento bajo estas condiciones es muy ineficiente y lento.

Además, sustratos inorgánicos diferentes al nitrito como el óxido nítrico pueden ser utilizados para el crecimiento litoautotrófico, indicando una diversidad de metabolismos en algunas especies de *Nitrobacter* (Freitag y col., 1987). *Nitrobacter* también ha demostrado capacidad para crecer en ambientes anóxicos mediante la desnitrificación (Freitag y col., 1987). El nitrato es utilizado como aceptor de electrones derivados de compuestos orgánicos para permitir el crecimiento anaerobio.

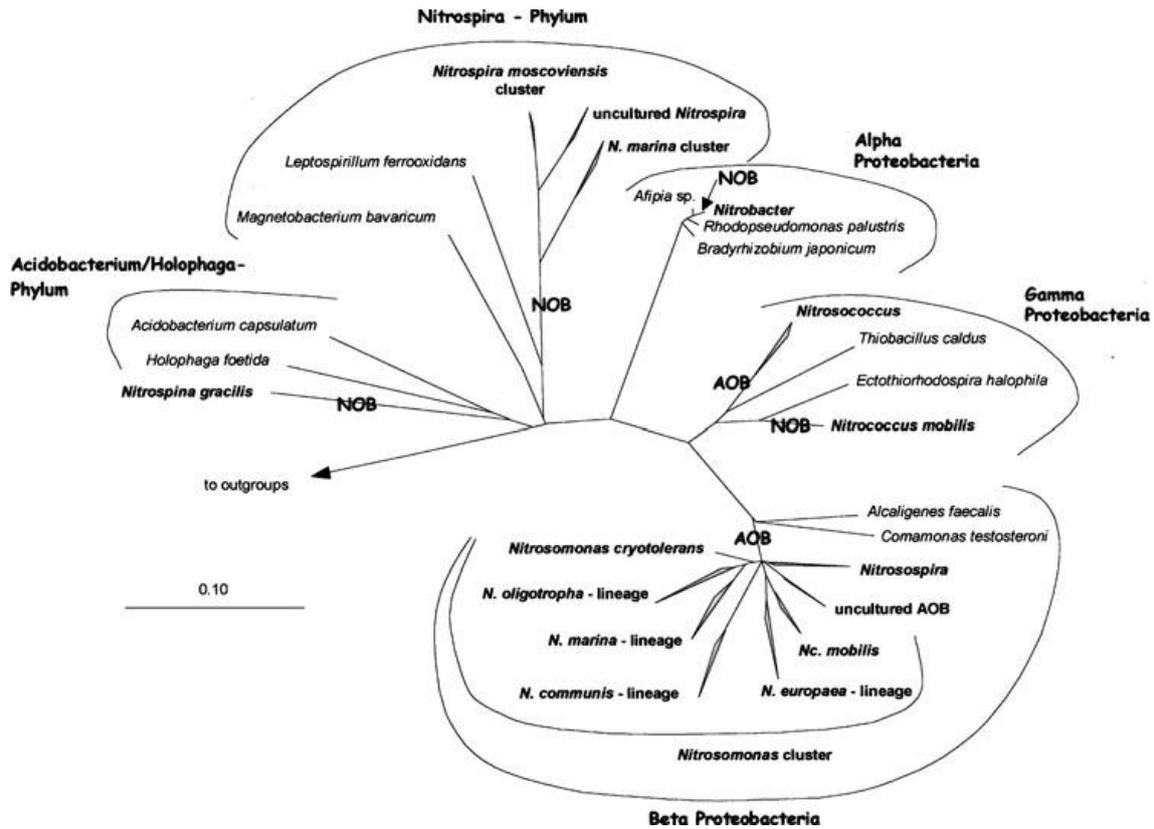


Figura 3. Árbol filogenético de las bacterias nitrificantes basado en el análisis comparativo del 16S rRNA. Los grupos de las bacterias nitrificantes están mostrados en negritas. La barra en escala indica un cambio estimado de 0.1 por nucleótido (Schramm, 2003).

El crecimiento de las NOB puede ocurrir desde un pH de 6.5 a 8.6 y a temperaturas entre los 5 a 37°C (Watson y col., 1989). Las NOB presentan morfologías como cocos y bacilos y pueden encontrarse en suelos, rocas y ríos (Bock y col., 1991).

Aunque *Nitrosomonas* y *Nitrobacter* son los géneros nitrificantes más estudiados, es probable que otras bacterias puedan ser importantes en diferentes ambientes naturales y sistemas de ingeniería. Por ejemplo, algunos autores realizaron la caracterización de lodos nitrificantes en dos plantas de tratamiento en Alemania (Juretschko y col., 1998; Purkhold y col., 2000). Los autores determinaron que diferentes especies de *Nitrosomonas* y *Nitrosococcus* son las bacterias amonio oxidantes más abundantes en estas plantas de tratamiento de aguas residuales. Mientras que, en otros trabajos también realizados en Alemania, se señaló que las NOB más abundantes en sistemas de tratamiento de aguas residuales son bacterias del género *Nitrospira*, en lugar de *Nitrobacter* (Wagner y col., 1996; Juretschko y col., 1998; Daims y col., 2001).

Para algunos autores, es importante conocer el género y especie de las bacterias que se encuentran en plantas de tratamiento. No obstante, la microbiología por sí sola no puede proporcionar toda la información necesaria para controlar un proceso nitrificante. Una evaluación del metabolismo así como los estudios cinéticos, pueden darnos también información útil para entender mejor la nitrificación.

1.2.1.3 Las arqueas amonio oxidantes

Dentro del ciclo del nitrógeno se han estudiado nuevos procesos como el ANAMMOX. Asimismo, han sido identificados nuevos microorganismos participantes en el ciclo. Los microorganismos mesofílicos pertenecientes al reino *Crenarchaeota* dentro del dominio Archaea están ampliamente distribuidos en el planeta. En los últimos años, se han realizado avances en entender su fisiología y función biogeoquímica. Se encontró que, en cepas de ambientes marinos (Venter y col., 2004) y de suelos (Treush y col., 2005), estas *Crenarchaeota* poseen genes que codifican para una enzima amonio monooxigenasa (*amoA*), sugiriendo su capacidad amonio oxidante. Estos microorganismos fueron llamados arqueas amonio oxidantes (AOA por sus siglas en inglés) (Francis y col., 2005). Algunos autores han señalado que los genes *amoA* de las arqueas son dominantes en áreas oceánicas críticas para el ciclo del nitrógeno. De acuerdo con Leininger y col. (2006), las AOA contienen los genes que codifican las subunidades (*amoA*, *amoB* y *amoC*) de una potencial enzima amonio monooxigenasa. Sin embargo, podrían carecer de la enzima hidroxilamina oxido reductasa, enzima involucrada en el segundo paso de la amonio oxidación bacteriana donde la hidroxilamina es oxidada a nitrito (Hallam y col., 2006). De acuerdo con la literatura, en suelos y océanos, las AOA serían más abundantes que las AOB (Könneke y col., 2005; Francis y col., 2007). Sin embargo, faltan aún más estudios para entender su papel en los ciclos del nitrógeno y carbono en la naturaleza. Por otro lado, Park y col. (2006) señalaron la presencia de AOA en bioreactores nitrificantes de cinco diferentes plantas de tratamiento de aguas residuales. Lo anterior abre el camino a la evaluación del desempeño de las AOA (actividad, crecimiento y estabilidad) en la eliminación de nitrógeno para el tratamiento biológico de efluentes.

1.2.2 Aspectos bioquímicos y metabólicos de la nitrificación

1.2.2.1 La amonio oxidación

La amonio oxidación es iniciada por la enzima amonio monooxigenasa (AMO), la cual oxida el amonio a hidroxilamina (NH_2OH) mediante el consumo de oxígeno molecular y dos electrones. De acuerdo con Suzuki y col. (1974), quienes evaluaron el efecto del pH en los valores de la constante de Michaelis-Menten (K_m) del amonio para *Nitrosomonas*, el amoniaco sería el verdadero sustrato de las AOB en lugar del amonio. Lo anterior concuerda con el hecho de que la AMO se encuentra localizada en la membrana citoplasmática, la cual es altamente permeable al amoniaco pero no al amonio (Kleiner, 1985). Un átomo de O_2 es utilizado para formar NH_2OH mientras que el átomo restante se utiliza para producir agua. El intermediario NH_2OH es posteriormente oxidado a nitrito por la enzima hidroxilamina óxido reductasa (HAO) (Figura 4). Cabe señalar que algunos autores (Goreu y col., 1980; Poth y Focht, 1985; Remde y Conrad, 1990; Arp y Stein, 2003) han propuesto que algunas AOB (*Nitrosomonas sp.*, *N. europaea*, *N. eutropha* y *Nitrosovibrio*) pueden producir NO y N_2O . Parece ser que la producción de estos óxidos de nitrógeno puede realizarse a partir de la oxidación de la hidroxilamina así como en la reducción del nitrito a NO y N_2O .

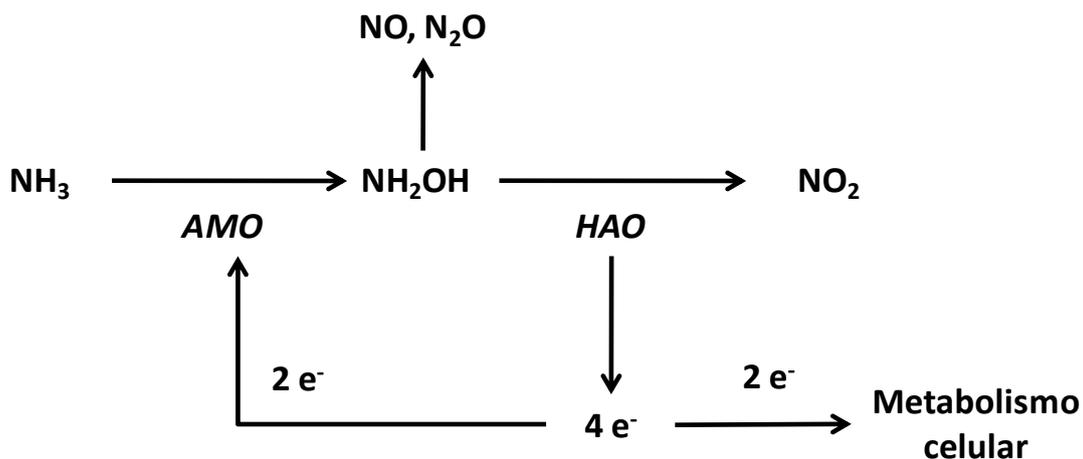


Figura 4. Vía amonio oxidante en las AOB. Las flechas en negritas indican el flujo de electrones (modificado de Arp y Stein, 2003).

De esta serie de reacciones (que aparecen en la Figura 4) se producen cuatro electrones, de los cuales, dos regresan a la AMO para su actividad y únicamente dos

electrones entran a la cadena respiratoria para la generación de energía (Kowalchuk y Stephen, 2001). Bock y Wagner (2006) propusieron un modelo de la cadena transportadora de electrones en las bacterias amonio oxidantes (Figura 5).

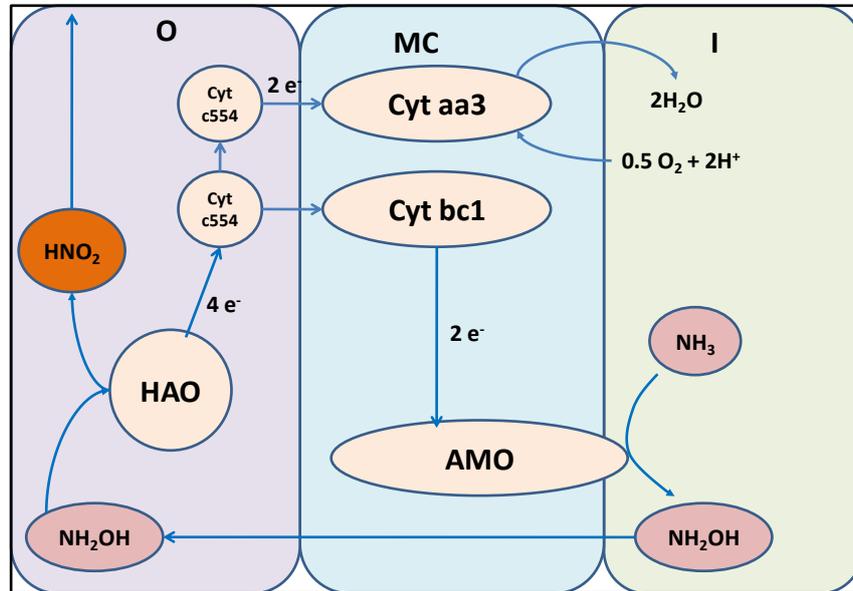
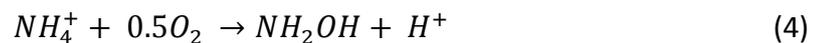
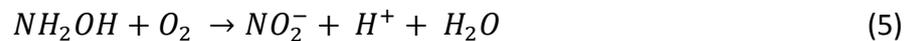


Figura 5. Modelo del transporte de electrones en las AOB. MC = membrana citoplasmática; I = dentro de la célula/espacio citoplasmático; O = fuera de la célula/periplasma (modificado de Bock y Wagner, 2006).

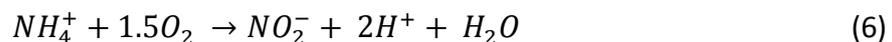
El amonio es oxidado de acuerdo con las siguientes ecuaciones parciales (4) y (5), resultando en la ecuación global (6) para la amonio oxidación.



$$\Delta G^{o'} = -8.2 \text{ kJ mol}^{-1}$$



$$\Delta G^{o'} = -266.5 \text{ kJ mol}^{-1}$$



$$\Delta G^{o'} = -274.7 \text{ kJ mol}^{-1}$$

Como se observa en la ecuación (5), de acuerdo al valor del cambio de energía libre ($\Delta G^{o'}$), la oxidación de hidroxilamina a nitrito es la etapa donde las AOB obtienen la

mayor parte de su energía. Sin embargo, la cantidad exacta de ATP formado por la oxidación de la hidroxilamina se desconoce aún, ya que el número total de electrones que alimentan a la cadena respiratoria por mol de hidroxilamina oxidada puede variar de acuerdo a la etapa del crecimiento y de las condiciones ambientales (Bock y Wagner, 2006).

Cabe señalar que la energía obtenida de la oxidación de amonio a nitrito es baja ($-274.7 \text{ kJ mol}^{-1}$), por lo cual se puede predecir un crecimiento limitado ya que la energía destinada a los procesos de biosíntesis celular es escasa. La ecuación (7) representa el anabolismo de la amonio oxidación, tomando en cuenta la fórmula empírica de la célula ($C_5H_7O_2N$).



De acuerdo con la ecuación (7), se puede estimar un rendimiento celular de 0.15 mg células mg^{-1} N- NH_4^+ consumido con una proporción de consumo de oxígeno de 3.16 $\text{mg O}_2 \text{ mg}^{-1}$ N- NH_4^+ oxidado (Bernet y Spérandio, 2009).

La enzima AMO aún no ha podido ser purificada con actividad (Arp y col., 2002; Arp y Stein, 2003) y la mayoría de los estudios sobre esta enzima se han llevado a cabo en cultivos de *Nitrosomonas europaea*. Parece ser que la AMO está localizada en la membrana citoplasmática (McCarty, 1999). La AMO está constituida por tres proteínas denominadas AmoA, AmoB y AmoC. La evidencia de la existencia de estos tres polipéptidos es bioquímica, genética y a través de la analogía con la metano monooxigenasa (MMO) (Arp y Stein, 2003). La proteína AmoA de 31.8 kDa contiene probablemente el sitio activo de la AMO (Hyman y Arp, 1992). El segundo polipéptido AmoB (38 kDa) fue copurificado simultáneamente con el AmoA por McTavish y col. (1993). Estos autores indicaron que los polipéptidos AmoA y AmoB son codificados por los genes *amoA* y *amoB*, los cuales se encuentran localizados en el mismo operón. La evidencia de la existencia del tercer polipéptido AmoC es indirecta ya que los genes que codifican al *AmoA*, *AmoB* y *AmoC* son cotranscritos en un único ARNm (Arp y col., 2002). Se ha sugerido que el cobre es un cofactor de la AMO con base en dos observaciones: la inhibición de la AMO por queladores selectivos del cobre y la adición

de cobre en extractos libres de células activaron la AMO (Hooper y Terry, 1973; Arp y col., 2002). Zahn y col. (1996) por su parte sugieren que el hierro es un componente catalítico de la enzima AMO de *Nitrosomonas*. La AMO parece ser catalítica, estructural y genéticamente similar a la MMO de las bacterias metanotróficas. Muchos de los avances en la comprensión de la función y estructura de la AMO se han realizado en analogía con la MMO purificada y caracterizada (Bedard y Knowles, 1989). La relación bioquímica entre la AMO y la MMO podría indicar que las bacterias metano oxidantes contribuyen en la nitrificación observada en suelos (Bodelier y Frenzel, 1999). Análogamente, las AOB al ser capaces de oxidar metano y metanol podrían contribuir a la oxidación atmosférica del metano, aunque aún no existe evidencia contundente al respecto (Bodelier y Frenzel, 1999; Jiang y Bakken, 1999).

En la segunda etapa de la amonio oxidación, la oxidación de NH_2OH a NO_2^- , está involucrada la enzima hidroxilamina óxido reductasa (HAO). Esta enzima se encuentra localizada en el espacio periplásmico (Hooper y DiSpirito, 1985), que es la región entre la capa externa de la membrana citoplasmática y la superficie interna de la capa de liposacáridos en las bacterias gram negativas. La HAO es un complejo enzimático con un peso relativo de 1.8–1.9 kDa. Contiene ocho subunidades y la octava subunidad llamada P-460 es posiblemente el sitio activo de la oxidación de la NH_2OH (Arp y col., 2002). Hooper y Balny (1982) señalaron que la HAO cataliza la deshidrogenación de la NH_2OH y una subsecuente adición neta de un átomo de oxígeno a partir de oxígeno molecular. En estudios posteriores fue postulado un mecanismo en donde el agua es la fuente del segundo átomo de oxígeno en la producción final de nitrito (Anderson y Hooper, 1983). De acuerdo con Anderson y Hooper (1983), en la oxidación de hidroxilamina a nitrito existe un intermediario nitroxil (HNO).

Las AOB parecen poseer ciertos mecanismos de regulación genética y fisiológica bajo condiciones de limitación en amonio, así como en ausencia de éste (ayuno). Estos mecanismos podrían ayudar a las AOB a sobrevivir en ambientes donde la concentración de sustrato es muy baja (Bock y Wagner, 2006). Por ejemplo, Jones y Morita (1985) evaluaron la capacidad de *Nitrosomonas* sp 4W30 (aislada de las costas de Alaska) para sobrevivir en un ayuno de amonio de 25 semanas. Los autores encontraron que después del tiempo de ayuno, las células de *Nitrosomonas*

mantuvieron su viabilidad, especialmente los cultivos que fueron aireados, y además el tamaño celular permaneció constante. Jonhstone y Jones (1988) evaluaron el cambio en las concentraciones de proteína, ADN y ARN en *Nitrosomonas cryotolerants*, después de mantener las células 10 semanas en ayuno de amonio (pero con fuente de carbono). Encontraron que las células de *Nitrosomonas cryotolerants* no disminuyeron de tamaño, sus niveles intracelulares de ATP se mantuvieron estables y no hubo cambios en sus niveles de proteína total, ADN y ARN. Estos mismos autores compararon sus resultados con estudios similares realizados con bacterias heterótrofas, encontrando que en general los heterótrofos presentaron una disminución en su contenido de ATP, ADN y ARN. Los autores argumentan que el bajo daño que sufre *Nitrosomonas cryotolerants* en sus componentes celulares puede estar relacionado con su largo tiempo de generación. Es reconocida la desventaja que tienen las AOB respecto a su bajo crecimiento en comparación con los heterótrofos, sin embargo parece ser que en ambientes donde es común que exista una baja concentración de sustrato como océanos y costas marinas, algunas AOB están bien adaptadas a largos periodos de ayuno, mediante la conservación de sus procesos celulares. Es interesante notar que bajo ciertas condiciones, las AOB pueden tener ventajas sobre las bacterias heterótrofas.

Pinck y col. (2001) evaluaron a *Nitrosomonas eutropha* durante su crecimiento, midiendo la cantidad de enzima AMO, a través de la cuantificación de su subunidad AmoB. Los autores señalaron que *N. eutropha* puede regular la síntesis y actividad enzimática, ya que en un medio con una alta concentración de amonio (180 mg L^{-1}), la actividad de la AMO fue máxima (evaluando la velocidad específica de consumo de amonio) pero presentó la menor concentración de enzima. Mientras que a una concentración baja de amonio (18 mg L^{-1}), la concentración de enzima fue alta, pero baja su actividad. Estos autores encontraron además que células que fueron mantenidas sin amonio por un año, aún contenían mayores concentraciones de AMO, que células activas en crecimiento. Estos resultados llaman la atención, pues podría esperarse que bajo condiciones limitantes de amonio, la concentración de AMO en la célula fuera baja. Pinck y col. (2001) argumentan que la resistencia de la AMO a la degradación en condiciones de ayuno, le darían la capacidad a las AOB de consumir

amonio en cuanto esté disponible. Los resultados de Pinck y col. (2001) sugerirían que la cantidad de enzima AMO que tiene una célula no está directamente relacionada con la velocidad del consumo de amonio.

1.2.2.2 La nitrito oxidación

La oxidación de nitrito a nitrato es catalizada por acción de un complejo enzimático llamado nitrito óxido reductasa (NOR) que se encuentra en la membrana, en la superficie del citoplasma (Bock y col., 1991) (Figura 6). Aleem y col. (1965) realizaron estudios con oxígeno marcado (^{18}O) en células enteras o extractos libres de células de *Nitrobacter*, que proporcionaron evidencias de que la oxidación del nitrito a nitrato se realiza empleando un átomo de oxígeno proveniente del agua y no del oxígeno molecular.

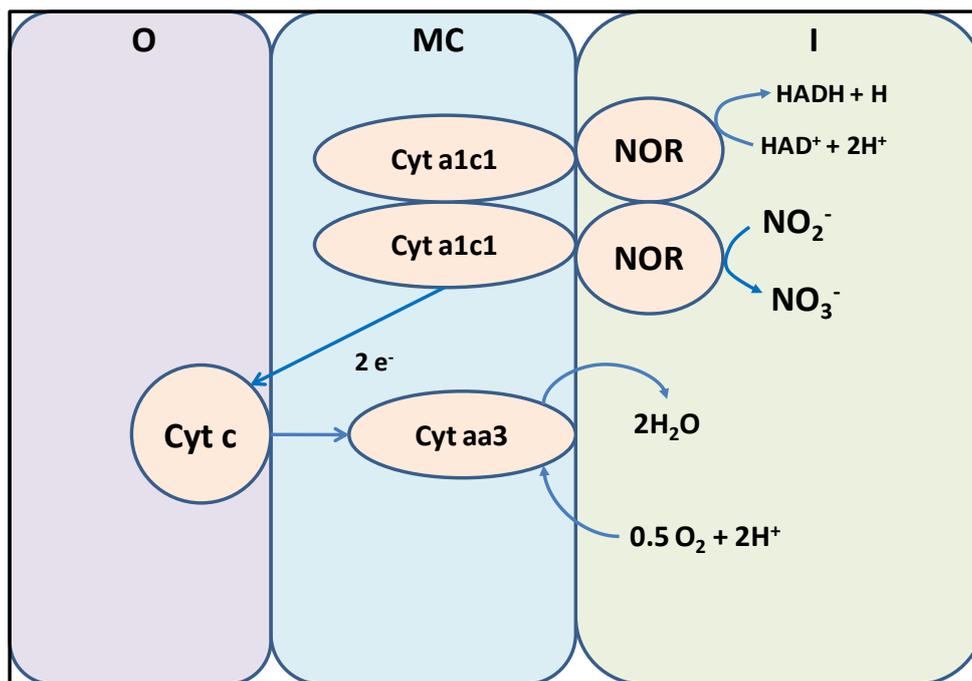


Figura 6. Modelo del flujo de electrones en *Nitrobacter*. CM = membrana citoplasmática, I = dentro de la célula/espacio citoplasmático, O = fuera de la célula/periplasma, NOR = nitrito óxido reductasa (modificado de Bock y Wagner, 2006).

La NOR está formada por los citocromos *a* y *c*, una quinona y una deshidrogenasa dependiente del NADH (Aleem y Sewell, 1981). En la oxidación de nitrito a nitrato, dos electrones son liberados para la generación de energía y son transferidos a los citocromos *a* y *c* y posteriormente a la citocromo oxidasa del tipo *aa3* (Figura 6). La

citocromo *c* oxidasa del tipo *aa3* ha sido purificada a partir de algunas especies de *Nitrobacter* y su función fue determinada como una oxidasa terminal (Sewell y col., 1972, Yamanaka y col., 1981). Posteriormente, los electrones entran a una cadena respiratoria aún no del todo clara (Bock y Wagner, 2006). Respecto a la producción de ATP que conlleva el flujo de electrones, parece que las teorías no están todavía unificadas. Cogley (1976) señaló que la producción de ATP está relacionada con la liberación de protones dentro del citoplasma, mientras que Wetzstein y Ferguson (1985) detectaron una expulsión de protones dentro del periplasma acoplada con la oxidación de nitrito.

La reacción de nitrito oxidación se muestra en la ecuación (8).



$$\Delta G^{o'} = -74.1 \text{ kJ mol}^{-1}$$

La ecuación (9) representa la oxidación asimilativa del nitrito por las NOB (Bernet y Spérandio, 2009).



De acuerdo con esta ecuación el rendimiento celular de las NOB sería de 0.02 mg célula mg^{-1} N- NO_2^- oxidado y el requerimiento de oxígeno estaría alrededor de 1.1 mg O_2 mg^{-1} N- NO_2^- oxidado. Algunas especies nitrito oxidantes oxidan de 85-115 mol de nitrito para generar la energía requerida para fijar 1 mol de CO_2 (Bock y Wagner, 2006). Como consecuencia de que el cambio de energía libre es menor en la nitrito oxidación que en la amonio oxidación, es de esperarse que el crecimiento bacteriano de las NOB sea más bajo que el crecimiento de las AOB. Por ejemplo, el tiempo de duplicación para las AOB puede variar entre 7-24 h mientras que para las NOB está alrededor de 10-140 h (Bock y col., 1991). Además, comparando los datos de rendimiento celular entre las NOB y AOB, es claro que las AOB tienen un rendimiento de formación de biomasa siete veces mayor que las NOB.

El molibdeno de acuerdo con algunos autores (Ingledew y Halliug, 1976; Kruger y col., 1987; Meincke y col., 1992) es esencial para la nitrito oxidación. Meincke y col. (1992) sugieren que el nitrito es oxidado en el centro de la NOR que contiene molibdeno. De

acuerdo con los análisis realizados a la NOR por Meincke y col., (1992) y Ingledew y Halliug (1976) se ha encontrado molibdeno en forma de molibdo proteínas en la membrana de *Nitrobacter winogradsky* y *Nitrobacter hamburgensis*

La nitrato oxidación es un proceso reversible. La NOR puede catalizar la oxidación de nitrato a nitrito y la reducción de nitrito a nitrato. La NOR es una enzima inducible. Por otro lado, la enzima nitrito reductasa (NIR) ha sido copurificada junto con la NOR en *Nitrobacter vulgaris* (Ahlers y col., 1990). La NIR reduce el nitrito a óxido nítrico al parecer bajo condiciones limitadas de oxígeno.

Asimismo es aceptado que las bacterias nitrificantes son capaces de producir y reaccionar con óxidos de nitrógeno gaseosos como el óxido nitroso (N_2O), óxido nítrico (NO) y dióxido de nitrógeno (NO_2). Por ejemplo, parece que *Nitrosomonas eutropha* requiere de la presencia de NO para su crecimiento (Zart y col., 2000). Esta misma cepa, así como algunas especies de *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*, pueden producir N_2O , NO y NO_2 y presentaron una capacidad desnitrificante (Poth y Focht, 1985; Freitag y col., 1987; Zart y Bock, 1998). Otros autores han observado que el NO es siempre producido durante la amonio oxidación (Stüven y Bock, 2001). Debido a lo anterior, algunos investigadores han considerado si las AOB y NOB pueden contribuir a elevar los niveles de NO y N_2O en la atmósfera, sin embargo considerando las cantidades de estos gases producidas por las actividades humanas, la contribución de las bacterias nitrificantes es mínima (Bock y Wagner, 2006). Por otro lado, hay que considerar que de acuerdo con algunos estudios, la producción de óxidos de nitrógeno en ciertas cepas amonio oxidantes así como *Nitrobacter* se lleva a cabo principalmente bajo condiciones de limitación de oxígeno (Goreau y col., 1980; Poth y Focht, 1985). Otros trabajos mencionan que además de la baja concentración de oxígeno, otras condiciones como un pH bajo o bien una baja concentración de carbono orgánico, pueden favorecer la producción de óxido nitroso (Wrage y col., 2001).

1.2.3 Aspectos cinéticos de la nitrificación

Al evaluar la cinética de la nitrificación, se intenta entender cuáles son los factores que pueden afectar la velocidad de las reacciones nitrificantes, así como la velocidad de

crecimiento. En la Tabla 1, se muestran algunos ejemplos de valores cinéticos para las AOB y NOB. Estos valores pueden variar significativamente, dependiendo de las condiciones ambientales como concentraciones de sustratos, temperatura, pH, etc.

La ecuación de Monod modificada (sin crecimiento) es útil para caracterizar cinéticamente el proceso nitrificante ya que toma en cuenta la concentración de sustrato (ecuación 10).

$$q_s = q_{\max} \frac{S}{K_s + S} \quad (10)$$

Donde: q_s = velocidad específica de consumo de sustrato (h^{-1}), q_{\max} = velocidad específica máxima de consumo de sustrato (h^{-1}), S = concentración de sustrato ($mg L^{-1}$) y K_s = constante media de saturación que tiene un valor particular para cada tipo de sustrato ($mg L^{-1}$).

Tabla 1. Ejemplos de parámetros cinéticos para las AOB y NOB (modificado de Beristain y col., 2009).

Parámetro cinético	Símbolo	AOB	NOB
Velocidad específica máxima de crecimiento	μ_{\max} (d^{-1})	0.3-2.2	0.2-2.5
Rendimiento de formación de biomasa	Y (g SSV g N^{-1})	0.04-0.13	0.02-0.08
Constante media de saturación para amonio	K_{NH_3} (mg $NH_3 L^{-1}$)	0.06-27.5	--
Constante media de saturación para nitrito	K_{NO_2} (mg $NO_2^- L^{-1}$)	--	0.1-15
Constante media de saturación para el oxígeno	K_{O_2} (mg $O_2^- L^{-1}$)	0.03-1.3	0.3-2.5
Coefficiente de inhibición para el amonio	K_i (mg $NH_4^+ L^{-1}$)	3300	--
Coefficiente de inhibición para el nitrito	K_i (mg $NO_2^- L^{-1}$)	--	325-1400

Se puede también elaborar una expresión matemática que represente el consumo de sustrato (S), y la formación de biomasa (X) y producto (P) en función del tiempo (ecuación 11).

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{dX}{dt} + \frac{dP}{dt} \quad (11)$$

También en algunos procesos biológicos, la velocidad volumétrica de consumo (dS/dt) es una reacción de primer orden y se puede representar como:

$$\text{Velocidad volumétrica (r)} = -\frac{dS}{dt} = q_S S \quad (12)$$

Cuervo-López y col. (2009) desarrollaron a partir de las ecuaciones (11) y (12) una expresión matemática que puede ser utilizada para predecir la velocidad específica de consumo de sustrato (nitrógeno o carbono) para el proceso nitrificante en términos de S, X y P (ecuación 13).

$$q_S = \frac{\mu}{Y_{x/Scx}} + \frac{q_P}{Y_{p/Scp}} \quad (13)$$

Donde μ = velocidad específica de crecimiento (h^{-1}), $Y_{x/Scx}$ = rendimiento de formación de biomasa respecto al sustrato consumido, $Y_{p/Scp}$ = rendimiento de formación de producto respecto al sustrato consumido, q_p = velocidad específica de formación de producto. El término $\frac{\mu}{Y_{x/Scx}}$ representa el anabolismo (biosíntesis) mientras que $\frac{q_P}{Y_{p/Scp}}$ representa el catabolismo (proceso respiratorio). En la literatura, se puede encontrar modelos que tratan de describir los procesos microbianos en el tratamiento de aguas residuales considerando la velocidad de crecimiento microbiano e incluso tratando de optimizarla, no obstante este enfoque puede ser un error ya que los procesos microbianos deberían ser desasimilativos procurando que la velocidad de formación de biomasa sea insignificante (Cuervo-López y col., 2009). Una producción excesiva de lodos en las plantas de tratamiento de aguas residuales puede atraer problemas de índole económico y ambientales (Wei y col., 2003).

