



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**OXIDACIÓN DE CRESOLES POR UN LODO NITRIFICANTE EN UN REACTOR DE
LOTES SECUENCIADOS**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE
ESPECIALISTA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

I.B.I.: JUAN ANTONIO SALAS CORTES

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. ANNE-CLAIRE TEXIER

México D.F.

Octubre 2014

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Fisiología Microbiana (W-004) del Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Fue financiado por el proyecto SEP-Conacyt-CB-2011-01-165174.



Casa abierta al tiempo

Iztapalapa, D.F. a 15 de octubre del 2014

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis "OXIDACIÓN DE CRESOLES POR UN LODO NITRIFICANTE EN UN REACTOR DE LOTES SECUENCIADOS"

Que presentó:

Juan Antonio Salas Cortés

Directora: Dra. Anne-Claire Texier Texier

Lector: Dr. Carlos David Silva Luna [Signature]

Casa abierta al tiempo

Agradecimientos

Agradezco enormemente la dirección de la Dra. Anne-Claire Texier durante la Especialidad, la guía otorgada para la redacción de esta tesis, así como su invaluable apoyo por su profesionalismo, dedicación, consejos y el tiempo invertido en mi formación.

A la Dra. Flor de María Cuervo López por su colaboración a este trabajo, por sus sugerencias, disposición y críticas constructivas.

Al Dr. Jorge Gómez por brindarme la oportunidad de desarrollarme en el laboratorio.

Al Dr. Carlos David Silva Luna que revisó este trabajo por sus comentarios y sugerencias.

A todos los compañeros y amigos del laboratorio de Fisiología Microbiana. A mi amiga Gehovana, a mis compañeros de trabajo, Emmanuel, Emir, Sergio, Diego, Karina, Alejandro, Jackelin gracias por su amistad y el buen ambiente de trabajo.

Finalmente y no menos importante doy gracias a Budha por ser la luz de mi camino.

Dedicatorias

A mi madre

Por su cariño, enseñanzas, su apoyo incondicional y ese temple que admiro.

A mi hermana

Por su amistad, apoyo y compañía.

A mi Clau

Gracias por ser mi amiga, mi amada, por las noches de desvelo y por demostrarme que se puede amar tanto.

A Ivor

Gracias por tu invaluable amistad.



Casa abierta al tiempo

“Para enseñar a los demás, primero has de hacer tú algo muy duro:
has de enderezarte a ti mismo.”
— *Buddha, Sidhartha Gautama*



CONTENIDO

RESUMEN.....	1
1 INTRODUCCIÓN.....	3
2 ANTECEDENTES.....	4
2.1 NITRIFICACIÓN/DESNITRIFICACIÓN.....	7
2.1.1 Nitrificación.....	7
2.1.2 Desnitrificación.....	10
2.2 OXIDACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS POR LODOS NITRIFICANTES.....	11
2.3 REACTOR DE LOTES SECUENCIADOS.....	12
3 JUSTIFICACIÓN.....	14
4 HIPÓTESIS.....	14
5 OBJETIVOS.....	15
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	15
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
6 MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
6.1 FUENTE DE INÓCULO.....	15
6.2 MEDIO DE CULTIVO.....	16
6.3 REACTOR DE LOTES SECUENCIADOS.....	16
6.4 VARIABLES DE RESPUESTA.....	18
6.5 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	19
6.5.1 Amonio.....	20
6.5.2 Nitrito, nitrato.....	21
6.5.3 Proteína microbiana.....	22
6.5.4 Cresoles.....	23
6.5.5 Oxígeno disuelto y pH.....	24
7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
7.1 ENSAYOS ABIÓTICOS EN EL SBR.....	24
7.2 ESTABILIZACIÓN DEL PROCESO NITRIFICANTE SIN ADICIÓN DE CRESOLES.....	25
7.3 CRECIMIENTO MICROBIANO.....	28
7.4 NITRIFICACIÓN EN EL SBR ALIMENTADO CON CRESOLES.....	28
7.6 OXIDACIÓN DE LOS CRESOLES POR EL LODO NITRIFICANTE.....	33
8 CONCLUSIONES.....	37
9 BIBLIOGRAFÍA.....	38

Resumen

Un reactor nitrificante en continuo en estado estacionario sirvió como fuente de biomasa microbiana para inocular un reactor de lotes secuenciados (SBR). En este reactor SBR, se evaluó la capacidad metabólica del consorcio nitrificante para oxidar el *m*-cresol, *o*-cresol y *p*-cresol, así como el efecto de los tres isómeros en mezcla sobre el proceso de nitrificación. Las variables utilizadas para evaluar la respuesta fisiológica y cinética del lodo nitrificante fueron: eficiencia de consumo (E_{NH_4} , $E_{m\text{-cresol}}$, $E_{o\text{-cresol}}$, $E_{p\text{-cresol}}$), rendimiento (Y_{NO_2} , Y_{NO_3} , Y_{BM}) y velocidad específica (q_{NH_4} , q_{NO_3} , $q_{m\text{-cresol}}$, $q_{o\text{-cresol}}$, $q_{p\text{-cresol}}$).

Primero, se realizó un estudio abiótico dentro del mismo reactor que permitió descartar posibles pérdidas de *o*-cresol y *m*-cresol por reacción química, procesos de adsorción y/o volatilización. Estos resultados fueron similares a los encontrados en un estudio previo para el *p*-cresol en un sistema similar. Posteriormente, se inoculó el reactor SBR y se obtuvo la estabilización de un proceso nitrificante con altos valores de eficiencia ($E_{\text{NH}_4} = 100\%$) y rendimiento de nitrato ($Y_{\text{NO}_3} = 0.92 \pm 0.10$ mg N/mg N-NH₄⁺ consumido), así como un rendimiento de nitrito de cero. Esto permitió obtener un efluente con cantidades despreciables de amonio y nitrito pero con nitrato como producto principal de la respiración nitrificante. Se determinó un rendimiento en biomasa (Y_{BM}) de 0.004 ± 0.001 mg N-proteína microbiana/mg N-NH₄⁺ consumido. Por lo tanto, el proceso fue principalmente desasimilativo, limitando el crecimiento excesivo de biomasa.

Cuando se añadió *m*-cresol (10 mg C/l) por primera vez al SBR (ciclo 173), este compuesto provocó una inhibición del proceso nitrificante, con una disminución del 66% en la q_{NH_4} y del 90% en la q_{NO_3} respecto a los valores obtenidos en el reactor control sin adición de cresol. En este primer ciclo de adición de *m*-cresol, el consorcio mostró una capacidad metabólica despreciable para consumir el compuesto con una $q_{m\text{-cresol}}$ de 0.0003 mg C/mg proteína microbiana.h. Doce ciclos después (ciclo 185), todo el *m*-cresol (10 mg C/l) fue consumido en tan solo 1 h, indicando que el lodo adquirió una mayor capacidad metabólica

para