1.2.4 Condiciones ambientales que afectan la nitrificación

Los microorganismos son susceptibles, como todos los demás seres vivos, al ambiente que les rodea. La nitrificación, como todo proceso biológico, puede verse afectada por

la temperatura, el valor de pH, la concentración de oxígeno y la disponibilidad en sustrato. Considerando lo anterior, es predecible que las enzimas que participan en el proceso respiratorio nitrificante puedan realizar su actividad más lentamente o verse inhibidas bajo ciertas condiciones ambientales. No obstante, los procesos amonio y nitrito oxidantes no son afectados de la misma manera, ya que se considera generalmente que las NOB son más sensibles a las variaciones del ambiente (Bernet y Spérandio, 2009). La consecuencia de las perturbaciones en la nitrito-oxidación se ve reflejada en la acumulación de nitrito. La presencia de nitrito en el ambiente es indeseable por generar problemas de contaminación y en la salud del ser humano (eutroficación, metahemoglobinemia, etc). Sin embargo, en algunos procesos como la nitrificación parcial, se busca obtener una acumulación de nitrito a fin de obtener sistemas de eliminación biológica del amonio más cortos y a menor costo.

1.2.4.1 Temperatura

Tanto las AOB como las NOB pueden sobrevivir en un intervalo de temperatura de 4-45°C, sin embargo, al ser microorganismos mesófilos, su mejor crecimiento se puede encontrar entre 28 y 36°C (Bernet y Spérandio, 2009). La temperatura tiene un efecto en la velocidad de crecimiento de los microorganismos nitrificantes, pero en diferentes proporciones para las AOB y NOB. A temperaturas superiores a 15°C, las AOB presentan una velocidad de crecimiento mayor que las NOB (Bernet y Spérandio, 2009). Las bacterias nitrificantes son sensibles también a los cambios repentinos de temperatura. Henze y col. (2002) comparó datos experimentales de velocidades de crecimiento para bacterias nitrificantes con un modelo teórico, señalando que cuando la temperatura se eleva rápidamente (en horas), el incremento en la velocidad de crecimiento es menor a lo esperado, mientras que una repentina caída en la temperatura ocasiona una mayor disminución en el crecimiento nitrificante de lo esperado.

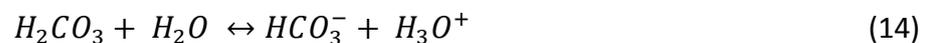
La temperatura tiene también un efecto en las velocidades de amonio y nitrito oxidación. Shammas (1986) realizó una comparación de varios trabajos (con lodos nitrificantes y cultivos axénicos amonio y nitrito oxidantes) que evaluaron el efecto de la temperatura en la velocidad de oxidación de amonio a nitrato. De acuerdo con

Shammas (1986), la velocidad de nitrificación es una función de la temperatura dentro del intervalo de 5 a 35°C, teniendo la máxima velocidad nitrificante alrededor de los 30°C. Groeneweg y col. (1994) mostraron que la temperatura tiene una influencia pronunciada en la velocidad específica de consumo de amonio en cultivos de *N. europaea*. A un pH de 8 y una concentración de N-NH₃ de 368 µg L⁻¹ constantes, las velocidades específicas de oxidación de amonio fueron de 165 y 260 mg N-NH₃ g⁻¹ biomasa h⁻¹ a 15 y 30°C, respectivamente. Aunque tanto la velocidad de amonio como de nitrito oxidación son afectadas por la temperatura, Randall y Buth (1984) sugieren que las NOB son más sensibles. Randall y Buth (1984) encontraron acumulación de nitrito en un reactor nitrificante operado entre 12-14°C, lo cual sugirió un mayor efecto inhibitorio en la velocidad nitrito oxidante que en la amonio oxidante. De acuerdo, a lo anterior es claro que para evaluar la cinética de la nitrificación, la temperatura debería permanecer constante, ya que la velocidad de oxidación de amonio y nitrito es dependiente de la temperatura. Por otro lado, en el tratamiento biológico de eliminación de amonio, la temperatura tiene efectos particulares. Por ejemplo, Bishop y col. (1976) mostraron la dependencia de un proceso nitrificante-desnitrificante a la temperatura en una planta de tratamiento. Los autores encontraron que en invierno (14°C) la eficiencia de eliminación de nitrógeno fue del 74% mientras que en verano (23°C) fue de 84%. Debido a la disminución de la actividad nitrificante en plantas de tratamiento a bajas temperaturas, puede ser de ayuda aumentar la densidad celular o el tiempo de residencia hidráulico, con el fin de mantener una nitrificación aceptable.

1.2.4.2 Efecto del pH

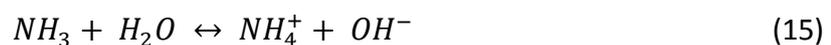
Se considera que el crecimiento y la actividad de las AOB y NOB alcanzan su mejor desempeño a valores de pH neutro a ligeramente alcalino (7.5-8.0) (Prosser, 1989; Gieseke y col., 2006), aunque también se ha encontrado actividad nitrificante en suelos ácidos (pH = 5) (De Boer y Kowalchuck, 2001). Las cultivos axénicos de AOB presentan un mejor crecimiento en un intervalo de pH de 5.8-8.5 mientras que las NOB lo presentan entre 6.5-8.5 (Holt y col., 1994). Por otro lado, los consorcios nitrificantes

utilizados en el tratamiento de aguas residuales pueden ser afectados por un pH bajo. Se ha reportado que a un pH de 6, la velocidad de amonio y nitrito oxidación disminuye, mientras que a un pH de 5 o menor, la actividad nitrificante se detiene (Gerardi, 2002; Lin y col., 2009). El efecto de un pH bajo sobre la nitrificación puede atribuirse a la acumulación de ácido nitroso (HNO_2). El ácido nitroso es conocido por inhibir la nitrificación y se cree que podría tener un efecto en la actividad enzimática de las bacterias nitrificantes (Anthonisen y col., 1976; Peng y Zhu, 2006). Glass y col. (1997) también propusieron que el HNO_2 podría actuar como un desacoplante, liberando protones intracelularmente que interferirían con el gradiente de pH transmembranal requerido para la síntesis de ATP. Según los estudios de Vadivelu y col. (2006a, 2006b), el HNO_2 es, en lugar del nitrito, el verdadero inhibidor en el catabolismo y anabolismo de *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*. Otro efecto de un pH bajo en la nitrificación está relacionado con la disponibilidad de carbono inorgánico disuelto (principalmente el bicarbonato) para el crecimiento de las bacterias nitrificantes. A valores de pH ácidos, el equilibrio entre las especies $\text{H}_2\text{CO}_3/\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ se desplazaría a H_2CO_3 (CO_2) disminuyendo la disponibilidad de bicarbonato (ecuación 14).



Debido a lo anterior es importante mantener amortiguado el pH en los sistemas nitrificantes y contrarrestar la tendencia natural de la nitrificación para liberar H^+ y acidificar el medio.

También la nitrificación puede sufrir un efecto a pH alcalinos ya que puede cambiar la disponibilidad de NH_3 en el cultivo (Stein y col., 1997). En la ecuación (15), se muestra el equilibrio entre amonio y amoniaco.



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

1.2.4.3 Efecto del oxígeno en la nitrificación

Las bacterias aerobias estrictas requieren de oxígeno para su respiración e incluso para su crecimiento. Los tipos bacterianos que dependen del oxígeno disuelto, enfrentan el problema de que el oxígeno es poco soluble en agua. Por lo tanto, la mayoría de las bacterias son capaces de utilizar otras moléculas diferentes al oxígeno para su respiración (Gerardi, 2002). Las bacterias nitrificantes al ser aerobias estrictas utilizan al oxígeno disuelto (OD) como aceptor final de electrones para su respiración. Las bacterias nitrificantes son muy sensibles a la baja concentración de oxígeno. En cultivos axénicos de amonio y nitrito oxidantes, la concentración crítica en donde la nitrificación no se lleva a cabo está por debajo de $0.3 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ (Stenstrom y Poduska, 1980). Otros autores han reportado que bajo condiciones limitantes de oxígeno, cultivos de *Nitrosomonas sp* presentaron una marcada disminución en la velocidad de producción de nitrito y se observó una acumulación significativa de N_2O (Goreau y col., 1980). Existen reportes donde se sugiere que la nitrito oxidación puede verse más afectada que la amonio oxidación por la baja disponibilidad de oxígeno. Por ejemplo, se ha señalado que en un cultivo mixto de *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*, la amonio oxidación disminuye su velocidad por debajo de $1.0 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$, mientras que la nitrito oxidación reduce su velocidad por debajo de $4.0 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ (Prosser, 1989). Esta diferencia en susceptibilidad de las AOB y NOB hacia la baja concentración de oxígeno se debe principalmente a afinidades distintas por el mismo (Jayamohan y col., 1988). Por ejemplo, Laanbroek y Gerards (1993) determinaron algunos parámetros cinéticos como la constante de afinidad para el oxígeno (K_{O_2}) en cultivos de *Nitrobacter winogradskyi* y *Nitrosomonas europaea* a diferentes concentraciones iniciales de oxígeno. Los autores encontraron que los valores de K_{O_2} para *N. winogradskyi* ($22\text{-}166 \mu\text{M O}_2$) fueron siempre mayores que para *N. europaea* ($1\text{-}15 \mu\text{M O}_2$). En lodos activados nitrificantes involucrados en el tratamiento de aguas para la eliminación de nitrógeno, se ha observado que para una correcta nitrificación, la concentración mínima de oxígeno disuelto rondaría los 2 mg L^{-1} (Gerardi, 2002). En reactores nitrificantes o de lodos activados, puede darse el fenómeno de estratificación de la concentración de oxígeno. Este fenómeno se refiere a que el OD se encuentra en

diferentes concentraciones en diversas capas del flóculo nitrificante. La limitación en OD por estratificación se puede dar en ciertas áreas de los reactores donde se presenten zonas de baja agitación (flujo no turbulento), además de oclusión de aireadores por una falta de limpieza. La limitación de oxígeno representaría una disminución en la velocidad del proceso nitrificante, lo cual puede ser corregido con la utilización de mamparas en el reactor y rutinas de limpieza (Gerardi, 2002). El suministro de oxígeno en la nitrificación tiene una importancia económica, ya que la aireación de los lodos activados representa uno de los gastos más importantes en la operación de sistemas de tratamiento de aguas residuales (Pricnic y col., 1998).

Otro fenómeno relacionado con la disponibilidad de oxígeno en lodos nitrificantes, es la posible competencia entre nitrificantes y heterótrofos por el oxígeno. Hanaki y col. (1990) determinaron el efecto de la actividad de heterótrofos sobre la nitrificación en lodos activados. Los autores suponen que el consumo de oxígeno por las bacterias heterótrofas limitaría la actividad de las bacterias nitrificantes. De acuerdo con Hanaki y col. (1990), cada célula amonio o nitrito oxidante presente en un flóculo está rodeada por una gran mayoría de heterótrofos, a través de los cuales el oxígeno debe pasar para llegar a las bacterias nitrificantes.

1.2.4.4 Inhibición de la nitrificación por sustratos

En un ambiente acuático a valores de pH cercanos a la neutralidad, los sustratos para el proceso nitrificante se encontrarán mayoritariamente como NH_4^+ y NO_2^- . No obstante, si el pH se desplaza hacia la alcalinidad (> 8.5), el ion amonio tenderá a convertirse en amoniaco (tomando en cuenta $\text{pK}_a = 9.24$ a 25°C para el equilibrio $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$). En la literatura, algunos autores consideran que la nitrificación puede ser inhibida por bajas concentraciones de NH_3 (Anthonisen y col., 1976; Gerardi, 2002; Phillips y col., 2002; Peng y Zhu, 2006; Vadivelu y col., 2006a, 2006b). Anthonisen y col. (1976) describieron las condiciones bajo las cuales los procesos amonio y nitrito oxidantes podrían ser inhibidos por NH_3 , delimitando regiones límite de acuerdo al pH del medio. Estos autores mencionan que la nitrito oxidación puede ser más sensible al

efecto del NH_3 que la amonio oxidación. Sinha y Annachhatre (2007) realizaron una comparación en concentraciones inhibitorias de NH_3 encontradas en la literatura para la nitrito oxidación en aguas residuales. Estos autores muestran que en un intervalo de concentraciones de $0.02 - 20 \text{ mg N-NH}_3 \text{ L}^{-1}$, el proceso nitrito oxidante presentó diferentes grados de inhibición, evidenciados por la acumulación de nitrito. La inhibición de la nitrito oxidación por NH_3 podría ser el resultado de la combinación de algunos factores como la concentración inicial de amonio, pH y temperatura (Balmelle y col., 1992). Algunos estudios señalaron que el NH_3 podría ser un inhibidor competitivo de la enzima nitrito óxido reductasa (Yang y Alleman, 1992). Por otro lado, respecto al efecto del NH_3 en la actividad amonio oxidante, Van Hulle y col. (2007) confirmaron que el NH_3 es el sustrato real para las AOB. Sin embargo, contrastando con lo descrito por Anthonisen y col. (1976), Van Hulle y col. (2007) señalan que la inhibición de la amonio oxidación por NH_3 sólo fue evidente en altas concentraciones (a partir de $300 \text{ mg N-NH}_3 \text{ L}^{-1}$). No obstante, Vadivelu y col. (2006b) señalaron que los procesos catabólico y anabólico de un cultivo enriquecido de *Nitrosomonas* fueron inhibidos a concentraciones superiores a $16 \text{ mg N-NH}_3 \text{ L}^{-1}$. La gran diferencia en información encontrada en la literatura podría deberse que las condiciones de cultivo e inóculos utilizados difieren de un estudio a otro.

Respecto al efecto del nitrito en la nitrificación, existe más información sobre el efecto de éste en la amonio oxidación que en la nitrito oxidación. Stein y Arp (1998) trabajaron con células de *Nitrosomonas europaea* exponiéndolas a diferentes concentraciones de nitrito. Estos autores sugieren que el nitrito disminuye la amonio oxidación mediante un efecto directo sobre la enzima AMO aunque el mecanismo aún no está del todo claro. Algunos trabajos han estudiado el proceso amonio oxidante en presencia de altas concentraciones de nitrito. Tan y col. (2008) evaluaron el efecto del nitrito en un cultivo enriquecido de AOB en un SBR. A una concentración de nitrito de 13.8 g L^{-1} y un valor de pH de 7.4, los autores observaron una inhibición del 50% en la velocidad de oxidación de amonio. Cuando se adicionó nitrito a 12.65 g L^{-1} pero a un valor de pH de 7.0, observaron que la amonio oxidación fue totalmente inhibida. Es interesante observar que la tolerancia de las AOB a altas concentraciones de nitrito no

sólo depende de la concentración de éste, sino también depende del valor de pH del medio. En la literatura, así como en el caso del NH_3 , se señala que el efecto inhibitorio del NO_2^- en los procesos amonio y nitrito oxidantes, está muy relacionado con el pH del medio. A un valor de pH debajo de 6, se comenzaría a incrementar la concentración de ácido nitroso (HNO_2), el cual sería el verdadero inhibidor y no el NO_2^- (Anthonisen y col., 1976; Vadivelu y col. 2006a, 2006b; Sinha y Annachhatre, 2007; Park y Bae, 2009). Esta teoría debería de considerar que el ácido nitroso es un ácido débil con una constante de ionización (pKa) de 3.34 a 25°C (Whitten y col., 2008). Por lo tanto, a los valores de pH (7.0-8.5) donde generalmente se lleva a cabo la nitrificación, el HNO_2 se encontraría en muy bajas concentraciones. Por otra parte, Vadivelu y col. (2006b) encontraron que el ácido nitroso inhibe tanto el crecimiento como la producción de energía en un cultivo enriquecido de *Nitrosomonas*. Los autores observaron que la velocidad de consumo de oxígeno disminuyó un 50% cuando el cultivo estuvo expuesto a 0.39 mg N- HNO_2 L⁻¹ a un pH de 6.9. Mientras que Vadivelu y col. (2006a) estudiaron el efecto del HNO_2 en el metabolismo de *Nitrobacter* diferenciando entre el anabolismo y catabolismo. Los autores encontraron que 0.05 mg N- HNO_2 L⁻¹ no tuvieron efecto en el proceso de generación de energía de *Nitrobacter*, mientras que la síntesis de biomasa se detuvo completamente a 0.023 mg N- HNO_2 L⁻¹ a pH de 6.5. Los autores realizaron un modelo para describir la inhibición de *Nitrobacter* por HNO_2 , sin embargo no pudieron encontrar el mecanismo de inhibición del ácido nitroso. Glass y col. (1997) proponen que el HNO_2 podría actuar como un desacoplante al donar protones dentro de la célula, interfiriendo directamente con el mecanismo de síntesis de ATP. Mientras que Anthonisen y col. (1976) sugieren que el HNO_2 tiene la capacidad de difundir por la membrana y disminuir el pH intracelular, ocasionando una interferencia en la síntesis de ATP. No obstante estas hipótesis no están respaldadas por resultados experimentales en esos estudios. Por otro lado, Silva y col. (2011) observaron en cultivos nitrificantes en lote que la nitrito oxidación puede ser más sensible al efecto del nitrito que la amonio oxidación. Los autores señalan que a las concentraciones de 100 y 200 mg N- NO_2^- L⁻¹, la velocidad específica de producción de nitrato disminuyó más que la velocidad específica de consumo de amonio.

1.2.4.5 Inhibidores de la nitrificación

En la literatura, se menciona que la nitrificación también puede verse inhibida por diversos compuestos orgánicos, inorgánicos y metales (Painter, 1970; Bedard y Knowles, 1989; Henze y col., 2002; Lin y col., 2009). Algunos autores señalan que debido a la baja velocidad de crecimiento de los microorganismos nitrificantes, su inhibición aunque sea parcial, puede causar que en sistemas de lodos activados se detenga el proceso nitrificante (Bernet y Spérandio, 2009). No obstante también se debe considerar la velocidad nitrificante, ya que puede darse el caso que el proceso respiratorio se lleve a cabo a una velocidad aceptable a la par de un bajo crecimiento. Las AOB presentan valores de velocidad específica de crecimiento (μ_{\max}) de 0.3-2.2 d⁻¹ mientras que las NOB presentan valores de μ_{\max} de 0.2-2.5 d⁻¹. Como referencia, las bacterias heterótrofas tienen una μ_{\max} de 0.2-7.2 d⁻¹ (Beristain-Cardoso y col., 2009). Gerardi (2002) mencionan que, debido a la relativa baja obtención de energía en los procesos de amonio y nitrito oxidantes, se podría pensar que las bacterias nitrificantes no tendrían suficiente energía para reparar sistemas enzimáticos en comparación con los heterótrofos. Por lo cual, se señala que los nitrificantes son más sensibles a compuestos inhibitorios presentes en aguas residuales que los heterótrofos.

En la Tabla 2, se muestran las concentraciones límites de algunos compuestos inorgánicos que inhiben la nitrificación en aguas residuales.

Se ha observado que los metales pesados pueden inhibir ambas etapas de la nitrificación, aunque los efectos son diferentes para la amonio y nitrito oxidación (Grunditz y col., 1998). Otros compuestos como la alitiourea (ATU), cianuro de potasio (KCN), tiourea, dietiltiocarbamato (DTC) y nitrapirina han sido catalogados como inhibidores específicos de la amonio oxidación, afectando únicamente la conversión de NH₃ a NH₂OH (Hooper y Terry, 1973; Bedard y Knowles, 1989). De hecho, compuestos como la ATU son quelantes y pueden formar una unión con el Cu²⁺, el cual parece que forma parte del centro activo de la enzima AMO y es esencial para su actividad. Estas inhibiciones pueden ser reversibles como lo observaron Hooper y Terry (1973) al encontrar en *N. europaea* que la inhibición de la oxidación del amonio causada por

KCN y DTC, pudo ser reversible al menos parcialmente, cuando las células fueron tratadas con una solución con Cu^{2+} . Sin embargo, estos autores observaron también que la adición de Cu^{2+} no restableció la amonio oxidación cuando *N. europaea* fue expuesta a ATU.

Tabla 2. Límites de concentración de compuestos inhibitorios inorgánicos para la nitrificación encontrados en aguas residuales (Grunditz y col., 1998; Gerardi, 2002).

Compuesto	Concentración (mg L^{-1})
Cromo (hexavalente)	0.25
Cromo (trivalente)	0.05
Cobre	0.35
Cianuro	0.50
Mercurio	0.25
Niquel	0.25
Plata	0.25
Sulfato	500
Plomo	1.68
Cadmio	0.02
Zinc	0.30

Por su parte, Ginestet y col. (1998) observaron una disminución del 80% en la velocidad de consumo de oxígeno de las AOB expuestas a $1 \mu\text{M}$ de ATU.

Compuestos como el clorato (ClO_3^-) (sales del ácido clórico) y la azida (N_3^-) (base conjugada del ácido hidrazoico) son considerados inhibidores selectivos de la nitrito oxidación (Painter, 1970; Belser y Mays, 1980; Ginestet y col., 1998). Por ejemplo, Belser y Mays (1980) observaron que una concentración de 10 mM de clorato de potasio inhibía completamente la nitrito oxidación sin que se afectara la amonio oxidación. No obstante, Hynes y Knowles (1983) han presentado resultados experimentales que ponen en duda la especificidad del clorato, ya que observaron que en un cultivo mixto tanto la amonio como la nitrito oxidación fueron inhibidas. La azida es un agente selectivo bacteriostático en bacterias gram negativas y ha sido mostrado que puede inhibir la nitrito oxidación en lodos activados. Ginestet y col. (1998)

señalaron una completa inhibición en la nitrito oxidación a una concentración de 24 μM de azida. Los autores sugieren que la azida forma un complejo con el molibdeno de la enzima nitrito óxido reductasa.

En la siguiente sección, se describe el efecto inhibitorio de compuestos orgánicos en la nitrificación.

1.3 Efecto de los compuestos orgánicos sobre la nitrificación

Está documentado el efecto negativo de la materia orgánica en la nitrificación, y se sabe que la estabilidad de los sistemas nitrificantes en el tratamiento de aguas residuales puede ser alterada por la presencia de compuestos orgánicos tóxicos e inhibitorios (Schweighofer y col., 1996). Así pues, en el tratamiento de aguas residuales por nitrificación, el control de la materia orgánica es de suma importancia.

Diversos autores han estudiado este fenómeno tanto en cultivos axénicos (*Nitrosomonas* y *Nitrobacter* principalmente) como en consorcios nitrificantes (Tabla 3). Es importante mencionar que al revisar la información, se aprecia que dependiendo de la estructura química del compuesto orgánico, su concentración y el tipo de cultivo, se pueden observar diferentes magnitudes de inhibición en el proceso nitrificante.

Por otro lado, cultivos nitrificantes han demostrado ser capaces de oxidar una amplia variedad de compuestos orgánicos que van desde compuestos simples como los ácidos grasos volátiles, hasta compuestos aromáticos, fenólicos y halogenados (Tabla 3). Esta capacidad tiene gran relevancia para los sistemas de tratamiento biológico de eliminación del nitrógeno amoniacal, donde hay presencia de compuestos orgánicos, ya que abre la posibilidad de la eliminación simultánea de contaminantes.

Tabla 3. Capacidad de cultivos nitrificantes para eliminar algunos compuestos orgánicos y su efecto en la nitrificación.

Compuesto	Concentración (mg L ⁻¹)	Cultivo	Efecto en la nitrificación	Consumo del compuesto orgánico	Referencia
2,4,6-Triclorofenol	7.8 ^{IV}	Lodos activados nitrificantes ^a	Sin inhibición en la conversión de NH ₄ ⁺ a NO ₃ ⁻	100%	Nevalainen y col. (1993)
Trimetilamina	3481	Lodos activados nitrificantes ^b	100% en la velocidad de producción de nitrito	N.D. ^{III}	Eilersen y col. (1994)
Tolueno	14	<i>Nitrosomonas europaea</i> ^b	80% en la producción de nitrito	84%	Keener y Arp, (1994)
Butirato	500	Consortio nitrificante ^b	70% en la q _{NO₃} ^I	N.D. ^{III}	Gómez y col. (2000)
Benceno	10	Consortio nitrificante ^b	53% en la producción de nitrato	100%	Zepeda y col. (2003)
Formaldehído	1500	Lodos activados nitrificantes ^b	100% en el rendimiento de producción de NO ₂ ⁻ y NO ₃ ⁻	100%	Eiroa y col. (2004)
Tolueno	5	Consortio nitrificante ^b	77% en la q _{NH₄} ^{II}	50%	Zepeda y col. (2007)
<i>m</i> -Xileno	5	Consortio nitrificante ^b	76 % en la q _{NH₄} ^{II}	50%	Zepeda y col. (2007)
Triclosan	2	<i>Nitrosomonas europaea</i> ^b	70% en la producción de nitrito	60%	Roh y col. (2009)
<i>p</i> -Cresol	89 ^{IV}	Consortio nitrificante ^c	No se observó inhibición en la nitrificación	100%	Beristain-Cardoso y col. (2011)
2-Clorofenol	5	Consortio nitrificante ^b	90% en la eficiencia de consumo de amonio y 95% en la q _{NH₄} ^{II}	100%	Martínez-Hernández y col. (2011)

^Iq_{NO₃} = Velocidad específica de producción de nitrato, ^{II}q_{NH₄} = Velocidad específica de consumo de amonio, ^{III}N.D. = No determinado, ^{IV}[mg C L⁻¹ d⁻¹].

^a Reactor de lecho fluidificado, ^b Cultivos en lote, ^c Reactor de tanque agitado en continuo.

1.3.1 Inhibición de la nitrificación por compuestos orgánicos

La información que puede encontrarse acerca del efecto de la materia orgánica en la nitrificación se enfoca en dos aspectos: la biosíntesis celular y la generación de energía.

Algunos estudios relacionan el efecto de la materia orgánica con una inhibición en el crecimiento. Jensen (1950) observó que algunos aminoácidos inhiben el crecimiento de *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*. Los autores señalaron que la glicina, la alanina y la asparagina fueron inhibidores a concentraciones de 13-46 mM, mientras que la glutamina y el aspartato no tuvieron efecto en el crecimiento. Ciertas cepas de *Nitrobacter* pueden crecer en presencia de piruvato y acetato (Smith y Hoare, 1968; Steinmüller y Bock, 1977). En su estudio, Smith y Hoare (1968) observaron que el crecimiento de *Nitrobacter agilis* no sufrió ninguna inhibición en presencia de acetato (1-10 mM). Los autores observaron que al utilizar carbono marcado radioactivamente, el C-acetato fue asimilado por *N. agilis* en su fase de crecimiento exponencial. Incluso los autores señalaron que el C-acetato contribuyó entre el 33 y 39% en la síntesis de nuevas células. Con base en sus resultados, Smith y Hoare (1968) sugieren que *N. agilis* no es autótrofo obligado sino autótrofo facultativo.

Otros investigadores han evaluado el proceso respiratorio nitrificante y su cinética en presencia de materia orgánica. Para evaluar el proceso respiratorio nitrificante es importante seleccionar las variables de respuesta adecuadas. Las velocidades específicas del proceso, así como la eficiencia de consumo en sustratos y los rendimientos en productos han demostrado ser útiles en el estudio de la respiración nitrificante. La Tabla 3 muestra el efecto de algunos compuestos orgánicos en la nitrificación bajo diferentes condiciones. Es importante resaltar sobre las diferentes formas de evaluar los efectos en la nitrificación ya que no todos los autores utilizan las mismas variables de respuesta y por lo tanto se difiere en cómo se define una inhibición del proceso nitrificante. Los diferentes autores difieren en el concepto de inhibición, ya que para algunos una inhibición sólo representa una disminución en la eficiencia de eliminación de amonio, mientras que para otros una inhibición se evalúa

determinando una disminución en el rendimiento de producción de nitrato. Si se relaciona la inhibición de un proceso biológico con una inhibición enzimática, la variable de respuesta más útil para demostrar un efecto inhibitorio es la velocidad específica. Gómez y col. (2000) estudiaron en cultivos en lote, el efecto de diferentes concentraciones de acetato, propionato y butirato sobre la velocidad nitrificante. Los autores concluyeron que a una concentración de 500 mg L^{-1} de ácidos grasos volátiles, la inhibición en la velocidad nitrificante dependió del compuesto adicionado, de tal manera que el propionato y el butirato fueron los más inhibitorios. En otro estudio, Zepeda y col. (2007) observaron que el benceno, tolueno y *m*-xileno (BTX) ocasionaron un efecto inhibitorio en las velocidades de consumo de amonio y producción de nitrato en cultivos en lote, de manera individual o en mezcla. Sin embargo, los cultivos nitrificantes alcanzaron una conversión de amonio a nitrato del 100% sin la acumulación de nitrito. Estos autores señalaron que los BTX pueden tener un efecto diferente en mezcla que individualmente.

McCarty (1999) realizó una revisión de la literatura sobre estudios que se han enfocado en entender cómo la materia orgánica puede inhibir la amonio oxidación. Estas investigaciones han indicado que la enzima AMO puede oxidar una amplia variedad de compuestos orgánicos y que los efectos inhibitorios de la mayoría de estos sustratos ocurren por competencia con el NH_3 por el sitio activo de la enzima. Se propone que los sustratos alternativos pueden provocar inhibición en la AMO por tres mecanismos distintos: a) la unión directa del sustrato alternativo con la AMO, b) la interferencia con el suministro reductor (amoníaco) que necesita la AMO para su actividad, c) la oxidación de los sustratos produce compuestos que son altamente reactivos e inactivan la AMO u otras enzimas de la ruta nitrificante. Por ejemplo, Keener y Arp (1993) estudiaron el efecto inhibitorio de quince hidrocarburos e hidrocarburos halogenados en *Nitrosomonas europaea* y determinaron la actividad de la AMO midiendo la producción de nitrito. Estos autores encontraron que los sustratos alternativos de la AMO exhibieron perfiles cinéticos de inhibición competitiva y no competitiva. Proponen que dependiendo del sustrato, la unión con la AMO puede ocurrir en el sitio activo donde se lleva a cabo la oxidación del NH_3 (sustrato

competitivo) o en otro sitio de la enzima diferente al sitio activo (sustrato no competitivo). Estos autores sugieren que el carácter competitivo generalmente disminuye a medida que el peso molecular del inhibidor aumenta. Por ejemplo, el metano y el acetileno fueron inhibidores competitivos de la oxidación del NH_3 mientras que los alcanos y alcanos monohalogenados (con una cadena mayor a 4 carbonos) fueron no competitivos.

Algunos estudios manejan la posibilidad de que los microorganismos heterótrofos presentes en lodos nitrificantes puedan influir o propiciar una inhibición en la nitrificación cuando hay presencia de compuestos orgánicos. Esta inhibición estaría relacionada con la competencia entre nitrificantes y heterótrofos por el amonio y el oxígeno. Hanaki y col. (1990) en lodos activados alimentados con glucosa en un intervalo de 35-220 mg glucosa $\text{L}^{-1} \text{d}^{-1}$ en un reactor en continuo, brindan información acerca de la posible competencia entre nitrificantes y heterótrofos por amonio. Sus resultados mostraron que la adición de materia orgánica al cultivo provocó efectos adversos a la nitrificación. Los autores argumentan que el crecimiento de los heterótrofos inhibió la amonio oxidación mediante la asimilación del amonio disponible. De tal manera que al aumentar la carga orgánica, también aumentaría la asimilación del amonio por los heterótrofos. Estos autores determinaron ciertos parámetros cinéticos como la velocidad máxima de crecimiento (μ_m) y las constantes de afinidad (K_s) para la amonio y nitrito oxidación, sin y con adición de glucosa. Puede notarse en el trabajo de Hanaki y col. (1990) que las μ_m no sufren ningún cambio para la amonio y nitrito oxidación con o sin glucosa adicionada. Sin embargo, la K_s se incrementó conforme aumenta la carga orgánica para la amonio oxidación. Este resultado significaría que las AOB en presencia de heterótrofos necesitarían una mayor concentración de amonio para sostener su crecimiento. Okabe y col. (1996) estudiaron el efecto de varias relaciones C/N de alimentación (de 0 a 1) en la dinámica de las poblaciones nitrificantes y heterótrofas en una biopelícula. Los resultados de Okabe y col. (1996) sugieren que a una mayor relación C/N se produce una fase de retardo en la nitrificación, especialmente en la actividad de las bacterias nitrito oxidantes.

La teoría sobre la competencia entre nitrificantes y heterótrofos, también podría estudiarse desde el punto de vista de la obtención de energía. Tanto nitrificantes como heterótrofos necesitan oxígeno para la obtención de energía. Las diferencias entre las constantes de afinidad por el oxígeno (K_{O_2}) de nitrificantes y heterótrofos influyen en la competencia entre éstos por el O_2 . De acuerdo con Beristain-Cardoso y col. (2009) y Van Bodegom y col. (2001), la K_{O_2} ($mg\ O_2\ L^{-1}$) para las AOB, NOB y heterótrofos está en los intervalos de 0.03-1.3, 0.3-2.5 y 0.08-0.3, respectivamente. Por otra parte, es conocido el lento crecimiento de los nitrificantes (principalmente debido a su baja obtención de energía) comparado con los heterótrofos. Las velocidades máximas de crecimiento para AOB y NOB están alrededor de 0.3-2.2 y 0.2-2.5 d^{-1} respectivamente, mientras que para los heterótrofos pueden ir de 0.2 a 7.2 d^{-1} (Beristain-Cardoso y col., 2009). Bajo este argumento, es de esperarse que las bacterias autótrofas fueran desfavorecidas en condiciones de competencia. Una configuración de reactores con biomasa inmovilizada podría ayudar a que las bacterias nitrificantes, a pesar de su lento crecimiento no fueran lavadas del sistema. Más estudios sobre la competencia entre nitrificantes y heterótrofos son necesarios para entender de una mejor manera el fenómeno.

1.3.2 Inhibición de la nitrificación por compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son compuestos aromáticos que se caracterizan por tener en su estructura al menos un grupo hidroxilo unido al anillo aromático. Estos compuestos se pueden encontrar junto con el amonio en los efluentes de diversos procesos industriales como los de la industria petroquímica, del curtido de pieles e industria del acero entre otros (Olmos y col., 2004; Vázquez y col., 2006; Kim y col., 2008). Por ejemplo, Olmos y col. (2004) encontraron concentraciones de $710 \pm 590\ mg\ N-NH_4^+\ L^{-1}$, $60 \pm 10\ mg\ p\text{-cresol}\ L^{-1}$ y $20 \pm 5\ mg\ o\text{-cresol}\ L^{-1}$ en los efluentes de la refinería de Tula, México.

En la tabla 4, se presentan algunos estudios donde se reportan porcentajes de inhibición en la nitrificación por el efecto del fenol y sus derivados.

Tabla 4. Inhibición de la nitrificación por compuestos fenólicos.

Compuesto	Concentración (mg L ⁻¹)	% de inhibición	Referencia
Fenol	5.6	75	Stafford, 1974
Fenol	3.7	100	Dyrborg y Arvin, 1995
Fenol	2	100	Gernaey y col., 1999
Fenol	4	77	Juliastuti y col., 2003
Fenol	1500	18	Amor y col., 2005
Fenol	292	62	Vázquez y col., 2006
Fenol	500	100	Kim y col., 2008
<i>p</i> -Cresol	5.6	75	Stafford, 1974
<i>p</i> -Cresol	17	70	Texier y Gómez, 2002
<i>p</i> -Cresol	150	100	Kim y col., 2008
<i>m</i> -Cresol	200	20	Kim y Kim, 2003
<i>o</i> -Cresol	4.4	75	Stafford, 1974
<i>o</i> -Cresol	1.3	100	Dyrborg y Arvin, 1995

Los trabajos presentados en la Tabla 4 generalmente omiten datos cinéticos, así como información sobre el rendimiento de producción de nitrato. Por otro lado, cabe mencionar que la mayoría de los estudios encontrados en la literatura (Tabla 4) no se pueden comparar entre sí, ya que existieron diferencias en las metodologías usadas, el tipo de inóculo y las variables de respuesta evaluadas.

Stafford (1974) observó que una concentración de 5.6 mg L⁻¹ de fenol y 4.4 mg L⁻¹ de *o*-cresol inhibieron en un 75% la amonio oxidación, evaluando la inhibición mediante las velocidades de consumo de oxígeno. Mientras que Dyrborg y Arvin (1995) observaron que una concentración de 3.7 mg L⁻¹ de fenol y 1.3 mg L⁻¹ de *o*-cresol provocó un 100% de inhibición en el proceso amonio oxidante respecto a su velocidad de consumo de amonio. Los resultados de estos autores se basaron en un modelo matemático que describe una inhibición no competitiva por el compuesto fenólico, asumiendo que la nitrificación es de orden-cero respecto al oxígeno y amonio. Gernaey y col. (1999) midieron la inhibición usando una técnica de titulación que cuantifica los protones formados durante la nitrificación. Mediante un modelo matemático, determinaron a

partir de estos datos los parámetros cinéticos. Juliastuti y col. (2003) definieron el porcentaje de inhibición en la nitrificación mediante la prueba ISO 9509 que se basa en relacionar las velocidades de oxidación inhibidas con la máxima velocidad de oxidación.

De entre las teorías que se discuten sobre el efecto del fenol en la nitrificación, algunos autores coinciden en que la actividad de las bacterias nitrificantes aumenta a medida que el fenol desaparece del medio. Es decir, se observó que el fenol provoca una fase de retardo en la nitrificación y se cree que éste es consumido por las bacterias heterótrofas presentes en el cultivo nitrificante (Stafford, 1974; Gernaey y col., 1999; Yamagishi y col., 2001; Amor y col., 2005). Stafford (1974) observó un aumento en la velocidad específica de consumo de NH_3 conforme la concentración de fenol disminuía en el medio, señalando dos posibles escenarios, el primero donde las bacterias nitrificantes se adaptaron a la presencia de fenol, el segundo donde las bacterias heterótrofas consumieron el fenol hasta una concentración no inhibitoria para la nitrificación, permitiendo así la oxidación del NH_3 . Coincidiendo con lo señalado por Stafford (1974), Gernaey y col. (1999) observaron en cultivos en lote, que la actividad nitrificante comenzó hasta que el fenol (2 mg L^{-1}) se encontró en una concentración no inhibitoria, señalando que el fenol fue consumido por heterótrofos. Hacen falta más estudios para entender por completo el efecto de compuestos fenólicos en la nitrificación y la relación entre nitrificantes y heterótrofos en la oxidación de éstos.

Respecto a la nitrito oxidación en presencia de compuestos fenólicos, Wang (1984) evaluó el efecto del 2,3-diclorofenol y del 2,4,6-triclorofenol en células de *Nitrobacter*, a través del consumo de nitrito. El autor sugiere que la respuesta del cultivo depende del tiempo de contacto entre *Nitrobacter* y los compuestos fenólicos, así como de la concentración de éstos. El efecto inhibitorio de estos compuestos sobre *Nitrobacter* disminuyó conforme el tiempo de exposición aumentó. En otro trabajo, Martínez-Hernández y col. (2011) estudiaron la recuperación de actividad de un lodo nitrificante expuesto previamente a 2-clorofenol (5 mg L^{-1}). Sus resultados indicaron que las velocidades específicas de consumo de amonio y nitrito fueron inhibidas. Sin embargo, la nitrito oxidación fue menos sensible a la presencia del 2-clorofenol.

1.3.3 Oxidación de compuestos fenólicos por lodos nitrificantes

Los compuestos fenólicos han sido catalogados como peligrosos para la salud del ser humano y pueden causar efectos de toxicidad y bioacumulación en organismos vegetales y animales. Estos compuestos pueden irritar el tracto respiratorio en el hombre, mientras que su ingesta tendría efectos como dolores abdominales y vómito, provocando incluso daños en el hígado, el corazón y el sistema nervioso central. La exposición cutánea puede provocar quemaduras en la piel y toxicidad sistémica, aunque no está claro aún su efecto cancerígeno (Davi y Gnudi, 1999; EPA, 2000). Debido al efecto negativo de los compuestos fenólicos en la salud pública, surge la necesidad de desarrollar sistemas que puedan eliminar estos compuestos o bien transformarlos en otros menos tóxicos. Considerando que varios tipos de efluentes industriales contienen amonio y compuestos fenólicos, es importante desarrollar sistemas donde se eliminen ambos compuestos simultáneamente y la nitrificación surge como una alternativa viable.

En los estudios de la inhibición de la nitrificación por compuestos derivados del fenol (Tabla 4), también es necesario realizar un seguimiento de la oxidación del compuesto fenólico, a fin de obtener un mejor entendimiento de la nitrificación en presencia de fenol y sus derivados. Amor y col. (2005) trabajaron con un reactor nitrificante inoculado con lodos activados, al cual se le adicionó fenol de 30 a 2700 mg DQO L⁻¹ d⁻¹ y amonio a 140 mg N-NH₄⁺ L⁻¹ d⁻¹. Los autores encontraron una alta eficiencia en la eliminación de fenol y amonio en todas las velocidades de carga evaluadas. Sin embargo, la producción de nitrato disminuyó a medida que la velocidad de carga de fenol aumentó. La disminución en el rendimiento de producción de nitrato podría significar que la ruta nitrificante ya no era la predominante en el proceso, ya que parte del amonio consumido pudo ser asimilado por los heterótrofos. Lo anterior coincide con el señalamiento de los autores sobre el incremento en la concentración de biomasa en el reactor. Es posible que los resultados de Amor y col. (2005) tuvieran otro enfoque, si los autores hubieran determinado los productos de la oxidación del fenol. Yamagishi y col. (2001) utilizaron un consorcio nitrificante adaptado al fenol por 15 años como fuente de inóculo para un reactor de filtración de flujo cruzado.

Encontraron que el fenol a $300 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ fue completamente eliminado y simultáneamente el amonio fue oxidado a nitrato. Sin embargo, los autores no brindan información acerca de la oxidación del fenol, la formación de posibles intermediarios y se omite el balance de masa de carbono que permitiría visualizar la posible asimilación o mineralización del fenol. Yamagishi y col. (2001) sugirieron que el fenol fue consumido por la desnitrificación en los períodos de no aireación del cultivo y los autores cuantificaron el óxido nitroso producido en los periodos de aireación intermitente. A pesar de que los autores muestran evidencias moleculares de la presencia de bacterias nitrificantes en el consorcio, se omiten estudios moleculares para los posibles desnitrificantes. Mientras que Vázquez y col. (2006) estudiaron la eliminación simultánea de amonio, fenol y tiocianato (SCN^-) en una planta de lodos activados con actividad nitrificante a nivel piloto, alimentada con agua residual proveniente de un complejo de manufactura de acero. Los autores indican que a un tiempo de retención hidráulico de 40 h, fueron determinadas eficiencias de consumo de amonio, fenol y SCN^- del 38, 99 y 37%, respectivamente. Vázquez y col. (2006) proponen que para alcanzar la eliminación completa de amonio y SCN^- , es necesario contar con una configuración de dos etapas, donde la materia orgánica y SCN^- serían eliminados en la primera etapa, mientras que la nitrificación ocurriría en la segunda. Cabe señalar que en su trabajo, Vázquez y col. (2006) no hicieron mención de los productos finales de la nitrificación. Además, los posibles intermediarios de la oxidación de la materia orgánica no fueron determinados, lo cual podría ser importante en el caso que los intermediarios formados fueran más tóxicos que los compuestos originales. No obstante, estos trabajos manifiestan la potencial aplicación de la nitrificación en el tratamiento de aguas residuales, donde se requiere eliminar amonio y materia orgánica simultáneamente.

Respecto al efecto inhibitorio y a la oxidación del *p*-cresol en la nitrificación, la información en la literatura es aún más escasa, en especial en consorcios nitrificantes estabilizados (Tabla 4). Se ha estudiado la eliminación de *p*-cresol en cultivos axénicos y consorcios microbianos por desnitrificación y metanogénesis (Bossert y Young, 1986; Häggblom y col., 1990). Sin embargo, a diferencia de estas investigaciones, son

insuficientes los estudios realizados sobre el efecto del *p*-cresol y su oxidación en la nitrificación. Los estudios que evaluaron el efecto particular del *p*-cresol en la nitrificación, generalmente han omitido los datos cinéticos que permitan entender mejor el efecto inhibitorio del compuesto en el proceso respiratorio nitrificante. Texier y Gómez (2002) observaron que el *p*-cresol disminuyó el rendimiento de producción de nitrato en cultivos nitrificantes en lote. Además, el consumo del *p*-cresol originó la aparición de intermediarios carbonados que no fueron identificados, sugiriendo la capacidad del consorcio nitrificante en oxidar el *p*-cresol. Sin embargo, estos autores no proporcionaron datos cinéticos del proceso nitrificante para poner en evidencia la inhibición de la nitrificación por el *p*-cresol y comparar el efecto inhibitorio sobre los procesos de amonio y nitrito oxidación. Kim y col. (2008) evaluaron en cultivos en lote nitrificantes el efecto del *p*-cresol en un intervalo de concentraciones de 20 a 150 mg L⁻¹, observando que a partir de 50 mg *p*-cresol L⁻¹, la velocidad de la amonio oxidación disminuyó conforme aumentó la concentración inicial de *p*-cresol. Estos autores señalaron que podría existir una biodegradación del *p*-cresol por el lodo activado nitrificante. No obstante, los autores no proporcionan datos de la oxidación del *p*-cresol para sustentar esta teoría. Además, sólo se presentaron datos del consumo de amonio sin indicar valores de rendimiento en nitrato, por lo que no se podría descartar la asimilación del *p*-cresol y del amonio por el lodo nitrificante.

A pesar de que existe información sobre el efecto de los compuestos fenólicos, y en menor medida de los cresoles en la nitrificación, más estudios son necesarios para entender a qué se debe la inhibición en el proceso respiratorio nitrificante. No queda claro todavía en qué proporción está involucrada la inhibición de las enzimas de la nitrificación por los compuestos fenólicos y el efecto de competencia de los heterótrofos por el oxígeno y el amonio. Estudiar en paralelo la capacidad de los consorcios nitrificantes para oxidar compuestos fenólicos a través de balances de masa puede contribuir en entender mejor cómo se ve afectada la nitrificación.

1.4 Reactores nitrificantes de lotes secuenciados

Los reactores nitrificantes pueden presentar diferentes geometrías de acuerdo a su uso y aplicación, como por ejemplo reactores de tanque agitado, filtros percoladores,

discos rotatorios, filtros sumergidos y reactores de lecho fluidizado (Martínez, 2003). Cada una de estas configuraciones de reactores tiene sus ventajas y desventajas para tratar ciertos tipos de aguas residuales con amonio como contaminante. No obstante, uno de los reactores nitrificantes más utilizados es el reactor de lotes secuenciados (SBR por sus siglas en inglés, sequencing batch reactor). Un SBR se define como un sistema discontinuo en el cual el proceso biológico y la fase de sedimentación ocurren en un tanque único (Figura 7). El SBR es operado mediante ciclos consecutivos, donde cada ciclo está constituido por las siguientes etapas: llenado del tanque, reacción biológica, sedimentación y drenado (Texier y Gómez, 2004). Los SBR pueden ofrecer varias ventajas sobre los sistemas continuos convencionales para el tratamiento de aguas residuales de tipo doméstico e industrial (Artan y col., 2001). Por ejemplo, algunos beneficios que se obtienen al utilizar un SBR son el bajo costo de operación, la fácil automatización, la gran flexibilidad de operación, el ahorro en espacio y en mantenimiento. Se pueden alcanzar si es requerido, largos tiempos de retención celular y la posibilidad de que la biomasa sea lavada del reactor es menor que en un sistema en continuo (Mace y Mata-Alvarez, 2002).

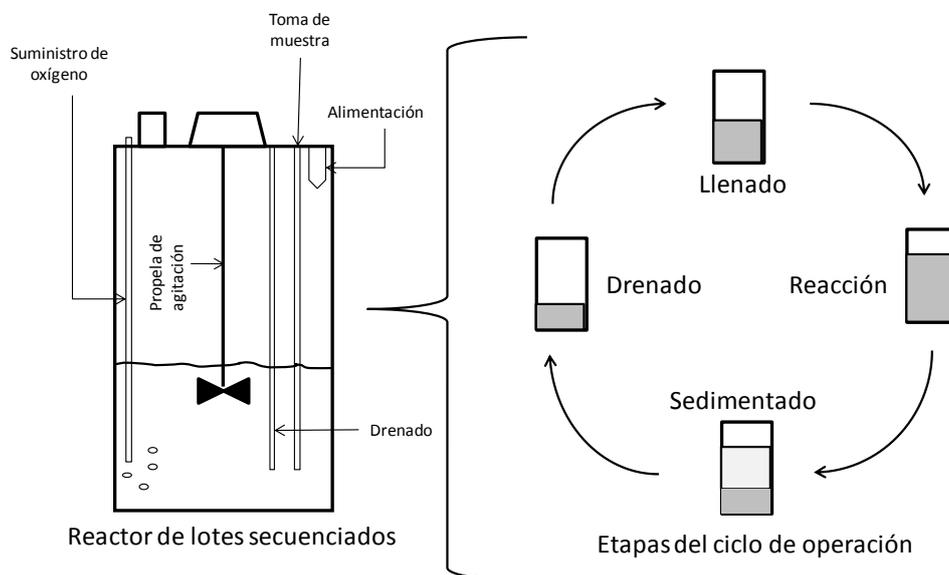


Figura 7. Esquema del reactor de lotes secuenciados.

En la literatura, se pueden encontrar varios estudios con SBR que involucran la eliminación de amonio y materia orgánica. La mayoría acoplan los procesos biológicos de nitrificación y desnitrificación aprovechando la alta flexibilidad de operación que presenta el sistema SBR donde pueden combinarse fases de aireación y no aireación

en la fase de reacción. Por ejemplo, el estudio de Villaverde y col. (2000) tuvo como propósito el de obtener una alta eficiencia de eliminación de amonio de aguas residuales con un alto contenido de amonio y materia orgánica, mediante la implementación de ciclos cortos de aireación. Bernardes y Klapwijk (1996) llevaron a cabo una investigación para evaluar el desempeño de un SBR a nivel planta piloto alimentado con aguas residuales municipales, con el cual se pretendió eliminar simultáneamente amonio ($71 \text{ mg N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$), ácido acético ($443 \text{ mg DQO L}^{-1}$) y fósforo mediante los procesos nitrificante y desnitrificante. Estos autores determinaron una aceptable eliminación de nitrógeno al cuantificar $12 \text{ mg N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$ a la salida del SBR. Carucci y col. (1999) estudiaron la posibilidad de tratar aguas residuales provenientes de una tinería en un SBR bajo condiciones anóxicas-aerobias. Los autores obtuvieron una estable y completa nitrificación después de 300 días, y sugirieron que la eliminación de la materia orgánica se llevó a cabo por desnitrificación en la fase anóxica. Estos estudios demuestran la eficiencia de los SBR para tratar aguas residuales de origen industrial y municipal, teniendo incluso ventajas sobre los reactores continuos. No obstante, desde el punto de vista de la investigación básica, estos trabajos no contribuyen mucho a generar conocimiento para entender el efecto que puede tener la materia orgánica sobre la nitrificación.

El sistema SBR puede constituir también una herramienta valiosa para el estudio básico de procesos metabólicos microbianos bajo diferentes condiciones de cultivo. En particular, permite desarrollar estudios cinéticos a través de los ciclos de operación. Texier y Gómez (2007) observaron en un reactor SBR nitrificante alimentado con *p*-cresol ($25\text{-}150 \text{ mg L}^{-1}$) que la oxidación del compuesto fenólico se llevó a cabo más rápidamente conforme transcurrieron los ciclos de operación y concomitantemente la inhibición en la nitrificación disminuyó con el número de ciclos. De tal manera que después de 5 ciclos de operación, se obtuvo una completa oxidación del amonio hasta nitrato y la desaparición del *p*-cresol e intermediarios del cultivo para cada concentración inicial de *p*-cresol. Sin embargo, hay que señalar que los autores no identificaron los intermediarios de la oxidación del *p*-cresol y tampoco presentaron datos de velocidades específicas de oxidación del *p*-cresol, lo cual podría proporcionar

información valiosa para entender por qué la nitrificación fue inhibida en los primeros ciclos.

Sin duda, el SBR puede ser una alternativa viable para eliminar simultáneamente amonio y compuestos fenólicos de las aguas residuales. Más estudios básicos en sistemas SBR son requeridos para caracterizar cinéticamente la capacidad de cultivos nitrificantes para oxidar simultáneamente amonio y compuestos inhibitorios como el *p*-cresol. Información de ese tipo ayudaría a controlar mejor sistemas nitrificantes que tengan contacto con este tipo de compuestos.

Referencias

- Ahlers B., Köning W. y Bock E. (1990). Nitrite reductase activity in *Nitrobacter vulgaris*. *FEMS Microbiology Letters*. **67**, 121-126.
- Ahn Y-H. (2006). Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: A review. *Process Biochemistry*. **41**, 1709-1721.
- Aleem M.I.H., Hoch G.E. y Varner J.E. (1965). Water as the source of oxidizing and reducing power in bacterial chemosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **5**, 869-873.
- Aleem M.I.H. y Sewel D.L. (1981). Mechanism of nitrite oxidation and oxidoreductase systems in *Nitrobacter agili*. *Current Microbiology*. **5**, 267-272.
- Amor L., Eiroa M., Kennes C. y Veiga M.C. (2005). Phenol biodegradation and its effect on the nitrification process. *Water Research*. **39**(13), 2915-2920.
- Anderson K. K. y Hooper A.B. (1983). O₂ and H₂O are each the source of one O in NO₂⁻ produced from NH₃ by *Nitrosomonas*: ¹⁵N-NMR evidence. *FEBS Letters*. **164**(2), 236-240.
- Anthonisen A.C., Loehr R.C., Prakasom T.B.S. y Srinath E.G. (1976). Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *Journal of Water Pollution Control Federation*. **48**(5), 835-851.
- Arp D., Sayavedra-Soto L. A. y Hommes N.G. (2002). Molecular biology and biochemistry of ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea*. *Archives of Microbiology*. **178**, 250-255.

- Arp D. y Stein L.Y. (2003). Metabolism of inorganic N compounds by ammonia-oxidizing bacteria. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. **38**, 471-495.
- Artan N., Wilderer P., Orhon D., Morgenroth E. y Özgür N. (2001). The mechanism and design of sequencing batch reactor system for nutrient removal -the state of the art. *Water Science and Technology*. **43**(3), 53-60.
- Balmelle B., Nguyen K.M., Capdeville B. Cornier J.C. y Deguin A. (1992). Study of factors controlling nitrite build-up in biological processes for water nitrification. *Water Science and Technology*. **26**(1-2), 1017-1025.
- Barraclough D. y Puri G. (1995). The use of ^{15}N pool dilution and enrichment to separate the heterotrophic and autotrophic pathways of nitrification. *Soil Biology and Biochemistry*. **27**(1), 17-22.
- Bedard C. y Knowles R. (1989). Physiology, biochemistry, and specific inhibitors of CH_4 , NH_4^+ , and CO oxidation by methanotrophs and nitrifiers. *Microbiological Reviews*. **53**(1), 68-84.
- Belser L.W. y Mays E.L. (1980). Specific inhibition of nitrite oxidation by chlorate and its use in assessing nitrification in soils and sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. **39**(3), 505-510.
- Bernardes R.S. y Klapwijk A. (1996). Biological nutrient removal in a sequencing batch reactor treating domestic wastewater. *Water Science and Technology*. **33**(3), 29-38.
- Bernet N. y Spérandio M. (2009). Principles of nitrifying processes. En: Environmental technologies to treat nitrogen pollution. 1ra edición. Editorial: IWA Publishing, London. pp. 23-39.
- Beristain-Cardoso R., Texier A.-C., Razo-Flores E., Méndez-Pampín R. y Gómez J. (2009). Biotransformation of aromatic compounds from wastewaters containing N and/or S, by nitrification/denitrification: a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. **8**, 325-342.
- Beristain-Cardoso R., Pérez-González D.N., González-Blanco G. y Gómez J. (2011). Simultaneous oxidation of ammonium, *p*-cresol and sulfide using a nitrifying sludge in a multipurpose bioreactor: A novel alternative. *Bioresource Technology*. **102**, 3623-3625.

- Bishop D.F., Heidman J.A. y Stamberg J.B. (1976). Single-Stage nitrification-denitrification. **48**(3), 520-532.
- Bock E., Koops H.P., Harms H. y Ahler B. (1991). The biochemistry of nitrifying organisms. Variations in autotrophic life. Editorial: Academic Press, San Diego. pp 171-200.
- Bock E. y Wagner M. (2006). Oxidation of inorganic nitrogen compounds as energy source. *Prokaryotes*. **2**, 457-495.
- Bodelier P.L.E. y Frenzel P. (1999). Contribution of methanotrophic and nitrifying bacteria to CH₄ and NH₄⁺ oxidation in the rhizosphere of rice plants as determined by new methods of discrimination. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**(5), 1826-1833.
- Bossert I. y Young L.Y. (1986). Anaerobic oxidation of *p*-cresol by a denitrifying bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*. **52**(5), 1117-1122.
- Camargo J.A. y Alonso A. (2006). Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. *Environment international*. **32**, 831-849.
- Carucci A., Chiavola A., Majona M. y Rolle E. (1999). Treatment of tannery wastewaters in a sequencing batch reactor. *Water Science and Technology*. **40**(1), 253-259.
- Cervantes F.J. (2009). Anthropogenic sources of N-pollutants and their impact on the environment and public health. En: Environmental technologies to treat nitrogen pollution. 1ra edición. Editorial: IWA Publishing, London. pp. 1-22.
- Cobley J. G. (1976). Energy-conserving in phosphorylating electron-transport particles from *Nitrobacter winogradskyi*. *Biochemical Journal*. **156**, 481-491.
- Crossmann L.C., Moir J.W., Enticknap J.J., Richardson D.J. y Spiro S. (1997). Heterologous expressions of heterotrophic nitrifications genes. *Microbiology*. **143**, 3775-3783.
- Cuervo-López F., Martínez-Hernández S., Texier A.-C. y Gómez J. (2009). Principles of denitrifying processes. En: Environmental technologies to treat nitrogen pollution. 1ra edición. Editorial: IWA Publishing, London. pp 41-54.
- Dahab M.F. y Lee Y.W. (1988). Nitrate removal from water supplies using biological denitrification. *Journal Water Pollution Control Federation*. **60**(9), 1670-1674.

- Daims H., Nielsen J.L., Nielsen P-H., Schleifer K-H. y Wagner M. (2001). In situ characterization of *Nitrospira*-like nitrite-oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants. *Applied and Environmental Microbiology*. **67**(11), 5273-5284.
- Davi M.L. y Gnudi F. (1999). Phenolic compounds in surface water. *Water Research*. **33**(14), 3213-3219.
- De Boer W. y Kowalchuck G.A. (2001). Nitrification in acid soils: micro-organisms and mechanisms. *Soil Biology & Biochemistry*. **33**, 853-866.
- Dyreborg S. and Arvin E. (1995). Inhibition of nitrification by creosote-contaminated water. *Water Research*. **29**(6), 1603-1606.
- Ehrich S., Behrens D., Lebedeva E., Ludwing W. y Bock E. (1995). A new obligately chemolithoautotrophic, nitrite-oxidizing bacterium, *Nitrospira moscoviensis* sp. nov. and its phylogenetic relationship. *Archives of Microbiology*. **164**, 16-23.
- Eilersen A., Henze M. y Kloft L. (1994). Effects of volatile fatty acids and trimethylamine on nitrification on activated sludge. *Water Research*. **28**(6), 1329-1336.
- Eiroa M., Kennes C. y Veiga M.C. (2004). Formaldehyde biodegradation and its inhibitory effect on nitrification. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. **79**, 499-504.
- EPA (Environmental Protection Agency). (1987). Design manual: phosphorus removal. EPA/625/1-87/001. Cincinnati, OH.U.S.A.
- EPA (Environmental Protection Agency). (1993). Nitrogen Control Manual. Environmental pollution agency of United States-Editorial. Washington, DC.
- EPA (Environmental Protection Agency). (2000).Technology Transfer Network. Air toxics web site. Cresol. (<http://www.epa.gov/ttn/atw/hlthef/cresols.html> visitado el 5-oct-10, 12:00 PM)
- Francis C.A., Roberts K.J., Beman J.M., Santoro A.E. y Oakley B.B. (2005). Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing Archaea in water columns and sediments of the ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **102**(41), 14683-14688.

- Francis C.A., Beman J.M. y Kuypers M.M. (2007). New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial ecology of anaerobic and archeal ammonia oxidation. *The ISME Journal*. **1**, 19-27.
- Freitag A., Rudert M. y Bock E. (1987). Growth of *Nitrobacter* by dissimilatory nitrate reduction. *FEMS Microbiology Letters*. **48**(1-2), 105-109.
- Galloway J.N., Townsend A.R., Erismann J.W., Bekunda M., Cai Z., Freney J., Martinelli L.A., Seitzinger S.P. y Sutton M.A. (2008). Transformation of the nitrogen cycle: Recent trends, questions, and potential solutions. *Science*. **320**, 889-892.
- Gerardi M.H. (2002). Nitrification and Denitrification in the Activated Sludge Process. Editorial: Wiley-Interscience, John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Gernaey K., Maffei D., Vanrolleghem P. y Verstraete W. (1999). A new pH-based procedure to model toxic effects on nitrifiers in activated sludge. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. **74**(7), 679-687.
- Gieseke A., Tarre S., Green M., de Beer D. (2006). Nitrification in a biofilm at low pH values: Role of in situ microenvironments and acid tolerance. *Applied and Environmental Microbiology*. **72**(6), 4283-4292.
- Ginestet P., Audic J.M., Urbain V., Block J-C- (1998). Estimation of nitrifying bacterial activities by measuring oxygen uptake in the presence of the metabolic inhibitors allylthiourea and azide. *Applied and Environmental Microbiology*. **64**(6), 2266-2268.
- Glass C., Silverstein J., Oh J. (1997) Inhibition of denitrification in activated sludge by nitrite. *Water Environment Research*. **69**, 1086-1093.
- Gómez J., Mendez J.R. y Lema J.M. (2000). Kinetic study of addition of volatile organic compounds to a nitrifying sludge. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **88**, 1-12.
- Goreau T.J., Kaplan W.A., Wofsy S.C., McElroy M.B., Valois F.W. y Watson S.W. (1980). Production of NO₂ and N₂O by nitrifying bacteria at reduced concentration of oxygen. *Applied and Environmental Microbiology*. **40**(3), 526-532.
- Groeneweg J., Sellner B. y Tappe W. (1994). Ammonia oxidation in *Nitrosomonas* NH₃ concentrations near Km: Effects of pH and temperature. *Water Research*. **28**(12), 2561-2566.

- Grunditz C., Gumaelius L. y Dalhammar G. (1998). Comparison of inhibition assays using nitrogen removing bacteria: Application to industrial wastewater. *Water Research*. **32**(10), 2995-3000.
- Güven D., Dapena A., Kartal B., Schmid M.C., Maas B., van de Pas-Schoonen K., Sozen S., Mendez R., den Camp H.J.M.O., Jetten M.C.M., Strous M. y Schmidt I. (2005). Propionate oxidation by and methanol inhibition of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. **71**(2), 1066–1071.
- Häggbloom M.M., Rivera M.D., Bossert I.D., Rogers J.E. y Young L.Y. (1990). Anaerobic biodegradation of para-cresol under three reducing conditions. *Microbial Ecology*. **20**, 141–150.
- Hallam S.J., Konstantinidis K.T., Putnam N., Schleper C., Watanabe Y-I., Sugahara J. *et al.* (2006). Genomic analysis of the uncultivated marine crenarchaeote *Cenarchaeum symbiosum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **103**(48), 18296-18301.
- Hanaki K., Wantawin C. y Ohgaki S. (1990). Effects of the activity of heterotrophs on nitrification in a suspended-growth reactor. *Water Research*. **24**(3), 289-296.
- Harris D.C. (2003). Análisis Químico Cuantitativo. 3ra edición. Editorial: Reverté. Apéndice G pp. AP-13.
- Head I.A., Hoirns W.D., Embley T.M., McCarthy A.J. y Saunders J.R. (1993). The phylogeny of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria as determined by analysis of 16S ribosomal RNA gene sequences. *Journal of General Microbiology*. **139**, 1147-1153.
- Henze M., Harremoës P., Jansen J.C. y Arvin E. (2002). Wastewater treatment- Biological and chemical processes. Tercera edición. Editorial: Springer-Verlag, New York. pp 89-99.
- Hellinga C., Schellen A.A.J.C., Mulder J.M. y van Loodsrecht M.C.M. (1998). The SHARON process: an innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich wastewaters. *Water Science and Technology*. **37**(9), 135-142.
- Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.A., Stanley J.T. y Williams S.T. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9na Edición. Editorial: Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia. pp 447-450.

- Hooper A.B. y Terry K.R. (1973). Specific inhibitors of ammonia oxidation in *Nitrosomonas*. *Journal of Bacteriology*. **115**(2), 480-485.
- Hooper A.B. y Balny C. (1982). Reaction of oxygen with hydroxylamine oxidoreductase of *Nitrosomonas*: fast kinetics. *FEBS Letters*. **144**(2), 299-303.
- Hooper A.B. y DiSpirito A.A. (1985). In bacteria which grow on simple reductants, generation of a proton gradient involves extracytoplasmic oxidation of substrate. *Microbiological reviews*. **49**(2), 140-157.
- Hopper D.J. (1978). Incorporation of [¹⁸O] Water in the formation of phydroxybenzyl alcohol by the *p*-cresol methylhydroxylase from *Pseudomonas putida*. *The Biochemical Journal*. **175**, 345–347.
- Hyman M.R. y ArpD. J. (1992). ¹⁴C₂H₂-and ¹⁴CO₂-labeling studies of the *de novo* synthesis of polypeptides by *Nitrosomonas europaea* during recovery from acetylene and light inactivation of ammonia monooxygenase. *The Journal of Biological Chemistry*. **267**(3), 1534-1542.
- Hynes R. y Knowles R. (1983). Inhibition of chemoautotrophic nitrification by sodium chlorate and sodium chlorite: a reexamination. *Applied and Environmental Microbiology*. **45**(4), 1778-1782.
- Ingledeew W.J. y Halliug P.J. (1976). Paramagnetic centers of the nitrite oxidizing bacterium *Nitrobacter*. *FEBS Letters*. **67**, 90-93.
- Jayamohan S., Ohgaki S. y Hanaki K. (1988). Effect of DO on kinetics of nitrification. *Water Supply*. **6**(3), 141-150.
- Jensen H.L. (1950). Effect of organic compounds on *Nitrosomonas*. *Nature*. **165**(4207), 974.
- Jetten M.S.M., Strous M., van de Pas-Schoonen K.T., Schalk J., van Dongen U.G.J.M., van de Graaf A.A., Logemam S., Muyzer G., van Loosdrecht M.C.M. y Kuenen J.G. (1999). The anaerobic oxidation of ammonium. *FEMS Microbiology Reviews*. **22**, 421-437.
- Jetten M.S.M., Schmid M., Schmidt I., Wubben M., van Dongen U., *et al.* (2002). Improved nitrogen removal by application of new nitrogen cycle bacteria. *Re/views in Environmental Science and Bio/Technology*. **1**, 51-63.

- Jiang Q.Q. y Bakken L.R. (1999). Nitrous oxide production and methane oxidation by different ammonia-oxidizing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**(6), 2679-2684.
- Jones R.D. y Morita R.Y. (1985). Survival of a marine ammonium oxidizer under energy source deprivation. *Marine Ecology Progress Series*. **26**, 175-179.
- Johnstone B.H. y Jones R.D. (1988). Physiological effects of long-term energy-source deprivation on the survival on a marine chemolithotrophic ammonium-oxidizing bacterium. *Marine Ecology Progress Series*. **49**, 295-303.
- Juliastuti S.R., Baeyens J. y Creemers C. (2003). Inhibition of nitrification by heavy metals and organic compounds: The ISO 9509 test. *Environmental Engineering Science*. **20**(2), 79-90.
- Juretschko S., Timmermann G., Schmid M., Schleifer K-H., Pommerening-Röser A., Koops H-P. y Wagner M. (1998). Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations. *Applied and Environmental Microbiology*. **64**(8), 3042-3051.
- Keener, W.K. y Arp, D.J. (1993). Kinetic studies of ammonia monooxygenase inhibition in *Nitrosomonas europaea* by hydrocarbons and halogenated hydrocarbons in an optimized whole-cell assay. *Applied and Environmental Microbiology*. **59**, 2501-2510.
- Keener W.K. y Arp D.J. (1994). Transformations of aromatic compounds by *Nitrosomonas europaea*. *Applied and Environmental Microbiology*. **60**(6), 1914-1920.
- Khin T. y Annachhatre A.P. (2004). Novel microbial nitrogen removal processes. *Biotechnology Advances*. **22**, 519-532.
- Killham K. (1987). A new perfusion system for the measurement and characterization of potential rates of soil nitrification. *Plant and Soil*. **97**, 267-272.
- Kim S-S. y Kim H-J. (2003). Impact and threshold concentration of toxic materials in the stripped gas liquor on nitrification. *Korean Journal of Chemical Engineering*. **20**(6), 1103-1110.

- Kim M.Y., Park D., Lee S-D. y Park J.M. (2008). Inhibitory effects of toxic compounds on nitrification process for cokes wastewater treatment. *Journal of Hazardous Materials*. **152**, 915–921.
- Kleiner D. (1985). Bacterial ammonium transport. *FEMS Microbiology Reviews*. **32**(2), 87-100.
- Knowles R. (1982). Denitrification. *Microbiological Reviews*. **46**(1), 43-70.
- Könneke M., Bernhard A.E., de la Torre J.R., Walker C.B., Waterbury J.B. y Stahl D.A. (2005). Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature*. **437**, 543-546.
- Kowalchuck G. y Stephen J.R. (2001). Ammonia-oxidizing bacteria: A model for molecular microbial ecology. *Annual Review of Microbiology*. **55**, 485-529.
- Krüger B., Meyer O., Nagel M., Andreaesen J.R., Meincke M., Bock E., Blümle S. y Zumft W. (1987). Evidence for the presence of bacto-pterin in the eubacterial molybdoenzymes nicotinic acid dehydrogenase, nitrite oxidoreductase, and respiratory nitrate reductase. *FEBS Microbiology Letters*. **48**(1-2), 225-227.
- Laanbroek H.J. y Gerards S. (1993). Competition for limiting amounts of oxygen between *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter winogradskyi* grown in mixed continuous cultures. *Archives of Microbiology*. **159**, 453-459.
- Leininger S., Urich T., Schloter M., Schwark L., Qi J., Nicol G.W., Prosser J.I., Schuster S.C. y Schleper C. (2006). Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature*. **442**, 806-809.
- Leta S., Assefa F., Gumaelius L. y Dalhammar G. (2004). Biological nitrogen and organic matter removal from tannery wastewater in pilot plant operations in Ethiopia. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **66**, 333-339.
- Lin Y.M., Tay J-H., Liu Y. y Hung Y-T. (2009). Biological nitrification and denitrification processes. En: *Biological treatment processes*, volumen 8. Editorial: Humana Press. pp 539-580.
- Mace S. y Mata-Alvarez J. (2002). Utilization of SBR technology for wastewater treatment: An overview. *Ind. Eng. Chem. Res.* **41**(23), 5539-5553.
- Martínez F. (2003). Sedimentabilidad de un lodo nitrificante en dos tipos de reactores y en presencia de material orgánica. Tesis doctoral. Laboratorio de Fisiología

Microbiana, CBS Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México.

Martínez S. (2007). Análisis ecofisiológico de la desnitrificación en presencia de acetato y tolueno. Tesis Doctoral. . Laboratorio de Fisiología Microbiana, CBS Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México.

Martínez-Hernández S., Texier A-C., Cuervo-López F.M. y Gómez J. (2011). 2-Chlorophenol consumption and its effect on the nitrifying sludge. *Journal of Hazardous Materials*. **185**, 1592–1595.

McCarty G.W. Modes of action of nitrification inhibitors (1999). *Biology and Fertility of Soils*. **29**, 1-9.

McTavish H., Fuchs J.A. y Hooper A.B. (1993). Sequence of the gene coding for ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea*. *Journal of Bacteriology*. **175**, 2445-2447.

Meincke M., Bock E., Kastrau D. y Kroneck P.M.H. (1992). Nitrite oxidoreductase from *Nitrobacter hamburgensis* redox centers and their catalytic role. *Archives of Microbiology*. **158**, 127-131.

Mével G. y Prieur D. (2000). Heterotrophic nitrification by a thermophilic *Bacillus* species as influenced by different cultures conditions. *Canadian Journal of Microbiology*. **46**, 465-463.

Nevalainen I., Kostyal E., Nurmiäho-Lassila E-L., Puhakka J. y Salkinoja-Salonen M. (1993). Deschlorination of 2,4,6-trichlorophenol by a nitrifying biofilm. *Water Research*. **27**(5), 757-767.

Okabe Y., Oozawa Y., Hirata K. y Watanabe Y. (1996). Relationship between population dynamics of nitrifiers in biofilms and reactor performance at various C:N ratios. *Water Research*. **30**(7), 1563-1572.

Olmos A., Olguin P., Fajardo C., Razo E. y Monroy O. (2004). Physicochemical characterization of spent caustic from the OXIMER process and sour waters from Mexican oil refineries. *Energy & Fuels*. **18**, 302-304.

- Ortiz J.A., Rueda A., Carbonell G., Camargo J.A., Nieto F. y Tarazona J.V. (1993). Acute toxicity of sulfide and lower pH in cultured rainbow trout and coho salmon. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. **50**, 164-170.
- Painter H.A. (1970). A review of literature on inorganic nitrogen metabolism in microorganisms. *Water Research*. **4**, 393-450.
- Papen H., von Berg R., Hinkel I., Thoene B. y Rennenberg H. (1989). Heterotrophic nitrification by *Alcaligenes faecalis*: NO_2^- , NO_3^- , N_2O and NO production in exponentially growing cultures. *Applied and Environmental Microbiology*. **55**(8), 2068-2072.
- Paredes D., Kuschik P., Mbwette T.S.A., Stange F., Müller R.A. y Kösser H. (2007). New aspects of microbial nitrogen transformations in the context of wastewaters treatment: A review. *Engineering in Life Sciences*. **7**(1), 13-25.
- Park H-D., Wells G.F., Bae H., Criddle C.S. y Francis C.A. (2006). Occurrence of ammonia-oxidizing archaea in wastewater treatment plant bioreactors. *Applied and Environmental Microbiology*. **72**(8), 5643-5647.
- Park S. y Bae W. (2009). Modeling kinetics of ammonium oxidation and nitrite oxidation under simultaneous inhibition by free ammonia and free nitrous acid. *Process Biochemistry* **44**, 631-640.
- Peng Y. y Zhu G. (2006). Biological nitrogen removal with nitrification and denitrification via nitrite pathway. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **75**, 15-26.
- Philips S., Laanbroek H.J. y Verstraete W. (2002). Origin, causes and effects of increased nitrite concentrations in aquatic environments. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. **1**, 115-141.
- Pinck C., Coeur C., Potier P. y Bock E. (2001). Polyclonal antibodies recognizing the Amob protein of ammonia oxidizers of the α -subclass of the class *Proteobacteria*. *Applied and Environmental Microbiology*. **67**(1), 118-124.
- Poth M. y Foch D.D. (1985). ^{15}N Kinetic analysis of N_2O production by *Nitrosomonas europaea*: an examination of nitrifier denitrification. *Applied and Environmental Microbiology*. **49**(5), 1134-1141.

- Pricnic A., Mahne I., Megusar F., Paul E.A. y Tiedje J. (1998). Effects of pH and oxygen and ammonium concentrations on the community structure of nitrifying bacteria from wastewaters. *Applied and Environmental Microbiology*. **64**(10), 3584-3590.
- Prosser J.I. (1989). Autotrophic nitrification in bacteria. *Advances in microbial physiology*. **30**, 125-181.
- Purkhold U., Pommerening-Röser A., Juretschko S., Schmid M.C., Koops H.P. y Wagner M. (2000). Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and *amoA* sequence analysis: Implications for molecular diversity surveys. *Applied and Environmental Microbiology*. **66**(12), 5368-5382.
- Randall C.W. y Buth D. (1984). Nitrite build-up in activated sludge resulting from temperature effects. *Journal Water Pollution Control Federation*. **56**(9), 1039-1044.
- Remde A. y Conrad F. (1990). Production of nitric oxide in *Nitrosomonas europaea* by reduction of nitrite. *Archives of Microbiology*. **154**, 187-191.
- Robertson L.A. y Kuenen J.G. (1988). Heterotrophic nitrification in *Thiosphaera pantotropha*: Oxygen uptake and enzyme studies. *Journal of General Microbiology*. **134**, 857-862.
- Roh H., Subramanya N., Zhao F., Yu C-P., Sandt J. y Chu K-H. (2009). Biodegradation potential of wastewater micropollutants by ammonia-oxidizing bacteria. *Chemosphere*. **77**, 1084-1089.
- San-Fonfria R. y Ribas J.P. (1999). Ingeniería ambiental: Contaminación y tratamientos. 1ra edición. Editorial: Marcombo S.A. Barcelona. pp. 110.
- Schimmel J.P., Firestone M.K. y Killham K.S. (1984). Identification of heterotrophic nitrification in a sierra forest soil. *Applied and Environmental Microbiology*. **48**(4), 802-806.
- Schmid M., Twachtmann U., Klein M., Strous M., Juretschko S., Jetten M., Metzger J.W., Schleifer K.-H. y Wagner M. (2000). Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation. *Systematic and Applied Microbiology*. **23**, 93-106.

- Schramm A. (2003). In situ analysis of structure and activity of the nitrifying community in biofilms, aggregates, and sediments. *Geomicrobiology Journal*. **20**, 313-333.
- Schweighofer P., Nowak O., Svardal K. y Kroiss H. (1996). Steps towards the upgrading of a municipal WWTP affected by nitrification inhibiting compounds-A case study. *Water Science and Technology*. **33**(12), 39-46.
- Sewell D.L., Aleem H.I.H. y Wilson D.F. (1972). The oxidation-reduction potentials and rates of oxidation of the cytochromes of *Nitrobacter agilis* *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **153**(1), 312-319.
- Shammas N.K. (1986). Interactions of temperature, pH and biomass on the nitrification process. *Journal Water Pollution Control Federation*. **58**(1), 52-59.
- Sinha B. y Annachhatre A.P. (2007). Partial nitrification—operational parameters and microorganisms involved. *Re/views in Environmental Science and Bio/Technology*. **6**, 285-313.
- Silva C.D., Cuervo-López F.M., Gómez J. y Texier A-C. (2011). Nitrite effect on ammonium and nitrite oxidizing processes in a nitrifying sludge. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **27**, 1241-1245. DOI 10.1007/s11274-010-0573-6.
- Smith A.J. y Hoare D.S. (1968). Acetate assimilation by *Nitrobacter agilis* in relation to its "Obligate Autotrophy". *Journal of Bacteriology*. **95**(3), 844-855.
- Smith V.H. (2003). Eutrophication of freshwater and coastal marine ecosystems. A global problem. *Environmental Science and Pollution Research*. **10**(2), 126-139.
- Smith V.H., Joyle S.B. y Howarth R.W. (2006). Eutrophication of freshwater and marine ecosystems. *Limnology and Oceanography*. **51**, 351-355.
- Stafford D.A. (1974). The effects of phenols and heterocyclic bases on nitrification in activated sludges. *Journal of Applied Microbiology*. **37**(1), 75-82.
- Stams A.J.M., Flameling M. y Maenette E.C.L. (1990). The importance of autotrophic versus heterotrophic oxidation of atmospheric ammonium in forest ecosystems. *FEMS Microbiology Letters*. **74**(4), 337-344.
- Stein L.Y., Arp D.J. y Hyman M.R. (1997). Regulation of the synthesis and activity of ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea* by altering pH to affect NH₃ availability. *Applied and Environmental Microbiology*. **63**(11), 4588-4592.

- Stein L.Y. y Arp D.J. (1998). Loss of ammonia monooxygenase activity in *Nitrosomonas europaea* upon exposure to nitrite. *Applied and Environmental Microbiology*. **64**(10), 4098-4102.
- Steinmüller W. y Bock E. (1977). Enzymatic studies of autotrophically, mixotrophically and heterotrophically grown of *Nitrobacter agilis* with special reference to nitrite oxidase. *Archives of Microbiology*. **115**, 51-54.
- Stenstrom M.K. y Poduska R. (1980). The effect of dissolved oxygen concentration on nitrification. *Water Research*. **14**, 643-649.
- Strous M., Kuenen J.G. y Jetten M.S.M. (1999). Key physiology of anaerobic ammonium oxidation. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**(7), 3248-3250.
- Stüven R. y Bock E. (2001). Nitrification and denitrification as a source for NO and NO₂ production in high strength wastewater. *Water Research*. **35**(8), 1905–1914.
- Suzuki I., Dular U. y Kwok S.C. (1974). Ammonia or ammonium ion as substrate for oxidation by *Nitrosomonas europaea* cell and extracts. *Journal of Bacteriology*. **120**(1), 556-558.
- Tan C.G.N., Kampschreur M.J., Wanders W., van der Pol W.L.J., van de Vossenberg J., Kleerebezem R., van Loosdrecht M.C.M, Jetten M.S.M. (2008). Physiological and phylogenetic study of an ammonium-oxidizing culture at high nitrite concentrations. *Systematic and Applied Microbiology* **31**, 114–125.
- Tchobanoglous G. y Burton F.L. (1991). *Metcalf & Eddy Wastewater engineering: Treatment, disposal and reuse*. 3^{ra} ed. McGraw-Hill, New York. pp. 735-740.
- Teske A., Alm E., Reagan J.M., Toze S., Rittmann B.E. y Stahl D.A. (1994). Evolutionary relationships among ammonia and nitrite oxidizing bacteria. *Journal of Bacteriology*. **176**(21), 6623-6630.
- Texier A.-C. y Gómez J. (2002). Tolerance of nitrifying sludge to *p*-cresol. *Biotechnology Letters*. **24**, 321-324.
- Texier A.-C. y Gómez J. (2004). Settleability and kinetics of a nitrifying sludge in a sequencing batch reactor. *Canadian Journal of Microbiology*. **50**, 943–949.
- Texier A.-C. y Gómez J. (2007). Simultaneous nitrification and *p*-cresol oxidation in a nitrifying sequencing batch reactor. *Water Research*. **41**, 315-322.

- Treusch A.H., Leininger S., Kletzin A., Schuster S.C., Klenk H-P. y Schleper C. (2005). Novel genes for nitrite reductase and *Amo*-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. *Environmental Microbiology*. **7**, 1985-1995.
- Turan M., Gulsen H. y Celik M. (2005). Treatment of landfill leachate by a combined anaerobis fluidized bed and zeolite column system. *Journal of Environmental Engineering*. **131**(5), 815-819.
- Vadivelu V.M., Yuan Z., Fux C., Keller J. (2006a). The inhibitory effects of free nitrous acid on the energy generation and growth processes of an enriched *Nitrobacter* culture. *Environmental Science & Technology*. **40**, 4442-4448.
- Vadivelu V.M., Keller J., Yuan Z. (2006b). Effect of free ammonia and free nitrous acid concentration on the anabolic and catabolic processes of an enriched *Nitrosomonas* culture. *Biotechnology and Bioengineering*. **95**, 830-839.
- Van Bodegom P., Stams F., Mollema L., Boeke S., Leffelaar P. (2001). Methane oxidation and the competition for oxygen in the rice rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*. **67**(8), 3586–3597.
- Van Dogen U., Jetten M.S.M. y Van Loosdrecht M.C.M. (2001). SHARON-Anammox process for treatment of ammonium rich wastewater. *Water Science and Technology*. **44**(1), 153-160.
- Van Hulle S.W.H., Volcke E.I.P., López-Teruel J., Donckels B., Van Loosdrecht M.C.M., Vanrolleghem P.A. (2007). Influence of temperature and pH on the kinetics of the Sharon nitrification process. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. **82**, 471-480.
- Van Loosdrecht M.C.M. (2004). Recent development on biological wastewater nitrogen removal technologies. En: Proceedings of the presentation in international conference on wastewater treatment for nutrient removal and reuse (ICWNR'04).
- Vázquez I., Rodríguez J., Marañón E., Castrillón L. y Fernández Y. (2006). Simultaneous removal of phenol, ammonium and thiocyanate from coke wastewater by aerobic biodegradation. *Journal of Hazardous Materials*. **137**, 1773-1780.

- Venter J.C., Remington K., Heidelberg J.F., Halpern A.L., Rusch D. Eisen J.A. *et al.* (2004). Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science*. **304**, 66-74.
- Villaverde S., García-Encina P.A., Lacalle M.L., y Fdz-Polanco F. (2000). New operational strategy for SBR technology for total nitrogen removal from industrial wastewaters highly loaded with nitrogen. *Water Science and Technology*. **41**(12), 85-93.
- Villaverde S. (2004). Recent developments on biological nutrient removal processes for wastewater treatment. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. **3**, 171-183.
- Vitousek P.M., Mooney H.A., Lubchenco J. y Melillo J.M. (1997a). Human domination of earth's ecosystems. *Science*. **277**, 494-499.
- Vitousek P.M., Aber J.D., Howarth R.W., Liekens G.E., Matison P.A., Schindler D.W. Schlesinger W.H. y Tilman D.G. (1997b). Human alteration of the global nitrogen cycle sources and consequences. *Ecological Applications*. **7**(3), 737-750.
- Wagner M., Rath G., Koops H-P., Flood J. y Amann R. (1996). In situ analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants. *Water Science and Technology*. **34**(1), 237-244.
- Wang W. (1984). Time response of *Nitrobacter* to toxicity. *Environment International*. **10**, 21-26.
- Ward M. H., de Kok T.M., Levallois P., Brender J., Gulis G., Nolan B. T. y Van Derslice, J. (2005). Workgroup report: drinking-water nitrate and health-recent findings and research needs. *Environmental Health Perspectives*. **113** (11), 1607-1614.
- Watson S.W., Bock E., Koops H.P. y Hooper A. (1989). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volumen 3. Editorial: The Williams and Wilkins, Baltimore. pp 1808-1834.
- Wei Y., Van Houten R.T., Borger A.R., Eikelboom D.H. y Fan Y. (2003). Minimization of excess sludge production for biological wastewaters treatment. *Water Research*. **37**, 4453-4467.

- Wetzstein H.G. y Ferguson R.J. (1985). Respiration-dependent proton translocation and the mechanism of proton motive force generation in *Nitrobacter winogradskyi*. *FEMS Microbiology Letters*. **30**, 87-92.
- Whiten K.W., Davis R.E., Peck M.L. y Stanley G.G. (2008). Química. 8va edición. Cengage Learning Editores S.A. Anexo A14.
- Winogradsky S. (1890). Recherches sur les organismes de la nitrification. *Annales de l'Institut Pasteur*. **5**, 257-275.
- Wrage N., Velthof G.L., van Beusichen M.L. y Oenema O. (2001). Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide. *Soil Biology & Biochemistry*. **33**, 1723-1732.
- Yamagishi T., Leite J., Ueda S., Yamaguchi F., Suwa Y. (2001). Simultaneous removal of phenol and ammonia by an activated sludge process with cross-flow filtration. *Water Research*. **35**, 3089–3096.
- Yamanaka T., Kamita Y. y Fukumori Y. (1981). Molecular and enzymatic properties of “Cytochrome aa₃” type terminal oxidase derived from *Nitrobacter agilis*. *The Journal of Biochemistry*. **89**, 265-273.
- Yang L. y Alleman J.E. (1992). Investigation of batchwise nitrite build-up by an enriched nitrification culture. *Water Science and Technology*. **26**(5-6), 997-1005.
- Zahn J.A., Arciero D.M., Hooper A.B. y DiSpirito A.A. (1996). Evidence for an iron center in the ammonia monooxygenase from *Nitrosomonas europaea*. *FEBS Letters*. **397**, 35-38.
- Zart D. y Bock E. (1998). High rate of aerobic nitrification and denitrification by *Nitrosomonas eutropha* grown in a fermentor with complete biomass retention in the presence of gaseous NO₂ or NO. *Archives of Microbiology*. **169**, 282-286.
- Zart D., Schmidt I. y Bock E. (2000). Significance of gaseous NO for ammonia oxidation by *Nitrosomonas eutropha*. *Antonie van Leeuwenhoek*. **77**, 49-55.
- Zepeda A., Texier A.-C. y Gómez J. (2003). Benzene transformation in nitrifying batch cultures. *Biotechnology Progress*. **19**, 789-793.

- Zepeda A., Texier A.-C., Razo-Flores E. y Gómez J. (2006). Kinetic and metabolic study of benzene, toluene and *m*-xylene in nitrifying batch cultures. *Water Research*. **40**, 1643-1649.
- Zepeda A., Texier A.-C. y Gómez J. (2007). Batch nitrifying cultures in presence of mixtures of benzene, toluene, and *m*-xylene. *Environmental Technology*. **28**, 355-360.
- Zhuang W-Q., Tay J-H., Yi S. y Tay S. T-L. (2005). Microbial adaptation to biodegradation of *tert*-butyl alcohol in a sequencing batch reactor. *Journal of Biotechnology*. **118**, 45–53.
- Zumft W.G. (1992). The denitrifying prokaryotes. En: The prokaryotes a handbook of the biology of bacteria: Ecophysiology isolation identification applications. 2da edición, volumen. 1. Editorial: Springer-Verlag, New York. pp 554-582.

Justificación

2. Justificación

La escasez del agua en las grandes ciudades, obliga a los gobiernos a implementar tecnologías para limpiar el agua contaminada para su posible reutilización o descarga en cuerpos hídricos. Si las aguas residuales de origen industrial no son tratadas, pueden ocasionar problemas graves al ambiente y al ser humano. Ciertos tipos de efluentes industriales se caracterizan por tener amonio y compuestos fenólicos como contaminantes. Es importante contar entonces con tratamientos que puedan eliminar simultáneamente nitrógeno amoniacal y compuestos fenólicos. Los tratamientos fisicoquímicos presentan altas eficiencias de eliminación de amonio, no obstante son sistemas onerosos y en general sólo trasladan el contaminante de un lugar a otro. Contrastando, el tratamiento biológico por nitrificación-desnitrificación es una opción viable para eliminar nitrógeno amoniacal y fenoles del agua debido a su bajo costo y alta eficiencia. La nitrificación es considerada el paso limitante de este sistema, por lo tanto surge la necesidad de aumentar el conocimiento sobre el comportamiento de lodos nitrificantes en presencia de compuestos fenólicos. Particularmente en el caso del *p*-cresol, no hay muchos estudios y los existentes en la literatura generalmente omiten variables de respuesta como velocidades, eficiencias de consumo y rendimientos de producción que pueden ayudar a entender el comportamiento fisiológico de un consorcio nitrificante en presencia de *p*-cresol. Además, en estos estudios, no se ha caracterizado cinéticamente la capacidad de lodos nitrificantes para oxidar al *p*-cresol y sus intermediarios. Tomando en cuenta que al entender la nitrificación en presencia de *p*-cresol surge la posibilidad de mejorar el control del proceso, es pertinente realizar estudios básicos de tipo fisiológico en este tema.

Objetivos

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Estudiar y comprender el efecto del *p*-cresol sobre el metabolismo de un consorcio nitrificante.

3.2 Objetivos específicos

Evaluar en cultivos en lote:

- ◆ El efecto inhibitorio del *p*-cresol y *p*-hidroxibenzaldehído sobre el proceso respiratorio nitrificante.
- ◆ La capacidad de oxidación del *p*-cresol por el consorcio y la formación de sus intermediarios.
- ◆ La participación de la enzima amonio monooxigenasa en la oxidación del *p*-cresol.
- ◆ Evaluar en un reactor de lotes secuenciados, la capacidad de un consorcio nitrificante para oxidar simultáneamente amonio y *p*-cresol a través de los ciclos de operación.

Materiales y Métodos

4. Materiales y Métodos

4.1 Reactor nitrificante en continuo

Se utilizó un reactor nitrificante en continuo de tanque agitado (Microferm Fermentor, New Brunswick Scientific, mod. MF-114) con un volumen nominal de 10 L y un volumen de operación de 6 L como fuente de inóculo para los cultivos en lote y los reactores de lotes secuenciados. Se operó con una agitación de 300 rpm, un tiempo de residencia hidráulico de 1.8 d y una concentración de oxígeno disuelto promedio de $4.3 \pm 0.1 \text{ mg L}^{-1}$. El reactor fue operado a temperatura ambiente, mientras que el pH se mantuvo entre 7.5 y 8.5 y fue ajustado con HCl o NaOH. La Figura 8 esquematiza la configuración del reactor nitrificante en continuo.

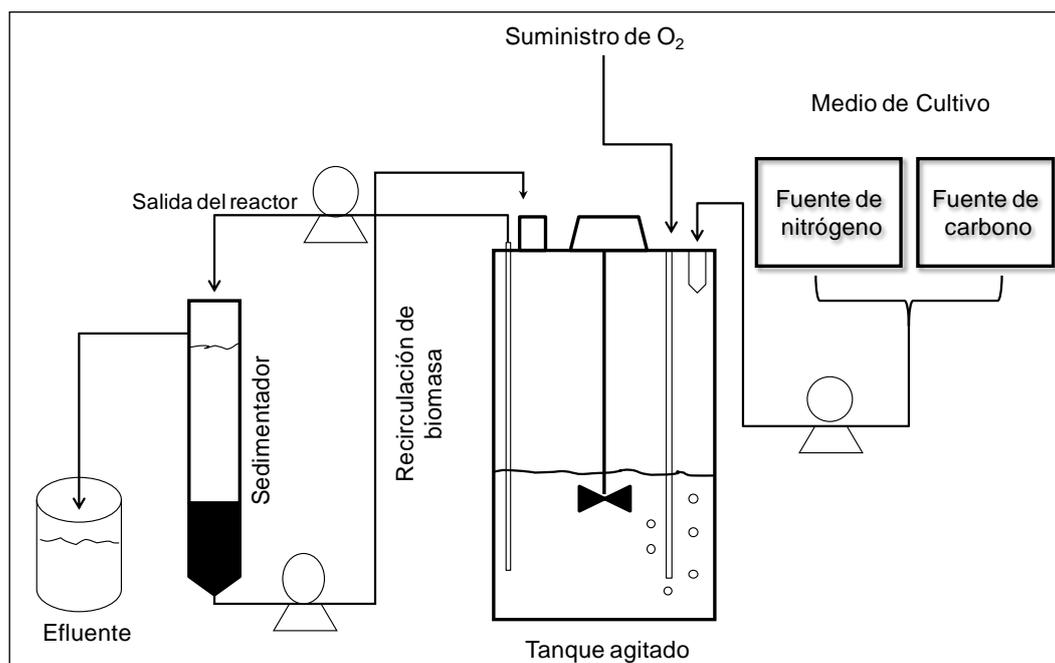


Figura 8. Esquema del reactor nitrificante en continuo.

La alimentación del reactor en continuo se realizó mediante dos medios de cultivo utilizados como fuentes de nitrógeno y carbono, suministrados por separado mediante una bomba peristáltica (Master-Flex, Cole-Parmer, cabezal 7518-00) para evitar la posible cristalización de sales. El flujo de alimentación fue de 1.77 y 1.57 L d⁻¹ para la fuente de nitrógeno y carbono, respectivamente. Todas las bombas peristálticas

fueron controladas por un temporizador que permitió su encendido durante 30 s cada 15 min. En la Tabla 5 se muestran los componentes de los medios de cultivo. De acuerdo con la composición de éstos, la relación másica C/N fue de 2.4 y se fijó una velocidad de carga de $145 \text{ mg N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Adicionalmente, se agregaron 30 mL de una solución al 5% de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Tabla 5. Composición del medio de cultivo para el reactor nitrificante en continuo.

Fuente de nitrógeno	Concentración	Fuente de carbono	Concentración
Composición de sales	(g L ⁻¹)	Composición de sales	(g L ⁻¹)
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.18	NaHCO ₃	9.33
NH ₄ Cl	0.94	CaCl ₂	0.05
KH ₂ PO ₄	1.40		
MgSO ₄	0.60		
NaCl	1.0		

El efluente del reactor se bombeó (Master-Flex, Cole Palmer, 7524-40) a un sedimentador acoplado al reactor. El sedimentador fue construido de acrílico con un diámetro de 8 cm por 92 cm de largo. De la parte inferior del sedimentador la biomasa fue recirculada hacia el tanque agitado (mediante una bomba Master-Flex, Cole Palmer, 7524-40), mientras que el efluente clarificado se recolectó de la parte superior (Figura 8). Con el fin de evaluar el desempeño del reactor nitrificante en continuo, se cuantificó el amonio, nitrito y nitrato en el efluente así como la proteína microbiana.

4.2 Cultivos en lote

Todos los cultivos en lote se hicieron en botellas serológicas de volumen nominal de 160 mL y un volumen de trabajo de 100 mL. Se realizaron cuatro series de cultivos en lote: control nitrificante (sin *p*-cresol ni *p*-hidroxibenzaldehído (*p*OHDO)), con adición de *p*-cresol, con adición de *p*-cresol y alitiourea (ATU), y con adición de *p*OHDO. Se realizaron controles con biomasa esterilizada (15 min a 12 psi) para verificar la posible adsorción del *p*-cresol en el material biológico o alguna parte del sistema. Adicionalmente, la oxidación química y volatilización fueron evaluadas empleando

cultivos en lote abióticos. El medio de cultivo para los lotes está descrito en la Tabla 6. Además, a cada botella se le adicionó 0.5 mL de una solución de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (5%). Las concentraciones iniciales de N-NH_4^+ y C-NaHCO_3 fueron 100 y 250 mg L^{-1} , respectivamente.

Tabla 6. Composición del medio de cultivo para los cultivos nitrificantes en lote.

Fuente de nitrógeno	Concentración	Fuente de carbono	Concentración
Composición de sales	(g L^{-1})	Composición de sales	(g L^{-1})
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.19	NaHCO_3	1.75
NH_4Cl	0.24	CaCl_2	0.01
KH_2PO_4	0.28		
MgSO_4	0.20		
NaCl	0.20		

El *p*-cresol y el *p*OHDO fueron adicionados por separado a 25 mg C L^{-1} . Se realizaron cultivos adicionales con *p*-cresol en presencia de ATU a 0.2 mM (25 mg L^{-1}). Se burbujeó oxígeno puro (99.6%) en la fase líquida de todos los cultivos por 2 min. Posteriormente, la biomasa fue resuspendida y las botellas selladas con tapones de goma y anillos de aluminio. A continuación, se burbujeó oxígeno puro en el espacio de cabeza (60 mL) por un periodo de 2 min y las botellas se colocaron en una incubadora (New Brunswick Scientific, mod. Innova 4230) a 300 rpm y 30°C de temperatura. La concentración inicial de proteína microbiana fue $134 \pm 18 \text{ mg L}^{-1}$ ($178 \pm 24 \text{ mg SSV/L}$). El pH inicial fue de 7.7 ± 0.2 . Cada botella fue sacrificada a diferentes tiempos y las muestras filtradas (0.45 μm) y analizadas para amonio, nitrito, nitrato, *p*-cresol, *p*OHDO, *p*-hidroxibenzoato (*p*OHTO) y carbono orgánico total. Todos los cultivos se llevaron a cabo al menos por duplicado.

4.3 Reactores de lotes secuenciados (SBR)

Con el fin de evaluar los cambios en la capacidad del lodo nitrificante para oxidar simultáneamente amonio y *p*-cresol en un sistema dinámico, se operaron dos

reactores de lotes secuenciados. El SBR1 fue utilizado como control y fue alimentado únicamente con un medio de cultivo nitrificante, mientras que el SBR2 fue además alimentado con *p*-cresol a diferentes concentraciones iniciales. Los reactores (Applikon, mod. p100) tuvieron un volumen de trabajo de 2 L (SBR1) y 1.7 L (SBR2). La agitación fue de 225 rpm (Applikon stirrer controller p100, mod. ADI 1012 y 1032). La aireación fue suministrada de manera constante por dos bombas de aire (Hagen, mod. Elite 800) para obtener una concentración promedio de $5.3 \pm 0.1 \text{ mg O}_2 \text{ disuelto L}^{-1}$. La concentración inicial de proteína fue de $185.9 \pm 3.0 \text{ mg proteína microbiana L}^{-1}$ ($253.2 \pm 4.0 \text{ mg SSV L}^{-1}$) y $201.4 \pm 3.0 \text{ mg L}^{-1}$ ($268.5 \pm 4.0 \text{ mg SSV L}^{-1}$) para el SBR1 y SBR2, respectivamente. La Figura 9 muestra un esquema de los SBR utilizados en este estudio.

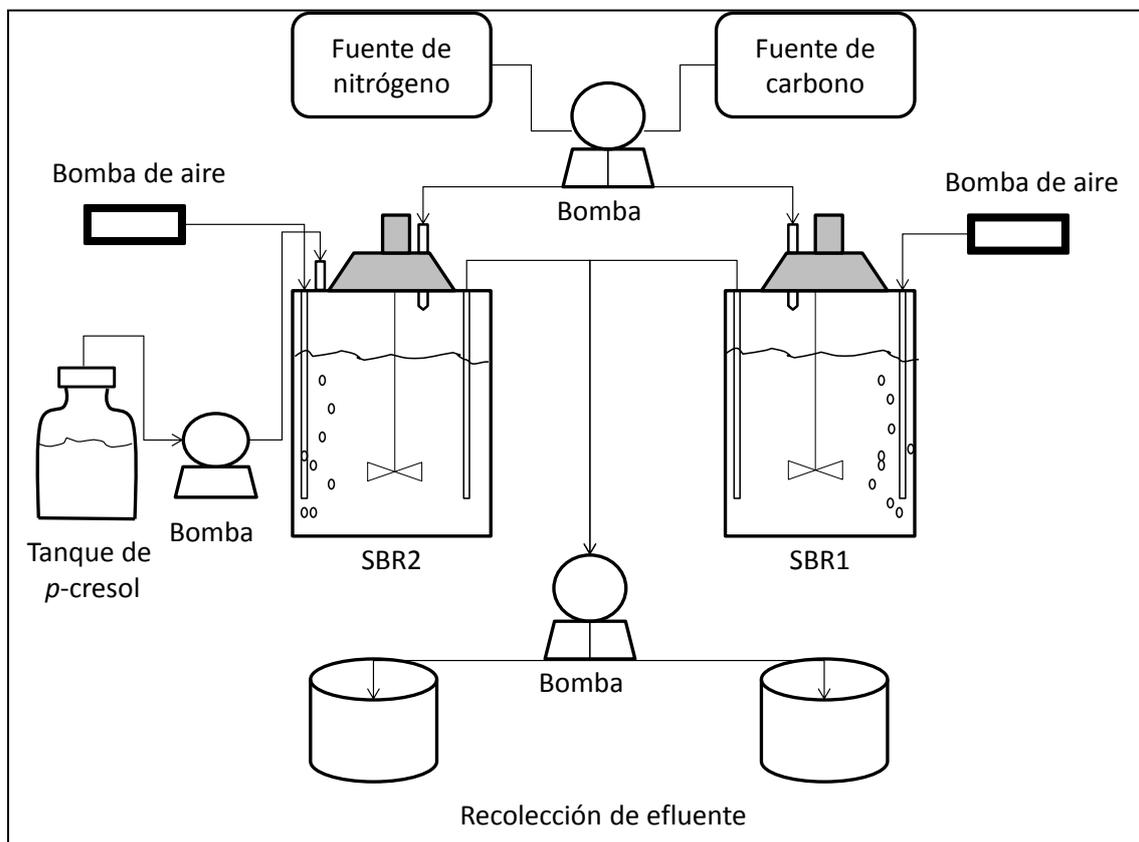


Figura 9. Esquema de los SBR nitrificantes.

Cada ciclo de los SBR tuvo una duración de 12 h dividido en cuatro etapas: llenado (13 min), reacción aerobia (11 h), sedimentación (30 min) y drenado (17 min). El medio de cultivo (Tabla 7) utilizado para ambos SBR fue una mezcla de dos medios como fuente de nitrógeno (A) y carbono (B). Los medios A y B fueron adicionados mediante bombas

peristálticas (Master-Flex, Cole-Parmer, cabezal 7518-00) a un flujo de 40 y 60 mL min⁻¹, respectivamente. La concentración inicial teórica de N-NH₄⁺ y C-NaHCO₃ para ambos reactores fue aproximadamente de 100 y 260 mg L⁻¹, respectivamente, resultando en una relación C/N de 2.6. Cabe señalar que para el SBR1, al principio de cada ciclo, se adicionó 1.6 L de medio de cultivo fresco a 0.4 L de lodo nitrificante sedimentado del ciclo anterior, de tal manera que al finalizar la etapa de sedimentación 1.6 L de efluente fueron drenados del reactor. Análogamente, al comienzo de sus ciclos el SBR2 fue alimentado con 1.4 L de medio y 0.1 L de solución de *p*-cresol, sumándose a 0.2 L de lodo sedimentado del ciclo anterior. Del SBR2 se drenaron 1.5 L de efluente al final de la sedimentación.

Tabla 7. Composición del medio de cultivo para los reactores de lotes secuenciados.

Fuente de nitrógeno	Concentración	Fuente de carbono	Concentración
Composición de sales	(g L ⁻¹)	Composición de sales	(g L ⁻¹)
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.54	NaHCO ₃	4.26
NH ₄ Cl	0.45	CaCl ₂	0.03
KH ₂ PO ₄	0.65		
MgSO ₄	0.50		
NaCl	0.50		

La alimentación, así como la aireación, el mezclado y el drenado de los SBR se controlaron automáticamente por temporizadores (Timers Sper Scientific mod. 810060). El *p*-cresol se adicionó a partir de una solución madre (548-4370 mg L⁻¹) a razón de 17 mL min⁻¹ durante 6 min para alcanzar las diferentes concentraciones iniciales de *p*-cresol dentro del SBR2 a los diferentes ciclos (Tabla 8).

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

Tabla 8. Concentraciones iniciales del *p*-cresol adicionado al SBR2.

Concentración de <i>p</i> -cresol (mg C/L)	Ciclos
0	0 – 105
25	106 – 159
50	160 – 225
100	226 – 295
200	296 – 322

4.4 Métodos analíticos

Para verificar la reproducibilidad y linealidad de los métodos analíticos utilizados en esta tesis, se realizaron al menos tres curvas de calibración para cada técnica analítica. En la Tabla 9, se muestran los coeficientes de correlación (R^2) y de variación (CV) de las pendientes correspondientes a las curvas de calibración de los diferentes métodos analíticos.

Tabla 9. Coeficientes de correlación y de variación de las pendientes correspondientes a las curvas de calibración realizadas por los diferentes métodos analíticos.

Análisis	Coefficiente de variación	Coefficiente de correlación
Amonio (electrodo selectivo)	6.1%	0.994 ± 0.017
Nitrito (HPLC)	4.5%	0.999 ± 0.001
Nitrato (HPLC)	4.2%	0.999 ± 0.001
Carbono orgánico total (TOC)	4.8%	0.993 ± 0.031
<i>p</i> -Cresol (HPLC)	2.4%	0.999 ± 0.024
<i>p</i> -Hidroxibenzaldehído (HPLC)	0.6%	0.999 ± 0.005
<i>p</i> -Hidroxibenzoato (HPLC)	2.0%	0.996 ± 0.020
Proteína microbiana (Lowry)	3.8%	0.991 ± 0.004

Todos los métodos presentaron un CV menor al 10%, lo cual indicó una aceptable reproducibilidad, mientras que los R^2 fueron mayores a 0.991, demostrando una respuesta lineal de los métodos.

4.4.1 Cuantificación de amonio

Se utilizó un electrodo de ión selectivo (pHoenix electrode Co. Mod. NH331501) para cuantificar el amonio disuelto en solución acuosa mediante su conversión a amoniaco. El principio del método se basa en desplazar el equilibrio del par $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ en solución acuosa mediante la alcalinización de las muestras. El electrodo selectivo cuenta con una membrana permeable al amoniaco. Por lo cual fue necesario alcalinizar todas las muestras a un volumen final de 50 mL con NaOH 10 N, bajo agitación constante y temperatura ambiente. El electrodo estuvo acoplado a un potenciómetro portátil (DigiSense, Cole-Parmer) que permitió la lectura del potencial (mV) cuando fue estable (aproximadamente 3 min después de adicionar el NaOH). Siempre que fue analizada una muestra se construyó una curva de calibración de N-NH_4^+ en un intervalo de concentraciones adecuado para cada muestra (entre 0 y 500 mg L^{-1}). El valor del potencial es proporcional al logaritmo de la concentración, cuyo valor puede ser calculado directamente de la ecuación de la recta (ecuación 16). La ecuación (17) fue utilizada para calcular la concentración de amonio en las muestras.

$$\text{Potencial} = m \logaritmo ([\text{NH}_4^+]) + b \quad (16)$$

$$[\text{NH}_4^+] = \text{antilog} \left(\frac{\text{Potencial} - b}{m} \right) \quad (17)$$

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

La Figura 10 muestra un ejemplo de las curvas de calibración empleadas para determinar amonio.

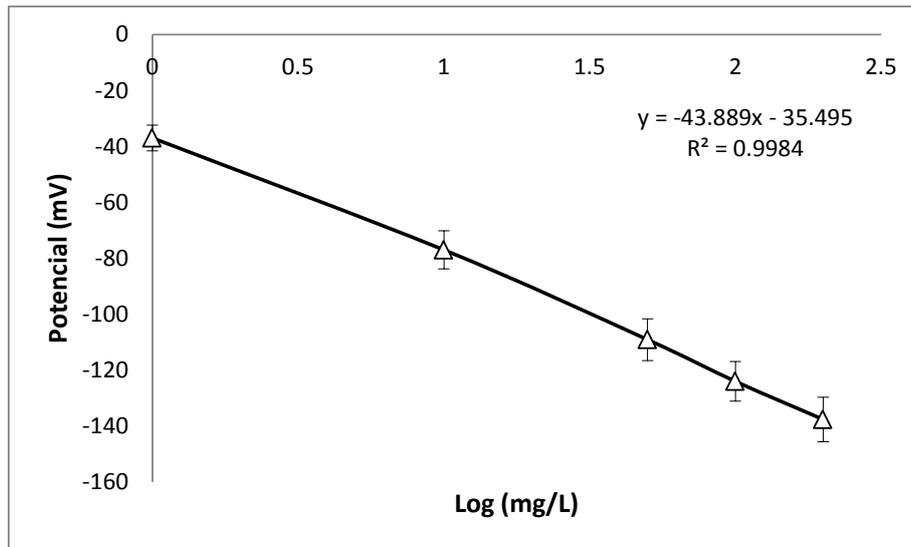


Figura 10. Curva de calibración para la cuantificación de amonio.

4.4.2 Cuantificación de nitrito y nitrato

La cuantificación de nitrito y nitrato se llevó a cabo por dos métodos: cromatografía de líquidos (HPLC, Perkin Elmer serie 200) y electroforesis capilar (Beckman Coulter, proteomeLab PA 800). En la cromatografía de intercambio iónico, la fase estacionaria es una resina de intercambio y la separación está gobernada por la fuerza de las interacciones entre los iones y los sitios de intercambio de la resina. Se utilizó una columna de intercambio iónico (IC-Pak anion HC, 4.6 x 150 mm) y un detector UV/VIS a una longitud de onda de 214 nm. La fase móvil estuvo compuesta de: 20 mL de *n*-butanol, 120 mL de acetonitrilo y 20 mL de solución borato-gluconato, llevados con agua desionizada a un volumen final de 1 L. La solución borato-gluconato fue preparada con 16 g de gluconato de sodio, 18 g de ácido bórico, 25 g de tetraborato decahidratado de sodio, 250 mL de glicerol y llevados a 1 L con agua desionizada. El flujo fue de 2 mL min⁻¹. Las muestras fueron filtradas (membrana de nylon, 0.45 μm) y colocadas en viales para su análisis. En cada corrida, se cuantificaron estándares de concentración conocida, o se establecieron curvas de referencia. La Figura 11 muestra un ejemplo de las curvas de calibración (0-100 mg N L⁻¹) utilizadas para verificar la linealidad del método.

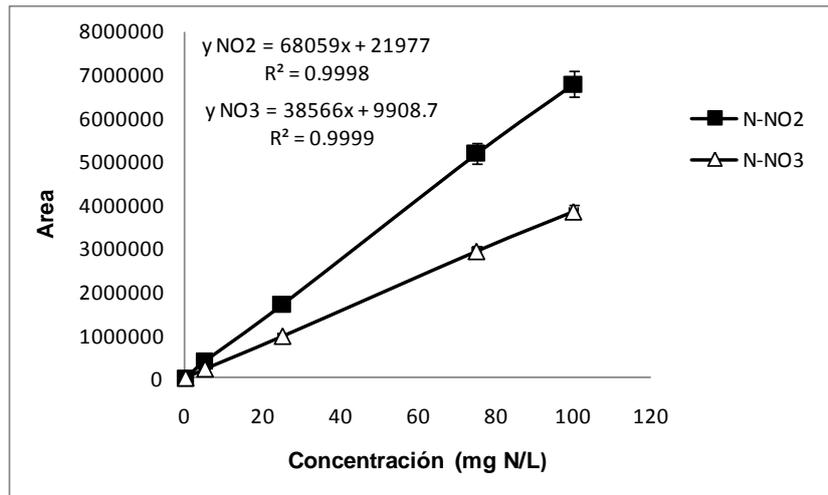


Figura 11. Curva de calibración para la cuantificación de nitrito y nitrato por HPLC.

La electroforesis capilar se basa en la migración de los iones en solución bajo la influencia de un campo eléctrico, hacia el electrodo con la carga opuesta a ellos. La fuerza conductora de una partícula está relacionada con su carga y la intensidad del campo eléctrico aplicado, así como la composición del electrolito, el cual funciona como el medio de separación que proporciona una resistencia (Weinberger, 1993). El equipo utilizado fue un analizador capilar de iones con un detector UV (arreglo de yoduros) y se trabajó a una longitud de onda de 240 nm. Las condiciones de operación fueron: voltaje de 12 KV, tiempo de corrida de 5.5 min y temperatura de 25°C. El capilar utilizado tiene un recubrimiento de sílica fundida de 60 cm de largo y 75 µm de diámetro interno. El electrolito se preparó tomando 5 mL de las siguientes soluciones: sulfato de sodio anhidro (0.1 M), cloruro de sodio (10 mM) y CIA Pak OFM anion-BT (Waters), finalmente se llevó a un volumen de 50 mL con agua desionizada. Las muestras fueron filtradas por una membrana de nylon (0.45 µm) y se realizaron diluciones para que las muestras no superaran los 50 mg N L⁻¹ al momento de ser analizadas. Para comprobar la linealidad del método, se construyeron curvas de calibración. La Figura 12 es un ejemplo de éstas.

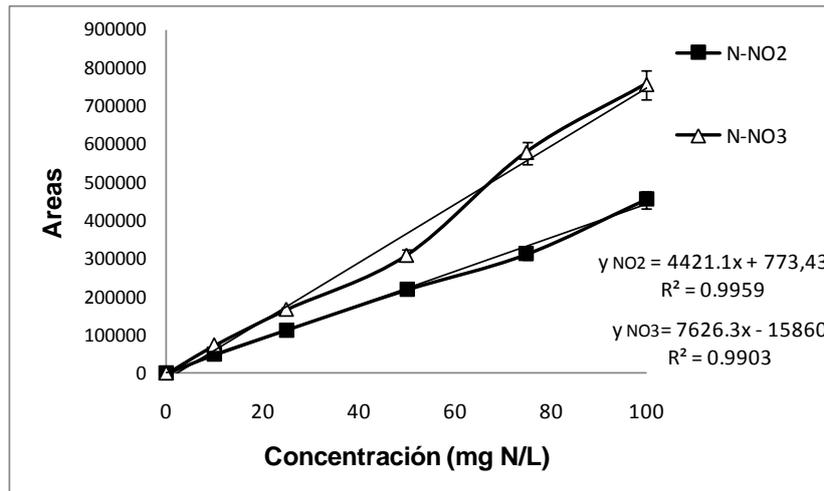


Figura 12. Curvas de calibración para la cuantificación de nitrito y nitrato por electroforesis capilar.

4.4.3 Cuantificación de carbono orgánico total

Se utilizó un analizador de carbono orgánico total (Shimadzu, TOC-V CSN) para cuantificar el carbono orgánico e inorgánico en las muestras. El equipo determina por separado el carbono total e inorgánico y por diferencia de éstos se calcula la concentración de carbono orgánico. Para determinar carbono total, la muestra es acarreada por aire de alta pureza hacia un tubo de combustión que contiene un catalizador y está a 680⁰C. El carbono es oxidado a CO₂ en el tubo de combustión. Posteriormente, el gas es secado y enfriado para ser detectado con un analizador infrarrojo, cuya área es calculada por un procesador de datos. El área es proporcional a la concentración de carbono total en la muestra. El principio del método se basa en la propiedad de absorción de radiación infrarroja que presenta el CO₂. Para cuantificar carbono orgánico, la muestra es previamente acidificada y sometida a burbujeo con el gas acarreador de tal manera que el carbono inorgánico como el bicarbonato y carbonato sea eliminado en forma de CO₂. Finalmente, la muestra es analizada de manera similar al carbono total. Para la determinación de la concentración de carbono en las muestras, se hace uso de curvas de calibración (0-1000 mg C L⁻¹) almacenadas previamente en el equipo. El tratamiento de las muestras fue un centrifugado (4000 rpm durante 10 min) y un posterior filtrado (0.45 µm) previo a su análisis por el equipo. A continuación se muestra un ejemplo de las curvas de calibración de carbono

total (a partir de ftalato de sodio) y carbono inorgánico (a partir de bicarbonato y carbonato de sodio) (Figura 13).

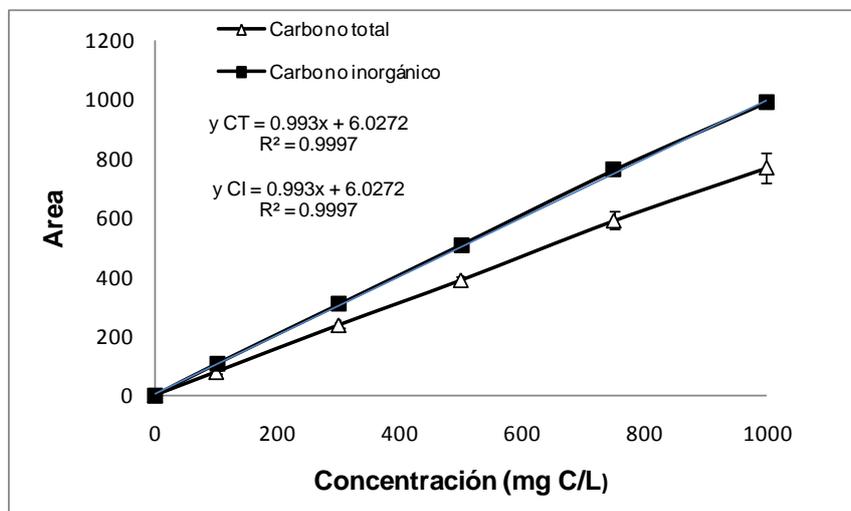


Figura 13. Curvas de calibración de carbono total y carbono inorgánico.

4.4.4 Cuantificación de *p*-cresol e intermediarios

La determinación de las concentraciones de compuestos fenólicos en las muestras se llevó a cabo por HPLC. De manera similar a la cuantificación de nitrito y nitrato, la separación de los compuestos fenólicos está determinada por la fuerza de las interacciones del *p*-cresol y sus intermediarios con los sitios de intercambio de la resina (fase estacionaria) que forma parte de la columna de separación, así como la composición de la fase móvil. Se utilizó un cromatógrafo de líquidos Perkin-Elmer series 200, empleando una columna Bondclone 10u C18 (Phenomenex, 300 x 3.9 mm). El equipo cuenta con un detector UV/VIS y se fijó la longitud de onda a 254 nm. La fase móvil fue una mezcla de acetonitrilo y agua (60:40 v/v) y se trabajó a un flujo de 1.5 mL min⁻¹ y un tiempo de corrida de 4 min. La inyección de muestra se hace por un automuestreador fijando el volumen de inyección en 20 µL. El tratamiento de las muestras consistió en un centrifugado (4000 rpm durante 10 min), el sobrenadante fue filtrado por una membrana de nylon (0.45 µm) para finalmente colocar 2 mL de muestra en cada vial. En cada corrida, simultáneamente con el análisis de las muestras, se cuantificaron estándares de concentración conocida o se establecieron curvas de

referencia. La Figura 14 es un ejemplo de las curvas de calibración construidas para la técnica de cuantificación de *p*-cresol, *p*-hidroxibenzaldehído (pOHDO) y *p*-hidroxibenzoato (pOHTO) por HPLC.

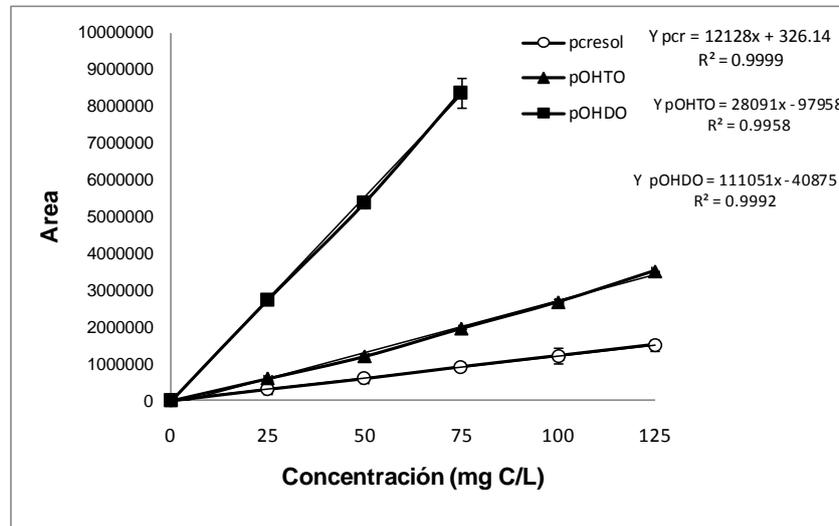


Figura 14. Curvas de calibración de *p*-cresol, *p*-hidroxibenzaldehído (pOHDO) y *p*-hidroxibenzoato (pOHTO) por HPLC.

4.4.5 Cuantificación de proteína microbiana

El método colorimétrico de Lowry (Lowry y col., 1951) fue utilizado para determinar la concentración de proteína microbiana en el reactor en continuo, los reactores de lotes secuenciados y los cultivos en lote. El método se basa en la reacción para formar un complejo Cu-proteína y la posterior reducción de este complejo por el reactivo de Folin-Ciocalteu, donde se obtiene un color azul en un ambiente alcalino (pH de 10). El reactivo de Folin-Ciocalteu (Hycl) está formado por molibdato, fosfato y tungstato de sodio y produce un máximo de absorción a 750 nm. Esta técnica requiere de proteínas que contengan péptidos con grupos fenólicos que puedan enlazarse con el Cu^{2+} . Para cada serie de muestras analizadas, se preparó una curva de calibración de albúmina (Sigma, 96-99%) de 0 a 300 mg L⁻¹. Las muestras y los estándares recibieron el mismo tratamiento. Se tomó 1 mL de muestra y se colocó en tubos de ensaye con tapa de rosca de 10 mL. Se adicionó 0.1 mL de NaOH (10 N). Posterior a la agitación mediante un vortex, se calentaron los tubos por 20 min a 90°C en un baño seco. Se necesitaron tres soluciones: (a) Na₂CO₃ 0.19 M en NaOH 0.1N, (b) CuSO₄ al 1% y (c)

tartrato de sodio y potasio al 2%. Se preparó una solución de trabajo (1 mL solución (b) + 1 mL de solución (c) + 48 mL de solución (a)) que fue posteriormente adicionada a cada tubo (5 mL). Se dejaron reposar los tubos por 30 min en la oscuridad. Posteriormente, se agregó 1 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu, dejando reposar nuevamente en la oscuridad por 1 h, para finalmente medir la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro UV/VIS (Shimadzu, mod. UV-1601). Todos los ensayos se realizaron por triplicado. La Figura 15 muestra un ejemplo de las curvas de calibración utilizadas en esta técnica.

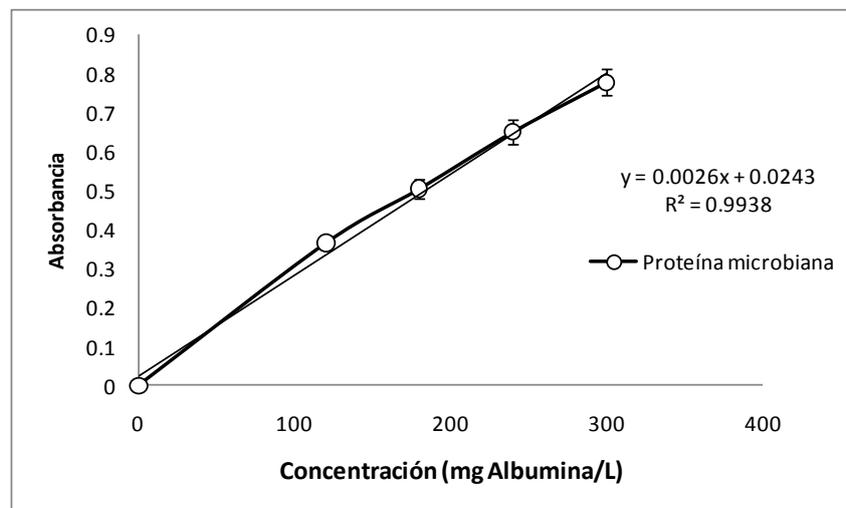


Figura 15. Curva de calibración para la cuantificación de proteína microbiana por el método de Lowry.

4.4.6 Determinación de oxígeno disuelto y pH

El oxígeno disuelto fue cuantificado mediante un medidor de oxígeno disuelto (Hanna, HI 98186) con un electrodo polarográfico (HI76407/4F). Este equipo tiene integrado un sensor de temperatura y un barómetro compensando automáticamente las lecturas de oxígeno disuelto. El pH fue medido mediante un medidor portátil (Digi-Sense, Cole Palmer) acoplado a un electrodo combinado de calomel y vidrio. Los medidores de oxígeno disuelto y pH fueron calibrados antes de realizar las mediciones experimentales de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

4.5 Variables de respuesta

Para evaluar el efecto de las variables independientes sobre el proceso respiratorio nitrificante, se utilizaron variables de respuesta que proporcionaron la información

global del proceso. Estas fueron la eficiencia, el rendimiento y las velocidades específicas. La eficiencia en el consumo de amonio (E_{NH_4} , %) se define como la capacidad del consorcio nitrificante para consumir su sustrato (Ecuación 18). La eficiencia puede proporcionar información sobre el consumo del sustrato. Por ejemplo eficiencias bajas de consumo podrían ser la consecuencia de problemas de transporte del sustrato a la célula y/o una disminución en la velocidad de la primera reacción enzimática involucrada en la oxidación del sustrato.

$$\text{Eficiencia} = \left(\frac{[\text{Sustrato inicial}] - [\text{Sustrato final}]}{[\text{Sustrato inicial}]} \right) (100) \quad (18)$$

El rendimiento de producción de nitrato (Y_{NO_3} , g N- NO_3^- /g N- NH_4^+ consumido) se define como la cantidad de nitrato formado a partir del amonio (sustrato) utilizado. La ecuación 19 se utilizó para determinar los rendimientos en nitrato y en biomasa (Y_{BM} , g N-biomasa/g N- NH_4^+ consumido). El rendimiento no posee unidades (cuando se utiliza el mismo elemento químico como base de cálculo) y su importancia como variable de respuesta radica en que puede proporcionar información sobre qué vías metabólicas predominan.

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{mg Producto formado}}{\text{mg Sustrato consumido}} \quad (19)$$

Para evaluar la parte cinética del proceso nitrificante en los cultivos en lote y reactores de lotes secuenciados, se determinaron las velocidades específicas de consumo de amonio (q_{NH_4}) y producción de nitrato (q_{NO_3}). La q_{NH_4} es la variable de respuesta del proceso amonio oxidante mientras que la q_{NO_3} es la variable de respuesta de la nitrito oxidación. El modelo logístico de Gompertz fue utilizado para analizar los datos cinéticos de los ensayos. En este modelo, la producción de nitrato o el consumo de amonio pueden ser expresados como una función del tiempo de acuerdo a la siguiente ecuación (20).

$$P = a \exp(-B \exp(-kt)) \quad (20)$$

Donde P es el producto del proceso nitrificante (mg N L^{-1}), a es la concentración máxima de producto (mg N L^{-1}) cuando $t \rightarrow \infty$; B es una constante relacionada con las condiciones iniciales (cuando $t = 0$, $P = a \exp(-B)$), mientras que k es la velocidad específica de producción (h^{-1}) y t el tiempo (h) (Acuña y col., 1999; Ramírez-Coutiño y

col., 2006). Los parámetros a, B, k fueron ajustados a partir de los datos experimentales usando el programa de análisis y construcción de gráficas Origin 8.0 (OriginLab Inc.). La velocidad máxima de consumo de amonio o producción de nitrato fue calculada a partir de estos parámetros que arroja el modelo de Gompertz y sustituyéndolos en la ecuación (21) (Draper y Smith, 1981).

$$V_{max} = 0.368ak \quad (21)$$

Mientras que para determinar si existió una fase de retardo en el cultivo, fue utilizada la ecuación 22.

$$Fase\ de\ retardo = B - \left(\frac{1}{k}\right) \quad (22)$$

Finalmente, las velocidades específicas se determinaron dividiendo las velocidades volumétricas (V_{max}) entre la concentración de proteína microbiana.

Para evaluar al reactor nitrificante en continuo, se realizó un balance de nitrógeno como se muestra en la ecuación 23.

$$Q_{N-NH_4^+} inicial = Q_{N-NH_4^+} final + Q_{N-NO_2^-} + Q_{N-NO_3^-} + Q_{N-Biomasa} \quad (23)$$

Donde Q se define como la velocidad volumétrica ($mg\ N\ L^{-1}\ d^{-1}$). Mientras que en los cultivos en lote y reactores de lotes secuenciados fueron realizados los siguientes balances de nitrógeno (ecuación 24) y carbono (ecuación 25).

$$[N - NH_4^+] inicio = [N - NH_4^+] final + [N - NO_2^-] + [N - NO_3^-] + [N - Biomasa formada] \quad (24)$$

$$[C - p-cresol] inicial + [C - CO_2] inicial + [C - HCO_3^-] inicial = [C - p-cresol] final + [C - HCO_3^-] final + [C - CO_2] final + [C - intermediarios] + [C - Biomasa formada] \quad (25)$$

Para estimar, tanto al nitrógeno como al carbono de biomasa en los balances, se cuantificó la proteína microbiana y se asumió que el 16% de la proteína microbiana es nitrógeno, el 50% de la biomasa es carbono (Bailey y Ollis, 1986) y 12% de la biomasa es nitrógeno (Ramalho, 1996).

En el caso del balance de carbono, es necesario mencionar que no se realizó la cuantificación experimental de CO_2 . Mediante la ecuación de Henderson-Hasselbalch (ecuación 26) se hizo una estimación de la concentración de CO_2 en la fase gaseosa de los cultivos en lote a partir del valor experimental de pH y la concentración de HCO_3^- en solución, medido como carbono inorgánico por el medidor de carbono orgánico

total. Se utilizó un valor de pKa del par ácido/base ($\text{H}_2\text{CO}_3/\text{HCO}_3^-$) de 6.35 (Harris, 2003). Se tomaron en cuenta un pH inicial de 7.7 ± 0.2 y final de 6.8 ± 0.3 .

$$pH = pK_a + \log \frac{[\text{base conjugada}]}{[\text{ácido}]} \quad (26)$$

Referencias

- Acuña M.E., Pérez F., Auria R., Revah S. (1999). Microbiological and kinetic aspects of a biofilter for the removal of toluene from waste gases. *Biotechnology and Bioengineering*. **63**(2), 175–184.
- Bailey J.E. y Ollis D.F. (1986). *Biochemical Engineering Fundamentals*. 2da edición. McGraw-Hill Internationals Editions. Singapore. pp 53-55.
- Draper N.R. y Smith H. (1981). *Applied Regression Analysis*. 2da edición. Editorial: John Wiley, New York. pp. 511.
- Harris D.C. (2003). *Análisis Químico Cuantitativo*. 3ra edición. Editorial:Reverté. Apéndice G pp. AP-13.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. y Randall R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. **193**, 265–275.
- Ramalho R.S. (1996). *Tratamiento de aguas residuales*. Editorial Reverté, Barcelona. pag 271.
- Ramírez-Coutiño L., Marín-Cervantes M.C., Huerta S., Revah S., Shirai K. (2006) Enzymatic hydrolysis of chitin in the production of oligosaccharides using *Lecanicillium fungicola* chitinases. *Process Biochemistry*. **41**, 1106–1110.
- Weinberger R. (1993). *Practical capillary electrophoresis*. Academic Press, San Diego CA. pp 6-7.

Resultados y discusión

5. Resultados y discusión

5.1 Reactor nitrificante en continuo

Para minimizar las posibles variaciones en los experimentos en lote ocasionadas por cambios en el metabolismo propio del consorcio, se utilizó un lodo nitrificante metabólicamente estable como inóculo. Para tal motivo, un reactor nitrificante en continuo fue operado y utilizado como fuente de inóculo. De acuerdo con el perfil nitrificante obtenido, hubo una conversión casi total de amonio a nitrato, con una producción de nitrito y una velocidad de descarga en amonio residual despreciables (Figura 16). Las velocidades volumétricas de carga de amonio y producción de nitrato permanecieron constantes con un coeficiente de variación menor al 10% (Tabla 10), indicando que el proceso respiratorio nitrificante se encontró bajo régimen estacionario. Bajo estas condiciones de operación, la E_{NH_4} fue de $99.5\% \pm 0.2$ y el Y_{NO_3} de 0.97 ± 0.05 g N- NO_3^- /g N- NH_4^+ consumido. La producción de biomasa fue baja ($Y_{BM} = 0.02 \pm 0.01$ mg N-biomasa producida mg^{-1} N- NH_4^+ consumido), lo cual sumado con el alto rendimiento de producción de nitrato alcanzado, indicó un proceso nitrificante desasimilativo. Lo anterior puede entenderse en términos de la limitada obtención de energía que puede alcanzar el proceso nitrificante, ya que de la oxidación total del NH_4^+ a NO_3^- sólo se podrían obtener máximo -348.8 kJ reacción $^{-1}$ (Beristain-Cardoso y col., 2009).

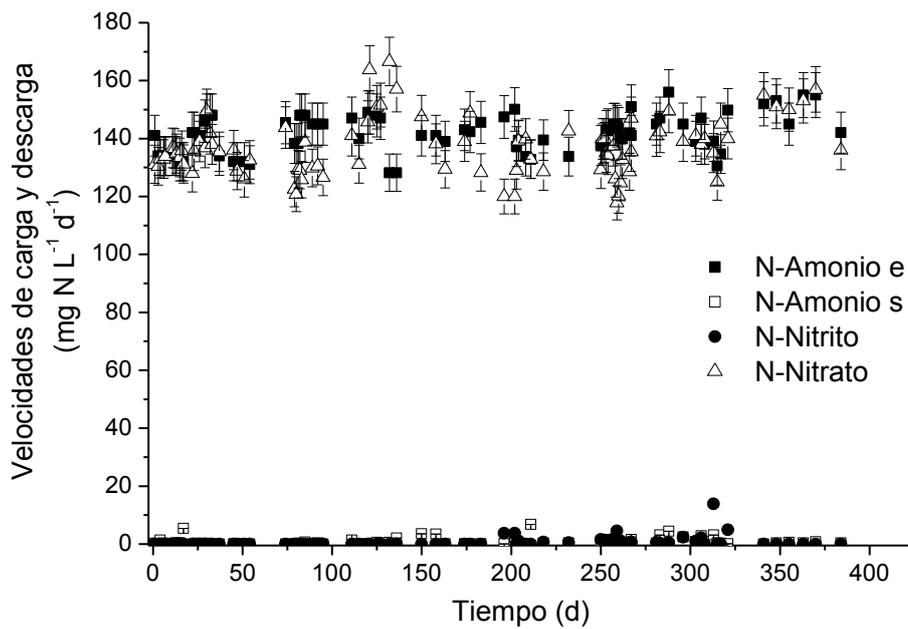


Figura 16. Perfil del reactor nitrificante en continuo.

Tabla 10. Velocidades de carga y descarga del reactor nitrificante ($\text{mg N L}^{-1} \text{d}^{-1}$).

Entrada ($\text{mg N L}^{-1} \text{d}^{-1}$)	Salida ($\text{mg N L}^{-1} \text{d}^{-1}$)			
	N-NH ₄ ⁺	N-NO ₃ ⁻	N-NO ₂ ⁻	N-BM
141.3 ± 6.6	0.7 ± 1.3	136.9 ± 9.9	0.6 ± 1.8	2.8 ± 0.1

5.2 Cultivos en lote

5.2.1 Efecto del *p*-cresol en cultivos nitrificantes en lote

Se realizaron cultivos nitrificantes en lote sin *p*-cresol como controles. En la Figura 17, se muestra el consumo de amonio y la producción transitoria de nitrito y final de nitrato. Los cultivos presentaron un cambio en el valor de pH de 7.7 ± 0.2 a 6.8 ± 0.3 en el transcurso de 24 h de incubación. La concentración inicial y final de oxígeno disuelto fue de 6.2 ± 0.2 y $5.3 \pm 0.2 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente. Después de 24 h, la E_{NH_4} fue de $95.5\% \pm 0.5$ y el Y_{NO_3} de 1.0 ± 0.1 , indicando que la nitrificación se llevó a cabo exitosamente bajo estas condiciones experimentales. No se observó una producción significativa de biomasa. De acuerdo con el modelo de Gompertz, las velocidades específicas de los procesos amonio y nitrito oxidantes fueron de $0.12 \pm 0.002 \text{ mg N-}$

NH_4^+ mg^{-1} proteína microbiana h^{-1} y $0.03 \pm 0.01 \text{ mg N-NO}_3^- \text{ mg}^{-1}$ proteína microbiana h^{-1} , respectivamente.

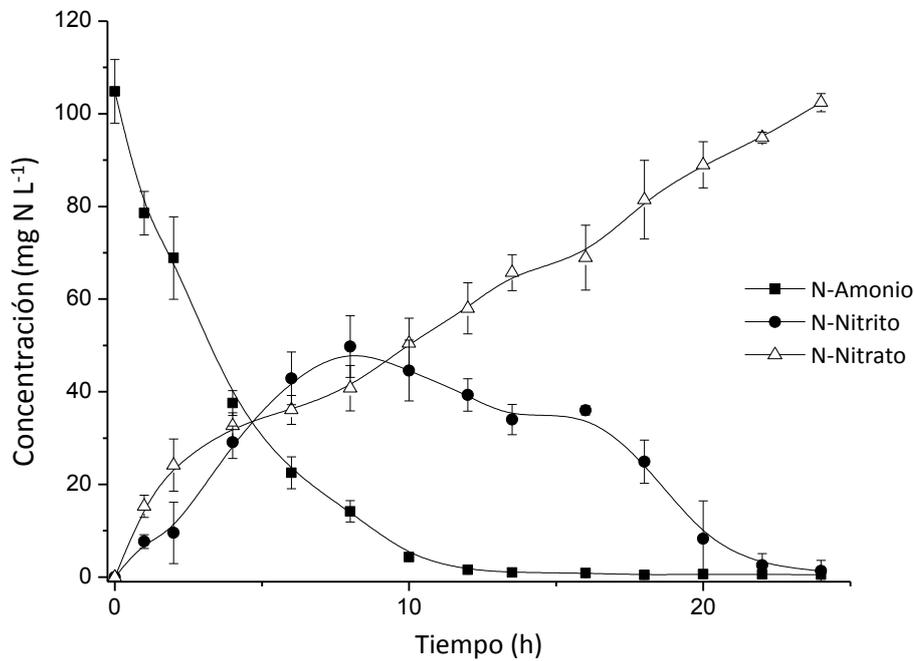


Figura 17. Perfil cinético del proceso nitrificante en cultivos en lote.

Posteriormente, se adicionó el *p*-cresol a los cultivos a una concentración de 25 mg C L^{-1} y se establecieron los perfiles cinéticos para N-NH_4^+ , N-NO_2^- y N-NO_3^- (Figura 18).

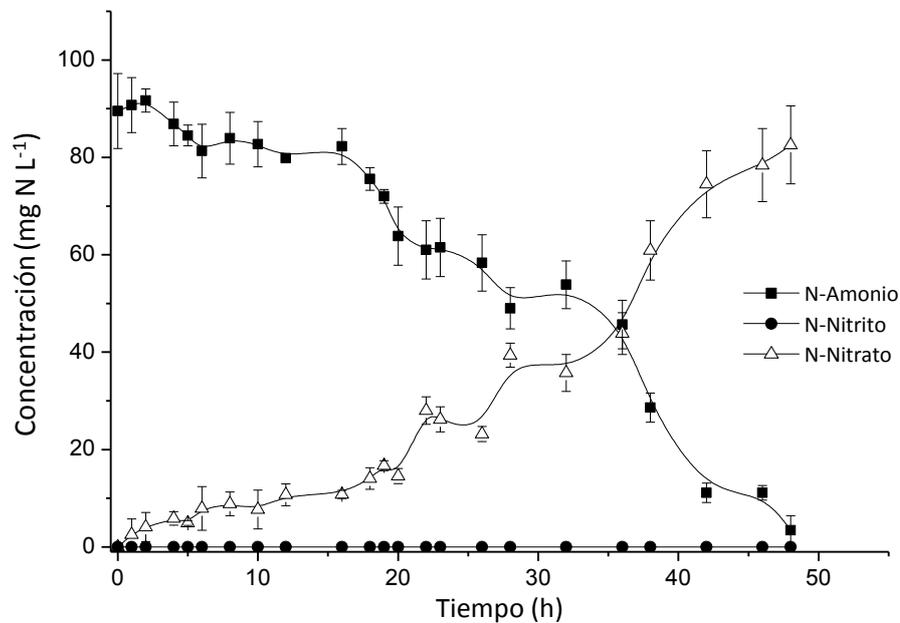


Figura 18. Perfil nitrificante en cultivos adicionados con *p*-cresol (25 mg C L^{-1}).

La adición del *p*-cresol provocó una drástica disminución en las velocidades específicas nitrificantes. q_{NH_4} y q_{NO_3} disminuyeron un 83 y 60%, respectivamente (Tabla 11).

Tabla 11. Velocidades específicas (mg N mg^{-1} proteína microbiana h^{-1}) y fase de retardo (λ) de los cultivos nitrificantes en lote en ausencia (control) o presencia de *p*-cresol.

	Consumo de amonio		Producción de nitrato	
	λ (h)	q_{NH_4} (mg N mg^{-1} proteína microbiana h^{-1})	λ (h)	q_{NO_3} (mg N mg^{-1} proteína microbiana h^{-1})
Control	0	0.12 ± 0.002	0	0.03 ± 0.01
Con <i>p</i> -cresol (25 mg C L^{-1})	16	0.02 ± 0.002 (-83%)	23	0.012 ± 0.001 (-60%)

Además, de acuerdo con el modelo de Gompertz, se presentó una fase de retardo (λ) en el consumo de amonio en las primeras 16 h de cultivo (Figura 18 y Tabla 11). No se detectó nitrito, lo cual indicó que la disminución en la velocidad específica de producción de nitrato fue principalmente causada por la disminución en la velocidad específica de oxidación de amonio a nitrito. Después de 48 h, el proceso nitrificante alcanzó una E_{NH_4} de $96\% \pm 9$ y un Y_{NO_3} de 0.95 ± 0.06 . Lo anterior demuestra que en presencia de *p*-cresol, los procesos amonio y nitrito oxidantes se llevaron a cabo exitosamente pero de manera más lenta. La vía metabólica nitrificante fue alterada solamente a nivel de su velocidad ya que el nitrato sigue siendo el principal producto de la vía. Estos resultados concuerdan con varios estudios, donde se indica que el proceso amonio oxidante es más sensible a la presencia de materia orgánica (Zepeda y col., 2003; Dokianakis y col., 2006; Texier y Gómez, 2007). Algunos autores han propuesto que el efecto inhibitorio de la materia orgánica sobre la nitrificación puede estar relacionado con una inhibición sobre la enzima AMO, la cual se considera posee habilidades para oxidar una amplia variedad de compuestos orgánicos (Keener y Arp, 1993, 1994; McCarty, 1999; Duddleston, 2002).

5.2.2 Oxidación del *p*-cresol por el cultivo nitrificante

Para verificar que no existiera una posible pérdida de *p*-cresol por adsorción, oxidación química o volatilización, se realizaron controles con biomasa estéril y abióticos. La pérdida de *p*-cresol bajo estas condiciones fue despreciable ya que fue menor al 7%. La Figura 19a muestra el perfil cinético de la oxidación del *p*-cresol por el consorcio nitrificante. El *p*-cresol fue rápida y totalmente consumido a una velocidad específica (q_{PCR}) de 0.17 ± 0.06 mg C mg⁻¹ proteína microbiana h⁻¹. El *p*-hidroxibenzaldehído (*p*OHDO) y *p*-hidroxibenzoato (*p*OHTO) fueron identificados y cuantificados como intermediarios transitorios en la oxidación del *p*-cresol. El *p*OHDO fue el más recalcitrante de los intermediarios con una acumulación en el cultivo de 7 h. Transcurridas 18 h, el *p*OHDO fue totalmente consumido. El *p*OHTO se presentó a una concentración baja a lo largo de las 18 h de cinética, para finalmente desaparecer a las 20 h de cultivo. Análogamente, se realizó la medición de carbono orgánico total (COT) a lo largo de las cinéticas, encontrándose una acumulación de éste a una concentración de 25 ± 1 mg L⁻¹ durante 7 h, coincidiendo con la acumulación de intermediarios. Posteriormente, la concentración de COT disminuyó hasta alcanzar un valor de cero a las 20 h. Estos resultados muestran que el consorcio nitrificante fue capaz de consumir completamente al *p*-cresol y sus intermediarios.

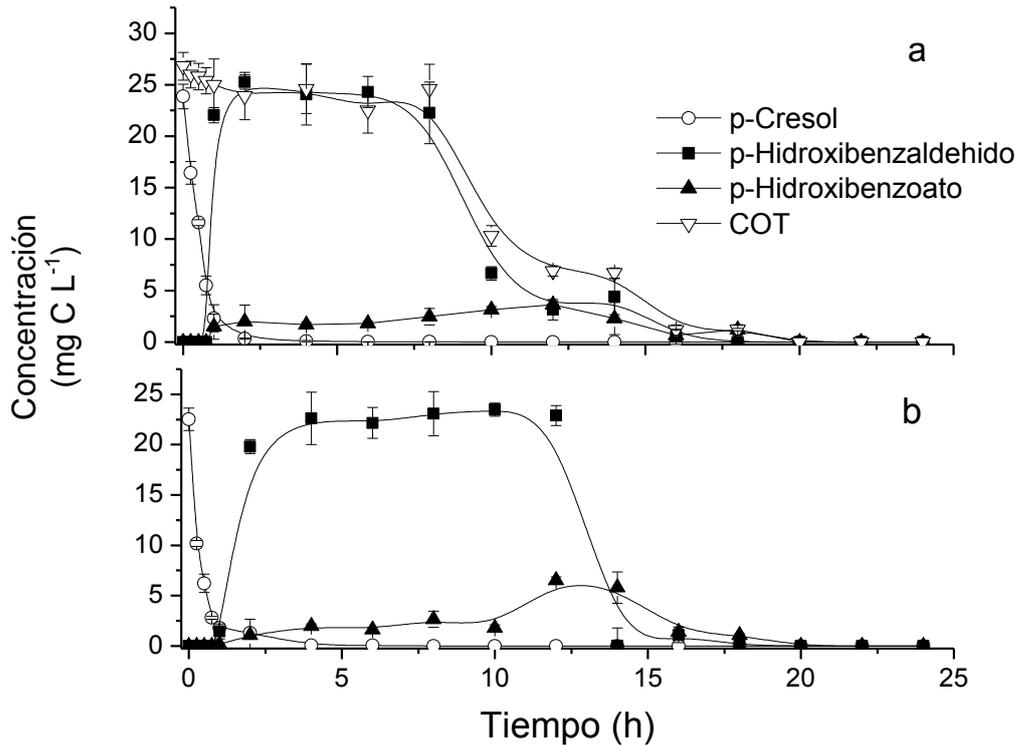


Figura 19. Oxidación del *p*-cresol por un consorcio nitrificante sin (a) y con (b) alilitiurea.

El balance de carbono se presenta en la Tabla 12. Cabe señalar que el crecimiento microbiano fue despreciable durante las 24 h de cultivo, lo que indica que el *p*-cresol fue mayoritariamente mineralizado, lo cual confirma el bajo rendimiento de producción de biomasa ($Y_{BM} = 0.15 \pm 0.02$ mg C-biomasa mg⁻¹ C-*p*-cresol consumido).

Tabla 12. Balance de carbono en los cultivos nitrificantes (24 h) adicionados con *p*-cresol.

Concentración inicial (mg C L ⁻¹)				Concentración final (mg C L ⁻¹)				
<i>p</i> -Cresol	CO ₂ *	HCO ₃ ⁻	BM	<i>p</i> -Cresol	Intermediarios	CO ₂ *	HCO ₃ ⁻	BM
23.9 ± 0.8	11.1 ± 0.2	222 ± 5.1	103.8 ± 10	0	0	67.6 ± 6	190.5 ± 13.2	107.5 ± 10

* Concentración teórica calculada a partir de los valores experimentales de pH y de concentración en HCO₃⁻, y utilizando la ecuación de Henderson-Hasselbalch.

Keener y Arp (2004) observaron la transformación de compuestos aromáticos como el *p*-cresol por *Nitrosomonas europaea* (Tabla 3), dando origen a productos más

oxidados, los cuales fueron acumulados en el medio de cultivo, es decir, no ocurrió un rompimiento del anillo bencénico. Estudios previos señalaron que células de *N. europaea* fueron capaces de oxidar benceno a fenol y posteriormente a hidroquinona (Hyman y col., 1985; Keener y Arp, 1994). Los autores sugirieron que la enzima AMO podría catalizar la oxidación del benceno. En estos estudios, no se observó el rompimiento del anillo aromático del benceno por el cultivo. En contraste, Zepeda y col. (2003, 2006) señalaron que un consorcio nitrificante fue capaz de oxidar benceno, *m*-xileno y tolueno hasta ácidos grasos volátiles. Zepeda y col. (2003) propusieron que la oxidación de benceno hasta acetato vía fenol, podría haberse llevado a cabo con la participación conjunta de las microfloras nitrificantes y heterótrofas que coexisten en el consorcio nitrificante. Los autores llegaron a esta conclusión argumentando que con base en los antecedentes en la literatura, las bacterias amonio oxidantes pudieron iniciar la oxidación del benceno a fenol y posteriormente otras bacterias presentes en el consorcio continuarían la oxidación del fenol hasta acetato. En el consorcio nitrificante utilizado en el presente trabajo, es posible también que se diera una participación conjunta de las microfloras nitrificantes y heterótrofas para alcanzar la mineralización del *p*-cresol.

Los resultados del presente estudio sugieren que la oxidación del *p*-cresol por el consorcio nitrificante sigue la misma vía metabólica propuesta por varios autores, ya sea en condiciones aerobias o anaerobias, que consiste en la formación secuencial de *p*-hidroxibenzilalcohol (*p*OHOL), *p*OHDO y *p*OHTO (Hopper y Taylor, 1975; Bossert y col., 1989; Häggblom y col., 1990). Häggblom y col. (1990) sugirieron que existe una ruta universal para los pasos iniciales de la oxidación del *p*-cresol donde el aceptor final de electrones puede ser el oxígeno, nitrato, sulfato o dióxido de carbono. Se ha reportado para bacterias aerobias y desnitrificantes que el *p*-cresol es oxidado por la enzima *p*-cresol metilhidrolasa (PCMH) a *p*OHOL y *p*OHDO, el cual es nuevamente oxidado a *p*OHTO por una deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ (Rudolphi y col., 1991; Yadav y col., 2005). Estudios con oxígeno marcado (¹⁸O) realizados por Hopper (1978) demostraron que el oxígeno que utiliza la PCMH para oxidar el grupo metilo del *p*-cresol proviene del agua, de tal manera que el oxígeno molecular únicamente sirve como aceptor final de electrones y no como un reactivo en la primera reacción de la

ruta. Bajo las condiciones aerobias utilizadas en este estudio es muy probable también que la oxidación del grupo metilo se llevara a cabo por medio de oxigenasas. De hecho, algunas de las enzimas involucradas en la oxidación de compuestos aromáticos como el *p*-cresol por vía aerobia son monooxigenasas y dioxigenasas (Harayama y Kok, 1992; Harwood y Parales, 1996). Estudios previos mostraron que la bacteria amonio oxidante *Nitrosomonas europaea* fue capaz de oxidar un amplio intervalo de hidrocarburos aromáticos y no aromáticos y se cree que la enzima AMO estuvo participando (Hyman y col., 1985; Rasche y col., 1990; Chang y col., 2002; Yi y Harper, 2007; Rho y col., 2009). En particular, Keener y Arp (1994) señalaron que el tolueno fue oxidado a bencil alcohol y benzaldehído por un cultivo puro de *N. europaea* y estas transformaciones sólo fueron llevadas a cabo por células con la AMO activa. Lo anterior indicó que la AMO estaría involucrada en la oxidación del grupo metilo (-CH₃) unido al anillo bencénico. Estos autores también observaron que el *p*-cresol fue cuantitativamente convertido a *p*OHDO vía *p*OHOL por *N. europaea*, pero con la AMO inactiva (se utilizó al acetileno como inhibidor selectivo). Los resultados experimentales de Keener y Arp (1994) señalaron que enzimas distintas a la AMO en *N. europaea* oxidaron el grupo metilo del *p*-cresol.

El conjunto de estos resultados indica la posibilidad de que diferentes vías metabólicas pudieron estar involucradas en la oxidación del *p*-cresol por el consorcio nitrificante utilizado en el presente estudio. De hecho, los consorcios microbianos tienen la ventaja de presentar una amplia capacidad metabólica con una gran diversidad en su material enzimático.

5.2.3 Oxidación del *p*-cresol por cultivos tratados con *alitiourea*

De acuerdo con los resultados presentados en la sección anterior, podría ser que las bacterias amonio oxidantes estuvieron involucradas en la oxidación del *p*-cresol. Sin embargo, no se puede distinguir si fueron las bacterias amonio oxidantes o las heterótrofas las que oxidaron inicialmente al *p*-cresol. Conocer esta información

podría contribuir a entender mejor el mecanismo mediante el cual el *p*-cresol inhibió la nitrificación.

Para determinar si la enzima AMO estuvo involucrada en la oxidación del *p*-cresol por el lodo nitrificante, se utilizó la alitiourea (ATU) como un inhibidor selectivo de la AMO (Bedard y Knowles, 1989; Ginestet y col., 1998). En primera instancia, se verificó que la adición de ATU (25 mg L⁻¹) provocara una inhibición de la amonio oxidación estable y completa durante 24 h de incubación, resultando en una E_{NH₄} de 1.7 ± 1.1% y un Y_{NO₃} de 0.97 ± 0.05, lo cual indicó que sólo una mínima cantidad de amonio fue consumido y posteriormente oxidado hasta nitrato. Por lo tanto, la ATU inhibió la actividad amonio oxidante pero no así la nitrito oxidación. La Figura 18b muestra el perfil cinético de la biotransformación del *p*-cresol obtenido en cultivos tratados con ATU. Los resultados muestran que el *p*-cresol fue oxidado a *p*OHDO y *p*OHTO en un perfil muy similar a los obtenidos sin inhibidor de la AMO. Estos resultados sugieren que la AMO no estuvo involucrada en la oxidación del *p*-cresol por el consorcio nitrificante. Keener y Arp (1994) observaron que la mayoría de las transformaciones (benceno, tolueno, etilbenceno, *p*-xileno y estireno) por *N. europaea* fueron inhibidas por acetileno, un inactivador de la AMO. Sin embargo, los autores encontraron que el *p*-cresol fue oxidado por células tratadas con acetileno, indicando que en *Nitrosomonas europaea*, el *p*-cresol fue oxidado a *p*OHDO por una enzima o enzimas diferentes a la AMO. En el presente trabajo y con el consorcio nitrificante utilizado, parece ser que al igual que en los cultivos axénicos de *N. europaea* utilizados por Keener y Arp (1994), la oxidación del *p*-cresol no dependió de la actividad de la AMO. Estos resultados sugieren que la inhibición por el *p*-cresol sobre la actividad nitrificante del lodo no fue atribuible a un efecto de inhibición tipo competitiva sobre la enzima AMO como se ha mencionado en trabajos previos con otros compuestos aromáticos (Hockenbury y Grady, 1977; MacCarty, 1999).

5.2.4 Efecto del *p*-hidroxibenzaldehído en la nitrificación

El hecho de que al adicionar *p*-cresol, el proceso de amonio oxidación fue lento durante las primeras 16 h y simultáneamente en los mismos cultivos el *p*-cresol fue

totalmente consumido en menos de 2 h, mientras que el p OHDO se acumuló por 7 h, sugirieron que el p -cresol pudo no ser el responsable directo de la inhibición de la nitrificación pero sí el p OHDO. Cuando el p -hidroxibenzaldehído fue adicionado a los cultivos nitrificantes en lote, las q_{NH_4} y q_{NO_3} disminuyeron un 83 y 67%, respectivamente (Tabla 13). Las velocidades específicas disminuyeron en la misma proporción ya fuera con p -cresol o p OHDO adicionado, mostrando que el p OHDO pareciera ser el principal responsable de la inhibición de la nitrificación.

Tabla 13. Velocidades específicas ($mg\ N\ mg^{-1}\ proteína\ microbiana\ h^{-1}$) y fase de retardo (λ) de los cultivos nitrificantes en lote en ausencia o presencia de p -cresol o p -hidroxibenzaldehído.

	Consumo de amonio		Producción de nitrato	
	λ (h)	q_{NH_4}	λ (h)	q_{NO_3}
Sin compuesto aromático	0	0.12 ± 0.002	0	0.03 ± 0.01
Con p -cresol ($25\ mg\ C\ L^{-1}$)	16	0.02 ± 0.002 (-83%)	23	0.012 ± 0.001 (-60%)
Con p OHDO ($25\ mg\ C\ L^{-1}$)	27	0.02 ± 0.002 (-83%)	15	0.01 ± 0.001 (-67%)

Estos resultados pueden estar relacionados con las características químicas de los benzaldehídos. En algunos trabajos, se ha señalado que estos compuestos pueden alterar la permeabilidad de la membrana celular. Ramos-Nino y col. (1998) evaluaron el efecto de 11 diferentes benzaldehídos fenólicos sobre bacterias como *Listeria*, *Salmonella* y *Lactobacillus*. Los autores sugirieron que los benzaldehídos actúan fuera de la célula, y podrían reaccionar con los grupos sulfhidrilo (-SH) que se encuentran en la superficie celular de ciertas bacterias. Estos mismos autores argumentan que es probable que el enlace covalente del grupo carbonilo con el grupo sulfhidrilo fuera el mecanismo de la inhibición. Long y Ward (1989) estudiaron el efecto negativo del benzaldehído en *Saccharomyces cerevisiae*, observando que conforme aumentaba la concentración de benzaldehído disminuía el crecimiento, y en la máxima concentración ($3\ g\ L^{-1}$), se perdía la viabilidad de la levadura. Long y Ward (1989) manejan como hipótesis que la membrana celular funciona como una barrera contra el

benzaldehído, pero a altas concentraciones de éste, la membrana celular parece sufrir daños, permitiendo el paso del benzaldehído y pudiendo ocasionar un efecto negativo en las enzimas intracelulares. Sierra-Alvarez y Lettinga (1991) evaluaron el efecto inhibitorio de varios derivados del benceno, incluyendo al benzaldehído, en la producción de metano por un lodo metanogénico. Los autores señalaron que la inhibición causada por el benzaldehído estuvo relacionada con su coeficiente de partición octanol/agua, ya que al incrementarse la hidrofobicidad de un compuesto orgánico este puede permear más fácilmente a través de la membrana celular. Sin embargo, la inhibición en la metanogénesis por el benzaldehído no sólo se puede entender en términos de la hidrofobicidad de este compuesto, ya que debería de evaluarse la toxicidad que ocasiona el grupo funcional aldehído.

Como en el caso con *p*-cresol, en presencia de *p*OHDO, la vía metabólica nitrificante sólo fue alterada en su velocidad y transcurridas 75 h, la E_{NH_4} fue de $98.9\% \pm 0.1$ con un Y_{NO_3} de 1.0 ± 0.03 (Figura 20). Sin embargo, mientras el cultivo fue capaz de consumir totalmente el *p*-cresol en 2 h (Figura 19), el *p*-hidroxibenzaldehído se acumuló por 15 h antes de ser totalmente oxidado (Figura 21).

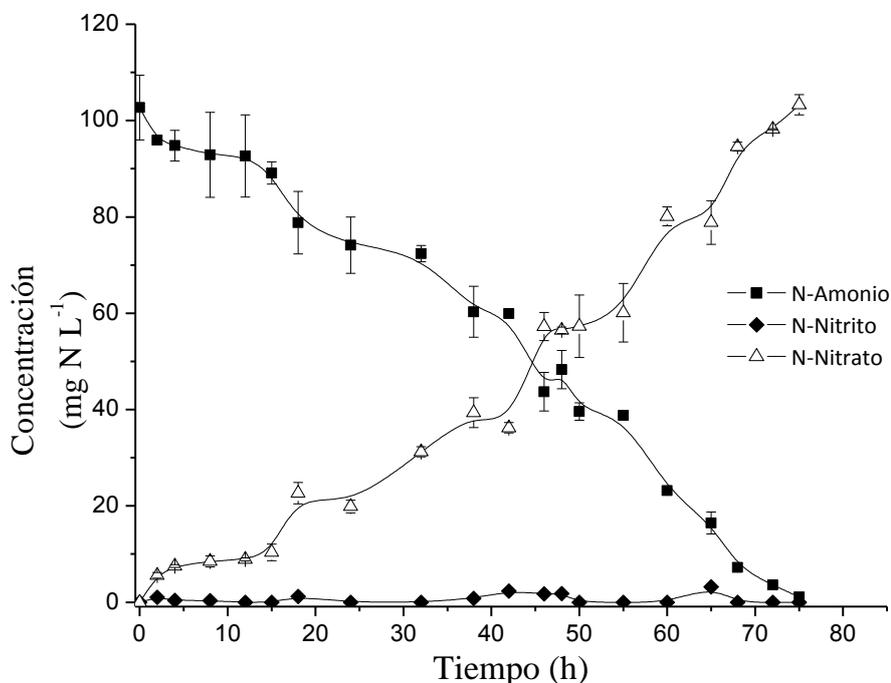


Figura 20. Perfil nitrificante con *p*-hidroxibenzaldehído adicionado (25 mg C L^{-1}).

La velocidad específica de consumo de *p*OHDO fue de $0.02 \pm 0.001 \text{ mg C-pOHDO mg}^{-1}$ proteína microbiana h^{-1} . Este valor es aproximadamente ocho veces menor que la

velocidad específica de consumo de *p*-cresol, sugiriendo que la oxidación de *p*OHDO fue el paso limitante en la mineralización del *p*-cresol por el consorcio nitrificante. O'Reilly y Crawford (1989) observaron que en un reactor de columna empacado con partículas de alginato, células inmovilizadas de *Pseudomonas sp* oxidaron *p*-cresol a *p*OHDO y finalmente *p*OHTO. Los autores determinaron las velocidades específicas de consumo de 2.6 mg *p*-cresol g⁻¹ de cama h⁻¹ y 0.93 mg *p*OHDO g⁻¹ de cama h⁻¹. Como en los resultados expuestos en esta tesis, O'Reilly y Crawford (1989) determinaron que la velocidad de oxidación de *p*-cresol fue mayor (casi 3 veces) que la velocidad de oxidación de *p*OHDO. Cabe señalar que las constantes de saturación (K_s) determinadas por los autores para el *p*-cresol y *p*OHDO fueron de 23.8 ± 4 mg *p*-cresol L⁻¹ y 7.7 ± 0.8 mg *p*OHDO L⁻¹, respectivamente. Las células presentaron una mayor afinidad para el *p*OHDO. Los resultados de O'Reilly y Crawford (1989) indicarían que no hay relación entre la afinidad y las velocidades específicas de oxidación. Sin embargo, habría que tomar estos datos con cautela. Sería interesante investigar más sobre la diferencia de afinidad del *p*-cresol y del *p*OHDO con el consorcio nitrificante.

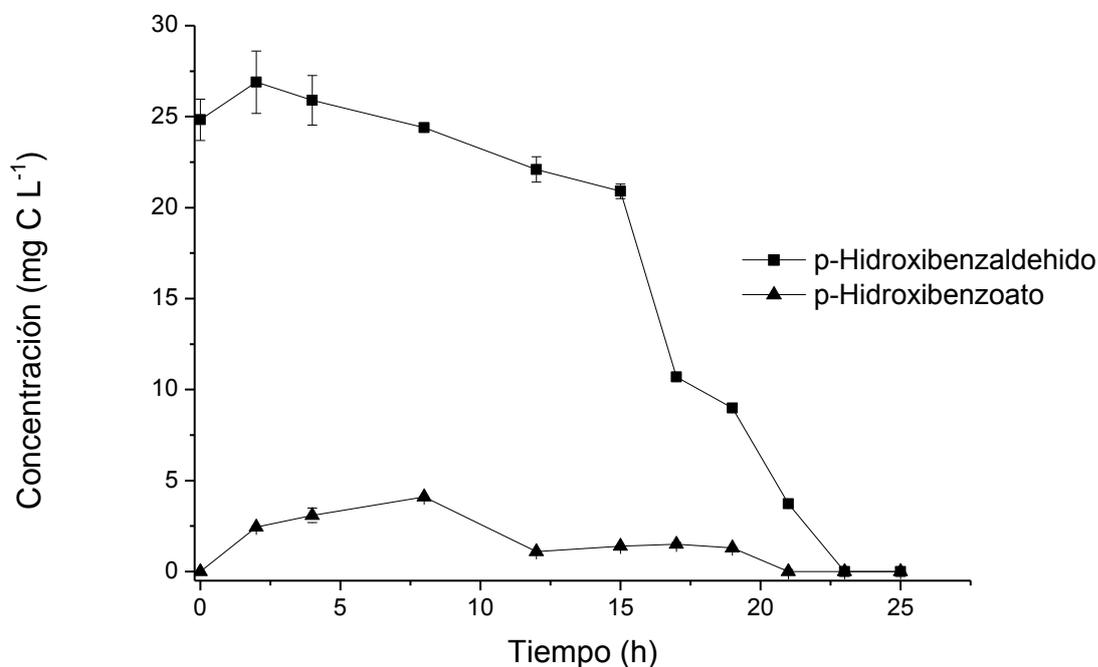


Figura 21. Oxidación del *p*-hidroxibenzaldehído por el consorcio nitrificante.

En el caso del presente estudio, el *p*OHDO presentó una fase de retardo en su consumo (Figura 21), lo cual podría sugerir que un efecto de inducción enzimática para

la enzima que oxida al *p*OHDO a *p*OHTO estuviera involucrado. De acuerdo con Whited y Gibson (1991), esta enzima es llamada *p*-hidroxibenzaldehído deshidrogenasa y ha sido aislada de *Pseudomonas mendocina*.

Los ensayos en lote realizados en la primera parte de este estudio permitieron llegar a varias conclusiones que contribuyen a entender mejor cómo un compuesto fenólico como el *p*-cresol puede afectar la nitrificación. Primero, se evidenció que la adición de *p*-cresol provocó un efecto inhibitorio sobre los procesos amonio y nitrito oxidantes, a través de los cambios en sus velocidades específicas respectivas. Sin embargo, fue interesante observar también que, a pesar de la disminución en su velocidad, la nitrificación pudo llevarse a cabo exitosamente con valores altos de eficiencia y rendimiento. Aunque nunca estuvo expuesto previamente al compuesto aromático, el consorcio nitrificante fue capaz de mineralizar al *p*-cresol. Se determinó que el verdadero compuesto responsable de la inhibición de la nitrificación fue el *p*OHDO y no el *p*-cresol en sí. La oxidación del *p*OHDO representa la etapa limitante en la mineralización del *p*-cresol por el lodo nitrificante y podría constituir el cuello de botella del proceso para una nitrificación sin inhibición. La AMO pareció no estar involucrada en la oxidación del *p*-cresol, indicando que la inhibición no fue del tipo competitiva sobre esta enzima. Muchas nuevas preguntas surgen al analizar estos primeros resultados. Por ejemplo, se puede reflexionar sobre la posible contribución de la microflora heterótrofa del consorcio en la oxidación del *p*-cresol e intermediarios. No queda claro tampoco cuál fue la razón verdadera del efecto inhibitorio del *p*OHDO en la nitrificación y a qué se debe su persistencia en el cultivo nitrificante.

En esta etapa del trabajo, se decidió enfocar el estudio sobre la capacidad metabólica del lodo nitrificante para oxidar simultáneamente amonio a nitrato y *p*-cresol a CO₂. Para ello, se prosiguió a estudios en un reactor nitrificante de lotes secuenciados alimentado con *p*-cresol para evaluar el cambio de la capacidad metabólica del consorcio a través de los ciclos de operación.

5.3 Reactor de lotes secuenciados

5.3.1 Efecto de la adición de *p*-cresol en la actividad de un lodo nitrificante en un reactor de lotes secuenciados

5.3.1.1 Reactor nitrificante control

Con el fin de evaluar la actividad nitrificante en el reactor de lotes secuenciados alimentado con *p*-cresol se mantuvo también en operación un SBR control sin adición de *p*-cresol. En la Figura 22, se presenta el desempeño de la actividad nitrificante del reactor control.

Se determinaron las concentraciones iniciales y finales en amonio a través de los ciclos de operación, obteniendo valores promedios de 100.3 ± 6.6 y 0.7 ± 2.2 mg N-NH₄⁺ L⁻¹, respectivamente. No hubo acumulación de nitrito (0.5 ± 1.6 mg N L⁻¹), mientras que la concentración final de nitrato fue de 96.6 ± 7.3 mg N L⁻¹. Los resultados anteriores confirman una actividad nitrificante estable a lo largo de más de 300 ciclos ya que las variaciones en las concentraciones fueron menores al 10%. La eficiencia y el rendimiento fueron de $98.1\% \pm 3.1$ y 0.94 ± 0.18 mg N-NO₃⁻ mg⁻¹ N-NH₄⁺ consumido, respectivamente. La alta conversión de amonio a nitrato y la baja producción de biomasa ($Y_{BM} = 0.003$ mg N-biomasa producida mg⁻¹ N-NH₄⁺ consumido) indicaron que el proceso fue principalmente desasimilativo.

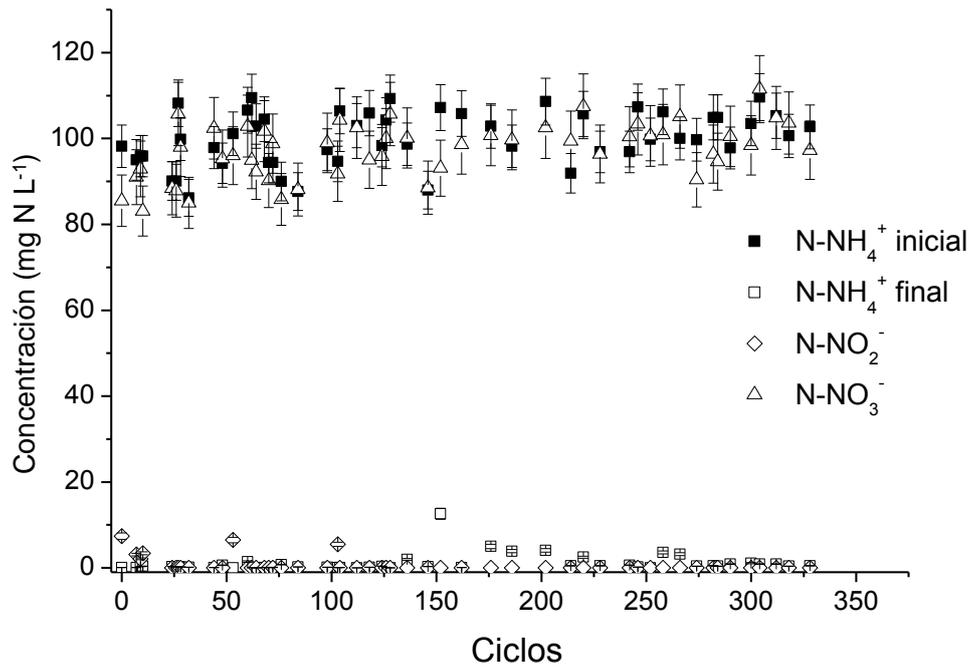


Figura 22. Perfil nitrificante del SBR sin adición de *p*-cresol.

En total, 10 cinéticas fueron realizadas durante el tiempo de operación del SBR nitrificante control. La Figura 23 representa un ejemplo de dos cinéticas realizadas al ciclo 1 (a) y 60 (b).

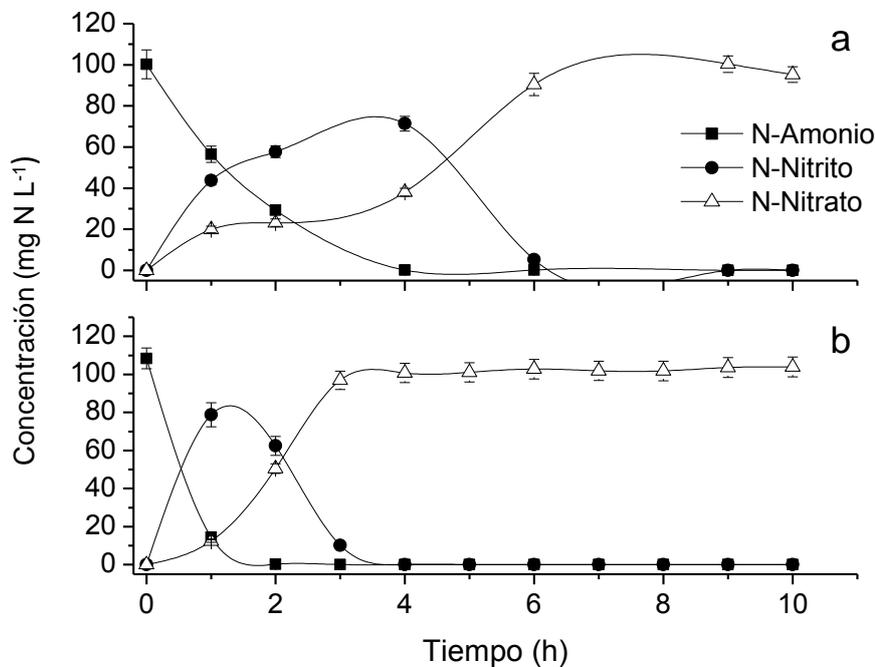


Figura 23. Perfiles nitrificantes a los ciclos 1 (a) y 60 (b) del SBR sin alimentación de *p*-cresol.

Se puede observar en ambas figuras el consumo de amonio, la formación transitoria de nitrito y la producción final de nitrato. Los perfiles muestran claramente un aumento en las velocidades específicas de consumo de amonio y producción de nitrato, así como una disminución en la acumulación de nitrito. Las q_{NH_4} y q_{NO_3} determinadas al ciclo 1 fueron de 0.10 ± 0.01 y 0.04 ± 0.01 mg N mg^{-1} proteína h^{-1} , respectivamente. Transcurridos 59 ciclos, las q_{NH_4} y q_{NO_3} aumentaron a valores de 0.21 ± 0.02 y 0.05 ± 0.01 mg N mg^{-1} proteína microbiana h^{-1} , lo cual representó un aumento de más del doble en la q_{NH_4} y de 25% para la q_{NO_3} . Estos incrementos en las velocidades específicas son el resultado de un aumento en la capacidad metabólica de las bacterias amonio y nitrito oxidantes para oxidar amonio y nitrito. Estos resultados tienen similitud con lo previamente señalado por Texier y Gómez (2004). Los autores mostraron mediante un estudio cinético en un SBR nitrificante que las velocidades q_{NH_4} y q_{NO_3} cambiaron con el número de ciclos y sugirieron que fue probablemente debido al incremento en la estabilidad fisiológica de las bacterias nitrificantes en vez de una modificación en la dinámica de población.

5.3.1.2 Reactor nitrificante alimentado con *p*-cresol

Respecto a la actividad nitrificante evaluada en el SBR alimentado con *p*-cresol, a pesar de la adición del compuesto fenólico, el desempeño del SBR no cambió significativamente (Figura 24).

La concentración promedio en amonio inicial fue de 100.4 ± 7.5 mg N L^{-1} , mientras que la del amonio residual permaneció alrededor de 0.9 ± 2.5 mg N L^{-1} . La acumulación de nitrito fue despreciable, mientras que al final de cada ciclo la concentración de nitrato alcanzó un valor promedio de 99.2 ± 3.9 mg N L^{-1} . Estos resultados mostraron que se conservó un pseudo estado estacionario nitrificante durante 5 meses de operación ya que la variación en las concentraciones fue menor al 10%. La eficiencia y el rendimiento alcanzados fueron de $99.0\% \pm 0.5$ y 0.98 ± 0.07 , respectivamente, confirmando que el *p*-cresol y sus intermediarios no tuvieron efecto en la actividad global nitrificante.

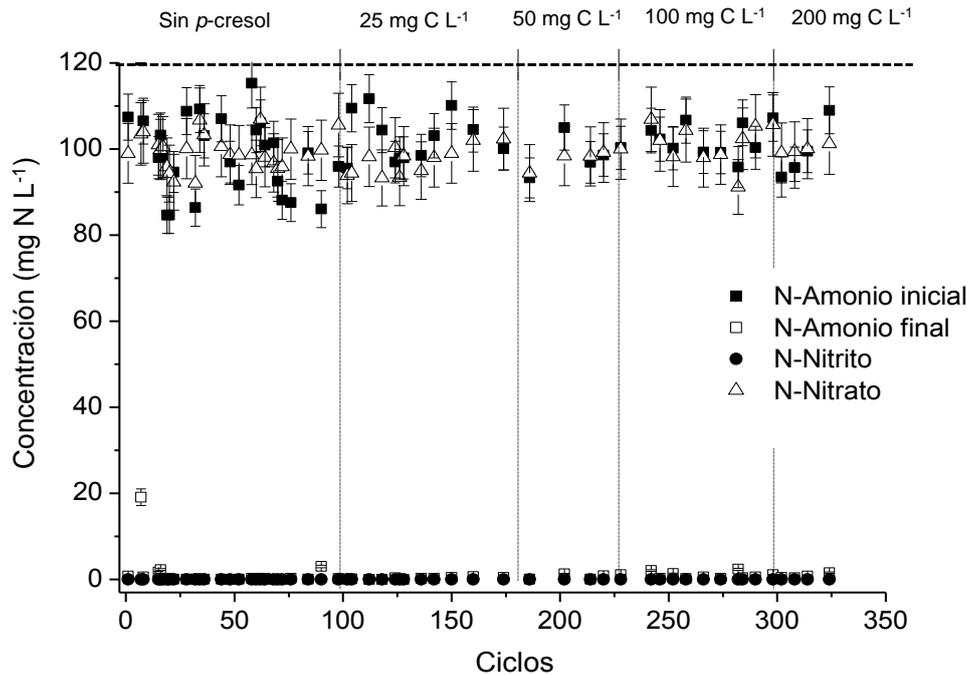


Figura 24. Desempeño del SBR nitrificante con adición de *p*-cresol.

Texier y Gómez (2007) trabajaron con un SBR nitrificante al cual se le evaluó su actividad y tolerancia a diferentes concentraciones de *p*-cresol. Los autores encontraron que, a la máxima concentración de 150 mg *p*-cresol L⁻¹ (300 mg *p*-cresol L⁻¹ d⁻¹), la eficiencia y el rendimiento nitrificantes se mantuvieron altos. En el presente estudio, se encontró que el SBR nitrificante toleró hasta 200 mg C L⁻¹ (equivalentes a 300 mg *p*-cresol L⁻¹) sin tener un efecto negativo en la actividad nitrificante. En términos de velocidad de carga volumétrica, el SBR nitrificante toleró hasta 600 mg *p*-cresol L⁻¹ d⁻¹, es decir el doble de lo que encontraron Texier y Gómez (2007). Cabe señalar además que las concentraciones de inóculo fueron diferentes en estos estudios, ya que Texier y Gómez (2007) inocularon con 250 ± 10 mg L⁻¹ de proteína microbiana, mientras que en este estudio se inoculó con 201 ± 3 mg L⁻¹. Amor y col (2005) trabajaron con un reactor en continuo inoculado con lodos activados, alimentado con amonio y fenol (14-1120 mg fenol L⁻¹ d⁻¹). Los autores encontraron altas eficiencias en el consumo de amonio y fenol, sin embargo el Y_{NO₃} sufrió una disminución, sugiriendo que parte del amonio consumido pudo ser asimilado por los heterótrofos, ya que los autores señalan un aumento significativo en la concentración de biomasa en el reactor. En comparación, en este trabajo, el Y_{NO₃} se mantuvo siempre alto (0.94 ± 0.18) demostrando que el producto principal de la vía nitrificante fue el

nitrito y como resultado de esto la producción de biomasa fue baja ($Y_{BM} = 0.01 \pm 0.001$ mg N-biomasa mg^{-1} N- NH_4^+ consumido). Un aspecto relevante de contar con procesos desasimilativos pero con una alta respiración es la baja producción de lodos. Wei y col. (2003) señalan que la excesiva producción de lodos en el tratamiento de aguas residuales aumenta los costos de operación y trae problemas ambientales e incluso de normatividad.

Al analizar de manera particular los procesos de amonio y nitrito oxidación para cada adición de *p*-cresol, se observó una tendencia a la disminución para las velocidades específicas de consumo de amonio y producción de nitrato (Tabla 14). La q_{NH_4} disminuyó conforme aumentó la concentración inicial de *p*-cresol. A 50 y 100 mg C L^{-1} de *p*-cresol adicionado, se observó una disminución del 38%, mientras que a 200 mg C L^{-1} , la inhibición alcanzó hasta un 62%, con respecto al control. Sin embargo, la tendencia no fue siempre clara, en particular para la nitrito oxidación. La magnitud de la q_{NO_3} fue la misma en la primera etapa sin *p*-cresol y con la adición de la máxima concentración del compuesto fenólico. Más datos cinéticos serían necesarios para evaluar con detalle el efecto de la adición de *p*-cresol sobre la velocidad de la nitrificación. Aún así, estos resultados parecen coincidir con los obtenidos previamente en cultivos en lote donde se mostró la inhibición de la nitrificación por la adición de *p*-cresol, con un mayor efecto sobre la amonio oxidación.

Tabla 14. Velocidades específicas de consumo de amonio y producción de nitrato a diferentes concentraciones iniciales de *p*-cresol en un SBR.

Concentración de <i>p</i> -cresol (mg C L^{-1})	q_{NH_4} (mg N mg^{-1} proteína microbiana h^{-1})	q_{NO_3} (mg N mg^{-1} proteína microbiana h^{-1})
0	0.08 ± 0.01	0.03 ± 0.003
25	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.01
50	0.05 ± 0.005	0.04 ± 0.005
100	0.05 ± 0.004	0.02 ± 0.002
200	0.03 ± 0.003	0.03 ± 0.002

5.3.2 Oxidación del *p*-cresol por un cultivo nitrificante en un reactor de lotes secuenciados

A partir de los resultados obtenidos en los cultivos en lote, se decidió realizar nuevos estudios cinéticos en un sistema dinámico, como lo es el reactor de lotes secuenciados. Este sistema permitió evaluar el comportamiento cinético del mismo lodo nitrificante cuando está expuesto a sucesivas y repetitivas adiciones de *p*-cresol. Esta parte del estudio se enfocó principalmente en caracterizar cinéticamente la capacidad del consorcio para consumir el *p*-cresol y sus intermediarios a través de los ciclos de operación.

El reactor de lotes secuenciados nitrificante fue alimentado con *p*-cresol en un intervalo de concentraciones de 0-200 mg C L⁻¹. El *p*-cresol fue consumido totalmente en el transcurso de las 11 h de reacción de cada ciclo, sin presentar ningún tipo de acumulación en el efluente (Figura 25).

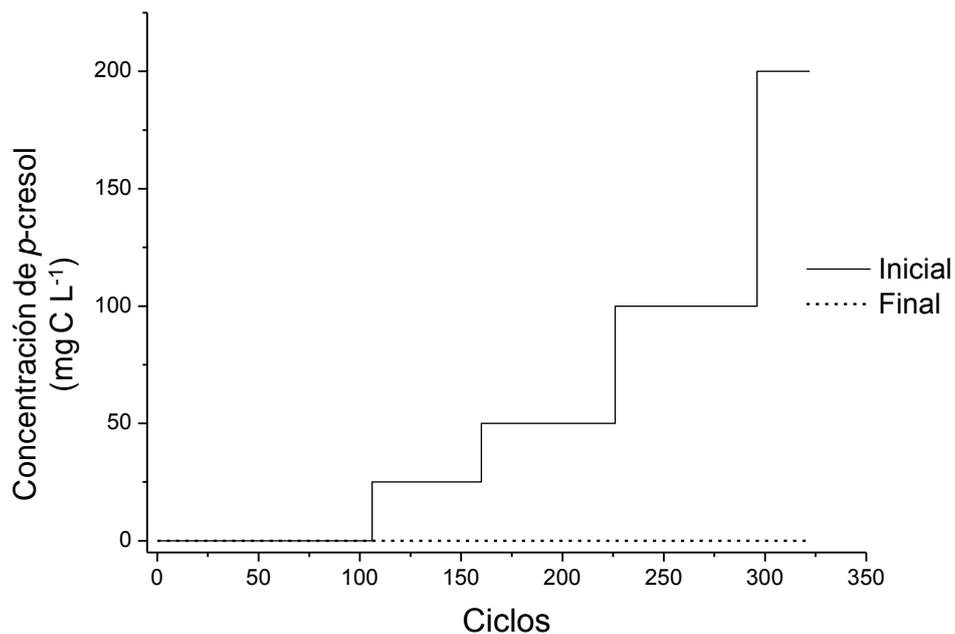


Figura 25. Concentraciones iniciales y finales de *p*-cresol a través de los ciclos de operación del SBR nitrificante.

Al igual que en los cultivos en lote, se identificaron al *p*OHDO y al *p*OHTO como los intermediarios de la oxidación del *p*-cresol. En la Figura 26, se presenta un ejemplo de las cinéticas obtenidas en el SBR al ciclo 132.

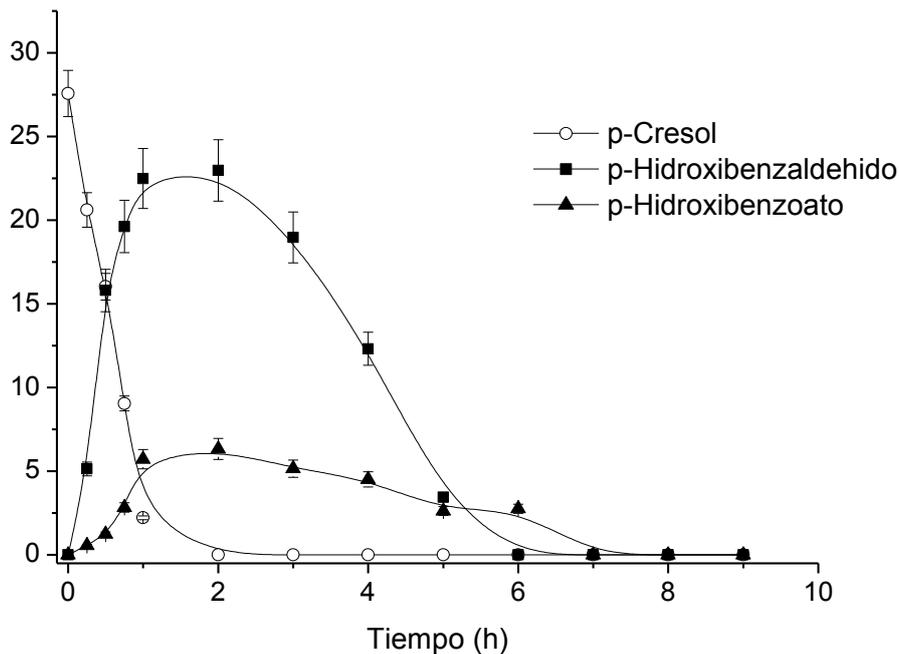


Figura 26. Perfil de oxidación del *p*-cresol (25 mg C L⁻¹) e intermediarios al ciclo 132.

En ninguna de las cinéticas de oxidación del *p*-cresol se presentó una fase de retardo en el consumo de éste. La aparición de una fase de retardo al adicionar un sustrato es una característica de los cultivos donde se induce la producción de una enzima no constitutiva. Esto podría sugerir que la enzima que catalizó la oxidación del *p*-cresol fuera constitutiva del consorcio ya que éste desde el inicio mostró tener la capacidad enzimática para oxidar el *p*-cresol.

De manera general, en el SBR nitrificante, se observó que la velocidad específica de consumo de *p*-cresol (q_{pcr}) aumentó conforme transcurrió el número de ciclos y se incrementó la concentración inicial del compuesto fenólico, hasta la concentración de 100 mg C L⁻¹ (Tabla 15). Cuando el *p*-cresol fue adicionado por primera vez a 200 mg C L⁻¹ (ciclo 296), la q_{pcr} sufrió una drástica disminución (92.5%), lo cual sugirió que esa concentración fue demasiado alta y alteró la capacidad del lodo para oxidar al *p*-cresol. Sin embargo, 32 ciclos después, la q_{pcr} aumentó nuevamente, lo cual señaló que la capacidad metabólica del consorcio nitrificante para oxidar *p*-cresol se incrementó a lo largo de los ciclos de operación del SBR.

Tabla 15. Velocidades específicas de consumo de *p*-cresol en un reactor nitrificante de lotes secuenciados.

Número de ciclos	Concentración inicial de <i>p</i> -cresol (mg C L ⁻¹)	Q _{pcr} (mg C- <i>p</i> -cresol mg ⁻¹ proteína microbiana h ⁻¹)
106	25	0.15 ± 0.02
160	50	0.31 ± 0.03
228	100	0.81 ± 0.10
296	200	0.06 ± 0.01
328	200	0.21 ± 0.02

Texier y Gómez (2007) evidenciaron que un sistema SBR permite la adaptación metabólica de los microorganismos responsables de la oxidación de *p*-cresol en un consorcio nitrificante. No obstante los autores no presentan datos cinéticos de la oxidación del *p*-cresol pero solamente del carbono orgánico total. En el estudio previo realizado en cultivos en lote (sección 5.2), se determinó que el consorcio producido bajo un régimen estacionario nitrificante fue capaz de oxidar el *p*-cresol a una velocidad específica de 0.17 mg C-*p*-cresol mg⁻¹ proteína microbiana h⁻¹. En el SBR nitrificante, las velocidades de oxidación de *p*-cresol alcanzadas fueron mayores (hasta 4.7 veces) que en un lote, demostrando que un sistema SBR puede incrementar la capacidad metabólica del lodo para oxidar al compuesto fenólico. Por ejemplo, Texier y Gómez (2004) previamente indicaron que, al realizar estudios cinéticos en un reactor nitrificante SBR, las velocidades específicas de consumo de amonio y producción de nitrato aumentaron conforme transcurrían los ciclos de operación. Estos autores estipularon que las condiciones estables y repetitivas del SBR pudieron dirigir un incremento en las velocidades específicas. Zhuang y col. (2005) evaluaron la adaptación microbiana en el consumo de *ter*-butil alcohol (TBA) en un SBR operado a 1 ciclo por día e inoculado con lodos activados provenientes de una planta de tratamiento de aguas residuales urbanas. Los autores observaron que el cultivo alcanzó una velocidad específica de consumo de TBA de 2.2 mg TBA g SSV⁻¹ h⁻¹ en el ciclo 94 y de 8.7 mg TBA g SSV⁻¹ h⁻¹ en el ciclo 152. Zhuang y col. (2005) indicaron que

las variaciones periódicas y secuenciales en las condiciones de operación del SBR pudieron seleccionar a las comunidades microbianas que presentaron una alta eficiencia en el consumo de TBA.

En el presente estudio, no está claro si el aumento en las velocidades de consumo de *p*-cresol a través de los ciclos podría estar relacionado con una mayor producción de enzimas o un mayor crecimiento de los microorganismos responsables de la oxidación del *p*-cresol. Es conocido que la enzima AMO puede estar involucrada en la oxidación de varios hidrocarburos incluyendo compuestos aromáticos (Keener y Arp, 1994; McCarty, 1999). Se descartó previamente en el estudio (sección 5.2.3) que la AMO interviniera en la oxidación del *p*-cresol, sugiriendo la participación de organótrofos asociados a la microflora nitrificante en la oxidación del *p*-cresol. Más estudios de tipo fisiológico, microbiológico y molecular son requeridos para entender en mejor medida la adaptación metabólica del consorcio nitrificante al *p*-cresol a través de los ciclos.

5.3.2.1 Oxidación del p-hidroxibenzaldehído (pOHDO) y p-hidroxibenzoato (pOHTO) por un cultivo nitrificante en un reactor de lotes secuenciados

De acuerdo con los perfiles cinéticos realizados en el reactor SBR, a todas las concentraciones iniciales de *p*-cresol evaluadas, el compuesto fenólico fue oxidado a *p*OHDO y *p*OHTO. Por ejemplo, en la Figura 27a, se presentan las cinéticas realizadas en el ciclo 160 con la primera adición de *p*-cresol a 50 mg C L⁻¹.

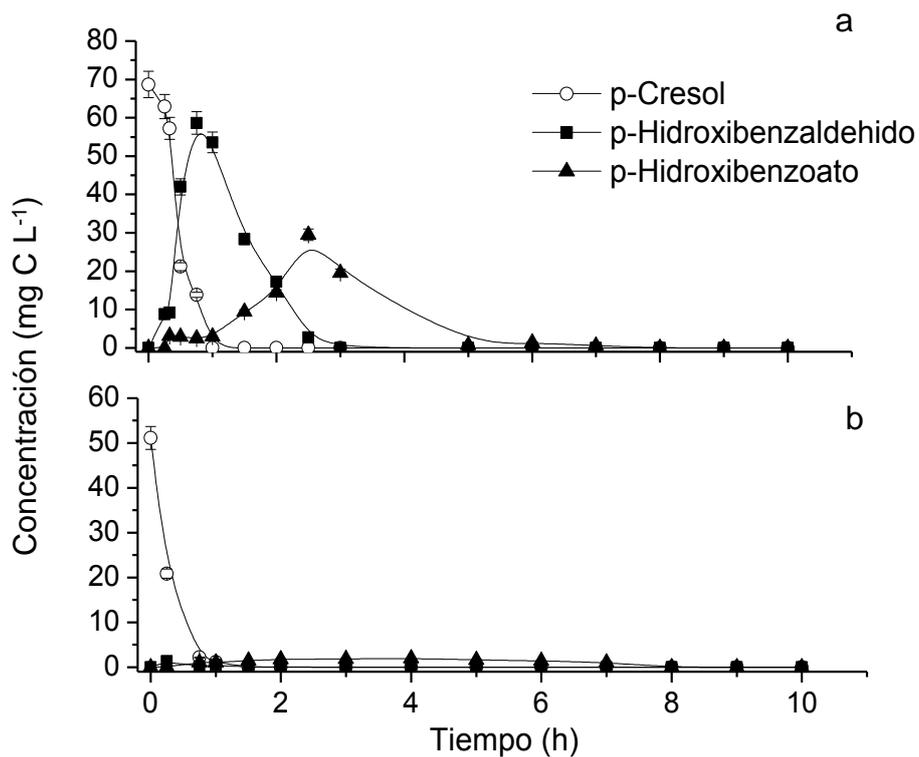


Figura 27. Consumo de *p*-cresol e intermediarios en el reactor SBR nitrificante a los ciclos (a) 160 y (b) 225.

Se advirtió una acumulación de *p*OHDO y *p*OHTO durante 4 h. No obstante, 65 ciclos después (ciclo 225), no hubo acumulación de éstos, desde la primera hora de cinética (Figura 27b). Estos resultados sugieren que las velocidades de consumo de los intermediarios aumentaron conforme transcurrieron los ciclos de operación. Lo anterior indica un aumento en la capacidad metabólica del consorcio nitrificante para oxidar *p*OHDO y *p*OHTO.

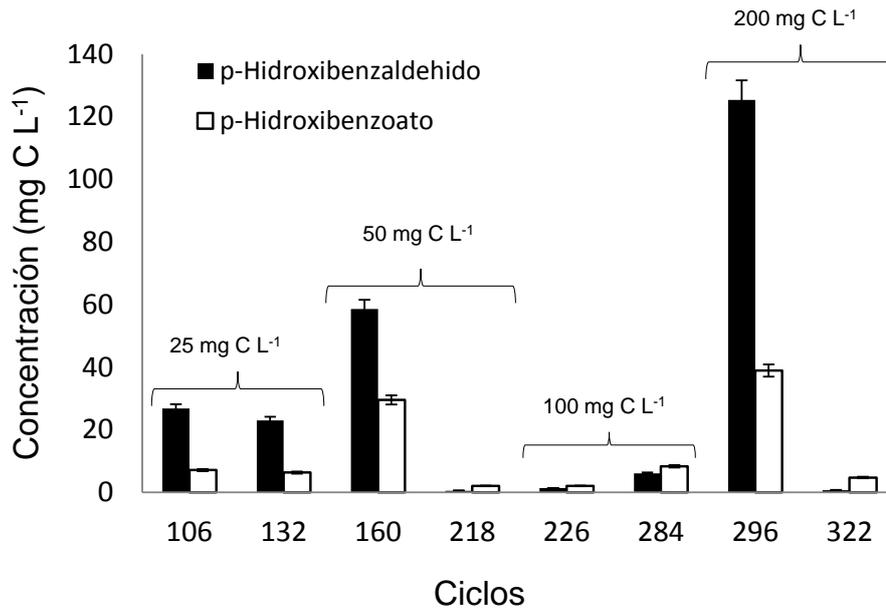


Figura 28. Acumulación de *p*-hidroxibenzaldehído y *p*-hidroxibenzoato en el efluente del SBR nitrificante alimentado con diferentes concentraciones iniciales de *p*-cresol (25, 50, 100 y 200 mg C L⁻¹).

La Figura 28 presenta las concentraciones en *p*OHDO y *p*OHTO en los efluentes del SBR determinadas a diferentes ciclos de operación y concentraciones de *p*-cresol adicionado. Como se muestra en la figura, cuando el *p*-cresol fue adicionado a 25 mg C L⁻¹, los intermediarios fueron acumulados por 26 ciclos. Al ciclo 160, cuando el *p*-cresol fue adicionado por primera vez a 50 mg C L⁻¹, los intermediarios continuaron acumulándose en el medio, sin embargo el consorcio nitrificante fue capaz de eliminarlos 58 ciclos después (ciclo 218). Cuando la concentración de *p*-cresol fue incrementada a 100 mg C L⁻¹, los intermediarios tampoco se acumularon significativamente en el cultivo. En la primera adición de *p*-cresol a 200 mg C L⁻¹ (ciclo 296), el *p*OHDO alcanzó su mayor concentración, alrededor de 125 mg C L⁻¹, acumulándose por 8 h. No obstante, el cultivo nitrificante pudo recuperar su capacidad oxidante ya que 26 ciclos después, la acumulación de intermediarios fue baja. Estos resultados evidencian la capacidad del cultivo nitrificante para recuperarse de un choque producido por un súbito aumento de concentración de *p*-cresol.

Algunos autores han sugerido que el aumento de la capacidad microbiana para eliminar compuestos recalcitrantes puede deberse a mecanismos como la inducción de enzimas, mutaciones, intercambio genético (que permita la creación de nuevas capacidades metabólicas) o crecimiento de microorganismos específicos (Spain y col.,

1980; Schmidt y col., 1983; Button y Robertson, 1985). Sin embargo, estas teorías deben tomarse con precaución. Es conocido que la mineralización de distintos compuestos recalcitrantes por consorcios microbianos es precedida por un periodo de aclimatación. La aclimatación es definida por Wiggins y col. (1987) como la longitud de tiempo entre la adición del compuesto recalcitrante y la primera observación de la mineralización de éste. Por ejemplo, de acuerdo con lo señalado por Wiggings y col. (1987), la duración en la fase de aclimatación para la mineralización de *p*-nitrofenol por bacterias aisladas de un lago, no estuvo relacionada con la mutación ni con la inducción de enzimas, sino con la multiplicación de microorganismos específicos. Wiggings y col. (1987) observaron que la fracción de la población capaz de consumir *p*-nitrofenol se incrementó conforme transcurrían los días de incubación mientras que la población total microbiana no se incrementó. Sugieren que la desproporción entre las poblaciones consumidoras y no consumidoras de *p*-nitrofenol contribuyó a aumentar las velocidades de mineralización de este compuesto. De manera similar a lo que señala Wiggings y col. (1987), en el presente trabajo, el crecimiento microbiano fue bajo en el cultivo nitrificante SBR. A pesar de que el cultivo expuesto a *p*-cresol se mantuvo bajo un régimen desasimilativo ($Y_{BM} = 0.01 \pm 0.001$ mg N-biomasa producida mg^{-1} N- NH_4^+ consumido), sí existió un crecimiento microbiano a lo largo de los ciclos de operación, ya que aumentó la velocidad de crecimiento del lodo al adicionar *p*-cresol en el SBR de 1.0 a 4.6 mg proteína microbiana L^{-1} ciclo $^{-1}$. Por lo cual, no está claro aún si el aumento de la capacidad metabólica del consorcio nitrificante para oxidar *p*-cresol e intermediarios pudiera estar relacionado con un mayor crecimiento de los microorganismos capaces enzimáticamente de consumirlos. Para obtener evidencias que corroboraran esta hipótesis, se necesitaría de un estudio cuantitativo apoyado en técnicas de biología molecular donde se pudiera distinguir si conforme transcurren los ciclos en el SBR adicionado con *p*-cresol un cierto tipo de microflora aumenta su densidad celular en mayor medida que las demás. Sin embargo, no se puede descartar también que el aumento en la capacidad metabólica del lodo en oxidar al *p*OHDO fuera debido a una inducción de enzimas, ya que en los primeros ciclos, el compuesto fue recalcitrante y existió una fase de retardo antes de que se iniciara su consumo.

Simultáneamente a la cuantificación de *p*-cresol e intermediarios, se realizó la determinación del carbono orgánico total en el SBR. En todos los ciclos, la concentración de COT alcanzó un valor cercano a cero después de 10 h, indicando que el *p*-cresol e intermediarios fueron principalmente mineralizados. Además, el rendimiento de producción de biomasa (Y_{BM}) fue de 0.04 ± 0.01 mg C-biomasa producida mg^{-1} C-consumido, mostrando que el proceso fue claramente desasimilativo. Esta segunda parte del estudio permitió demostrar que el sistema SBR puede constituir una buena alternativa para la eliminación de compuestos recalcitrantes. En este trabajo, se demostró cómo el consorcio pudo oxidar cada vez más rápidamente al *p*-cresol y en particular al *p*OHDO, el compuesto más recalcitrante en la ruta de mineralización del *p*-cresol e inhibidor de la nitrificación. El mismo sistema permitió alcanzar una velocidad volumétrica de eliminación de *p*-cresol de $600 \text{ mg } p\text{-cresol L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Se demostró mediante cinéticas que a pesar de presentarse un efecto inhibitorio en la nitrificación, se pudo alcanzar altos valores de E_{NH_4} y Y_{NO_3} en el reactor nitrificante. Por lo tanto, el consorcio presentó la capacidad metabólica para eliminar simultáneamente al *p*-cresol y al amonio, obteniendo CO_2 y nitrato como productos finales mayoritarios. El proceso se mantuvo desasimilativo, evitando una producción excesiva de lodo. El hecho de que el consorcio microbiano utilizado en este estudio posea capacidades para eliminar simultáneamente nitrógeno y carbono muestra la potencial aplicación de la nitrificación acoplada a la desnitrificación para el tratamiento de aguas residuales de origen industrial.

Referencias

- Amor L., Eiroa M., Kennes C. y Veiga M.C. (2005). Phenol biodegradation and its effect on the nitrification process. *Water Research*. **39**(13), 2915-2920.
- Bedard C. y Knowles R. (1989). Physiology, biochemistry, and specific inhibitors of CH₄, NH₄⁺, and CO oxidation by methanotrophs and nitrifiers. *Microbiological Reviews*. **53**(1), 68-84.
- Beristain-Cardoso R., Texier A.-C., Razo-Flores E., Méndez-Pampín R. y Gómez J. (2009). Biotransformation of aromatic compounds from wastewaters containing N and/or S, by nitrification/denitrification: a review. *Re/views in Environmental Science and Bio/Technology*. **8**, 325-342.
- Bossert I.D., Whited G., Gibson D.T. y Young L.Y. (1989). Anaerobic oxidation of *p*-cresol mediated partially purified methylhydroxylase from a denitrifying bacterium. *Journal of Bacteriology*. **171**(6), 2956–2962.
- Button D.K. y Robertson B.R. (1985). Effect of toluene exposure time and concentration on induction of high affinity values for toluene oxidation by bacteria of estuarine seawater samples. *Marine Ecology Progress Series*. **26**, 187-193.
- Chang S.W., Hyman M.R., Williamson K.J., 2002. Cooxidation of naphthalene and other polycyclic aromatic hydrocarbons by the nitrifying bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Biodegradation*. **13**, 373–381.
- Dokianakis S.N., Kornaros N. y Lyberatos G. (2006). Impact of five selected xenobiotics on isolated ammonium oxidizers and on nitrifying activated sludge. *Environmental Toxicology*. **21**, 310–316.
- Duddleston K.N., Arp D.J. y Bottomley P.J. (2002). Biodegradation of monohalogenated alkanes by soil NH₃-oxidizing bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **59**, 535–539.
- Ginestet P., Audic J.M., Urbain V., Block J-C- (1998). Estimation of nitrifying bacterial activities by measuring oxygen uptake in the presence of the metabolic

- inhibitors allylthiourea and azide. *Applied and Environmental Microbiology*. **64**(6), 2266-2268.
- Hägglom M.M., Rivera M.D., Bossert I.D., Rogers J.E. y Young L.Y. (1990). Anaerobic biodegradation of para-cresol under three reducing conditions. *Microbial Ecology*. **20**, 141–150.
- Harayama S. y Kok M. (1992). Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. *Annual Review of Microbiology*. **46**, 565-601.
- Harwood C.S. y Parales R.E. (1996). The-ketoadipate pathway and the biology of self-identity. *Annual Review of Microbiology*. **50**, 553–90.
- Hockenbury M.R. y Grady C.P.L. (1977). Inhibition of nitrification-effects of selected organic compounds. *Journal of Water Pollution Control Federation*. **49**(5), 768-777.
- Hopper D.J. y Taylor D.G. (1975). Pathways for the degradation of *m*-cresol and *p*-cresol by *Pseudomonas putida*. *Journal of Bacteriology*. **122**, 1–6.
- Hopper D.J. (1978). Incorporation of [18O] Water in the formation of phydroxybenzyl alcohol by the *p*-cresol methylhydroxylase from *Pseudomonas putida*. *The Biochemical Journal*. **175**, 345–347.
- Hyman M.R., Samsone-Smith A.W., Shears J.H. y Wood P.M. (1985). A kinetic study of benzene oxidation to phenol by whole cells of *Nitrosomonas europaea* and evidence for the further oxidation of phenol to hydroquinone. *Archives of Microbiology*. **143**, 302–306.
- Keener, W.K. y Arp, D.J. (1993). Kinetic studies of ammonia monooxygenase inhibition in *Nitrosomonas europaea* by hydrocarbons and halogenated hydrocarbons in an optimized whole-cell assay. *Applied and Environmental Microbiology*. **59**, 2501–2510.
- Keener W.K. y Arp D.J. (1994). Transformations of aromatic compounds by *Nitrosomonas europaea*. *Applied and Environmental Microbiology*. **60**(6), 1914-1920.
- Long A. y Ward O.P. (1989). Biotransformation of benzaldehyde by *Saccharomyces cerevisiae*: characterization of the fermentation and toxicity effects of substrates and products. *Biotechnology and Bioengineering*. **34**, 933–941.

- McCarty G.W. Modes of action of nitrification inhibitors (1999). *Biology and Fertility of Soils*. **29**, 1-9.
- O'Reilly K. y Crawford R.L. (1989). Kinetics of *p*-cresol degradation by an immobilized *Pseudomonas* sp. *Applied and Environmental Microbiology*. **55**(4), 866-870.
- Ramos-Nino M.E., Ramirez-Rodriguez A., Clifford M.N., Adams M.R. (1998). QSARs for the effect of benzaldehydes on foodborne bacteria and the role of sulfhydryl groups as targets of their antibacterial activity. *Journal of Applied Microbiology*. **84**, 207–212.
- Rasche M.E., Hicks R.E., Hyman M.R. y Arp D.J. (1990). Oxidation of monohalogenated ethanes and *n*-chlorinated alkanes by whole cells of *Nitrosomonas europaea*. *Journal of Bacteriology*. **172**, 5368–5373.
- Roh H., Subramanya N., Zhao F., Yu C-P., Sandt J. y Chu K-H. (2009). Biodegradation potential of wastewater micropollutants by ammonia-oxidizing bacteria. *Chemosphere*. **77**, 1084-1089.
- Rudolphi A., Tschek A. y Fuchs G. (1991). Anaerobic degradation of cresols by denitrifying bacteria. *Archives of Microbiology*. **155**, 238–248.
- Schmidt E., Hellwig M. y Knackmuss H.-J. (1983). Degradation of chlorophenols by a defined mixed microbial community. *Applied and Environmental Biotechnology*. **46**, 1038-1044.
- Sierra-Alvarez R. y Lettinga G. (1991). The effect of aromatic structure on the inhibition of acetoclastic methanogenesis in granular sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **34**, 544-550.
- Spain J.C., Pritchard P.H. y Bourquin A.W. (1980). Effects of adaptation on biodegradation rates in sediment/water cores from estuarine and freshwater environments. *Applied and Environmental Microbiology*. **40**(4), 726-734.
- Texier A.-C. y Gómez J. (2004). Settability and kinetics of a nitrifying sludge in a sequencing batch reactor. *Canadian Journal of Microbiology*. **50**, 943–949.
- Texier A.-C. y Gómez J. (2007). Simultaneous nitrification and *p*-cresol oxidation in a nitrifying sequencing batch reactor. *Water Research*. **41**, 315-322.

- Wei Y., Van Houten R.T., Borger A.R., Eikelboom D.H. y Fan Y. (2003). Minimization of excess sludge production for biological wastewaters treatment. *Water Research*. **37**, 4453-4467.
- Whited G.M. y Gibson D.T. (1991). Separation and partial characterization of the enzymes of the toluene-4-monooxygenase catabolic pathway in *Pseudomonas mendocina* KR1. *Journal of Bacteriology*. **173**(9), 3017-3020.
- Wiggins B. A., Jones S. H. y Alexander M. (1987). Explanations for the acclimation period preceding the mineralization of organic chemicals in aquatic environments. *Applied and Environmental Microbiology*, **53**(4), 791-796.
- Yadav K.K., Iyengar L., Birkeland N.-K. y Ramanathan G. (2005). Transient accumulation of metabolic intermediates of *p*-cresol in the culture medium by a *Pseudomonas* sp strain. An isolated from a sewage treatment plant. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **21**, 1529–1534.
- Yi T. y Harper W.F. (2007). The link between nitrification and biotransformation of 17 α -ethinylestradiol. *Environmental Science & Technology*. **41**, 4311-4316.
- Zepeda A., Texier A.-C. y Gómez J. (2003). Benzene transformation in nitrifying batch cultures. *Biotechnology Progress*. **19**, 789-793.
- Zepeda A., Texier A.-C., Razo-Flores E. y Gómez J. (2006). Kinetic and metabolic study of benzene, toluene and *m*-xylene in nitrifying batch cultures. *Water Research*. **40**, 1643-1649.
- Zhuang W-Q., Tay J-H., Yi S. y Tay S. T-L. (2005). Microbial adaptation to biodegradation of *tert*-butyl alcohol in a sequencing batch reactor. *Journal of Biotechnology*. **118**, 45–53.

**Conclusiones generales y
recomendaciones**

6. Conclusiones generales y recomendaciones

En este estudio de tesis, se observó que en cultivos en lote, el proceso nitrificante en presencia de *p*-cresol (25 mg C L^{-1}) sufre una inhibición, principalmente en la velocidad específica de consumo de amonio con un 83% de disminución respecto al control. Sin embargo de acuerdo con el alto rendimiento de producción de nitrato obtenido, parece ser que el *p*-cresol sólo afectó la vía nitrificante en su velocidad. El *p*-cresol fue oxidado hasta CO_2 por el consorcio nitrificante, determinándose al *p*-hidroxibenzaldehído y *p*-hidroxibenzoato como intermediarios de la ruta. Los resultados cinéticos de los cultivos en lote con adición de *p*-cresol y *p*-hidroxibenzaldehído, sugieren que es el *p*-hidroxibenzaldehído quien propicia principalmente un efecto inhibitorio en la nitrificación. De hecho se puede considerar a la oxidación del *p*-hidroxibenzaldehído como el paso limitante en la mineralización del *p*-cresol por el consorcio nitrificante. De acuerdo con los resultados de los cultivos en lote tratados con alitiourea, parece ser que enzimas distintas a la enzima AMO llevan a cabo la oxidación del *p*-cresol en el consorcio.

En el SBR nitrificante que fue adicionado con diferentes concentraciones de *p*-cresol ($0\text{-}200 \text{ mg C L}^{-1}$), no se observó un efecto negativo en la actividad nitrificante, ya que la eficiencia de consumo de amonio y el rendimiento de producción de nitrato se mantuvieron altos. El *p*-cresol fue mineralizado hasta una velocidad de carga de $400 \text{ mg C L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. La oxidación del *p*-cresol generó la formación de *p*-hidroxibenzaldehído y *p*-hidroxibenzoato como intermediarios de manera similar que en los cultivos en lote. La velocidad específica de oxidación del *p*-cresol y sus intermediarios fue aumentando a medida que aumentaron los ciclos del reactor, indicando un aumento en la capacidad metabólica del consorcio nitrificante para eliminar al *p*-cresol y sus intermediarios. A pesar de que existió un aumento en la velocidad de crecimiento del lodo al adicionar *p*-cresol, el rendimiento de formación de biomasa se mantuvo bajo. La capacidad del consorcio nitrificante para eliminar paralelamente nitrógeno de amonio y *p*-cresol en un sistema dinámico hasta una velocidad volumétrica de $600 \text{ mg } p\text{-cresol L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ abre la posibilidad de implementar este tipo de sistemas unidos a la

desnitrificación en el tratamiento biológico para efluentes industriales que contengan amonio y compuestos fenólicos.

Los resultados obtenidos en esta tesis abren la posibilidad de diseñar nuevos estudios para avanzar en la comprensión del comportamiento fisiológico del lodo nitrificante adicionado con compuestos fenólicos como el *p*-cresol.

Por ejemplo, sería interesante realizar la caracterización microbiológica del consorcio nitrificante en el SBR y conocer las especies de las bacterias amonio oxidantes, nitrito oxidantes y heterótrofas que coexisten en el consorcio. Se podría incluso tratar de relacionar los cambios fisiológicos del lodo a través de la operación del reactor con cambios en su microflora microbiana.

Futuros estudios también podrían apoyarse de técnicas de biología molecular para tratar de entender porque aumentan las velocidades de consumo de amonio y *p*-cresol en un SBR nitrificante conforme pasan los ciclos. Por ejemplo, se podría evaluar el cambio en las poblaciones nitrificantes y heterótrofas del consorcio a través de los ciclos de operación. Un apoyo para realizar este estudio podrían ser las técnicas de biología molecular FISH (Fluorescent In Situ Hybridization por sus siglas en ingles) o PCR (Polimerase Chain Reaction por sus siglas en ingles) tiempo real. Estas técnicas permitirían monitorear los cambios en las poblaciones del consorcio mientras se aumentan las cargas de *p*-cresol y amonio a través de los ciclos. Incluso de optar por la técnica de PCR tiempo real sería posible dar un seguimiento cuantitativo a las poblaciones nitrificantes y heterótrofas. La propuesta anterior podría ayudar a entender si en los ciclos donde se observó un aumento en la velocidad específica de oxidación del *p*-cresol e intermediarios hubo un cambio mayoritario en la proporción del consorcio hacia los heterótrofos.

Anexo

7. Anexo I

7.1 Ajuste de las velocidades específicas por el modelo de Gompertz.

El ajuste de los datos experimentales mediante el modelo de Gompertz se realizó para el cálculo de las velocidades específicas de toda esta tesis. A continuación se muestra un ejemplo de ajuste de los datos de la cinéticas control de consumo de amonio y la formación respectiva de nitrato (Figuras 29 y 30).

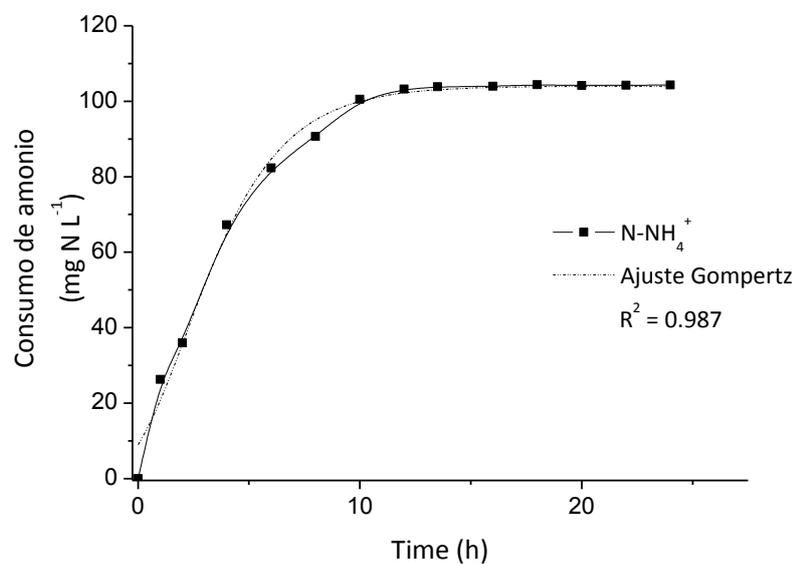


Figura 29. Ajuste al consumo de amonio por el modelo de Gompertz en el cultivo nitrificante de referencia.

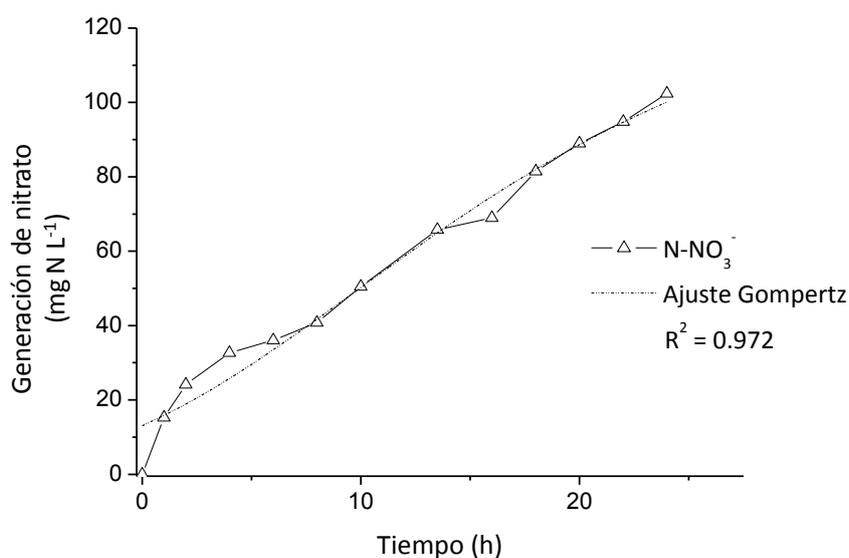


Figura 30. Ajuste a la producción de nitrato por el modelo de Gompertz.

En la Tabla 16, se muestran los coeficientes de correlación para el ajuste por el modelo de Gompertz a los perfiles nitrificantes y de oxidación de *p*-cresol y *p*OHDO mostrados en esta tesis.

Tabla 16. Coeficientes de correlación para el ajuste del modelo de Gompertz a los perfiles nitrificantes, de oxidación de *p*-cresol y *p*OHDO.

Cinética	Coeficiente de correlación (R^2)	Figura
Lote-control/consumo de amonio	0.987	17
Lote-control/producción de nitrato	0.972	17
Lote adición de <i>p</i> -cresol/consumo de amonio	0.970	18
Lote adición de <i>p</i> -cresol/producción de nitrato	0.976	18
Lote adición de <i>p</i> OHDO/consumo de amonio	0.982	20
Lote adición de <i>p</i> OHDO/producción de nitrato	0.988	20
Lote consumo de <i>p</i> -cresol	0.985	19
Lote consumo de <i>p</i> OHDO	0.978	21
SBR ciclo 1 consumo de amonio	0.953	23
SBR ciclo 1 producción de nitrato	0.920	23
SBR ciclo 60 consumo de amonio	0.999	23
SBR ciclo 60 producción de nitrato	0.984	23
SBR ciclo 132 consumo de <i>p</i> -cresol	0.976	26
SBR ciclo 160 consumo de <i>p</i> -cresol	0.977	26
SBR ciclo 225 consumo de <i>p</i> -cresol	0.999	26

Publicaciones relacionadas con esta tesis

8. Publicaciones relacionadas con esta tesis doctoral

Silva C.D., Gómez J., Houbron E., Cuervo-López F.M. y Texier A-C. (2009). *p*-Cresol biotransformation by a nitrifying consortium. *Chemosphere*. **75**, 1387-1391.

Silva C.D., Cuervo-López F.M., Gómez J. y Texier A-C. (2011). Nitrite effect on ammonium and nitrite oxidizing processes in a nitrifying sludge. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **27**, 1241-1245. DOI 10.1007/s11274-010-0573-6.

Silva C.D., Cuervo-López F.M. y Texier A.-C. (2011). *p*-Cresol mineralization in a nitrifying sequential batch reactor. *Artículo enviado a la revista World Journal of Microbiology and Biotechnology*.

Iztapalapa, D.F. a 27 de Junio de 2011

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

**ESTUDIO FISIOLÓGICO DE LA NITRIFICACIÓN Y OXIDACIÓN DEL *p*-CRESOL EN UN
CONSORCIO NITRIFICANTE**

Que presentó

M. en B. Carlos David Silva Luna

Comité tutorial

Dra. Anne-Claire Texier
Directora, UAM-Iztapalapa

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

Dr. Eric Houbron Marty
Asesor, Universidad Veracruzana

H. Jurado

Presidente: Dr. Oscar Monroy Hermosillo

Secretario: Dra. Flor de María Cuervo López

Vocal: Dr. Eric Houbron Marty

Vocal: Dr. Iván Moreno Andrade

The image shows three handwritten signatures in black ink, each written over a horizontal line. The signatures are cursive and somewhat stylized. The top signature is the longest and most complex, the middle one is shorter and more compact, and the bottom one is also shorter and appears to be a signature with a large loop.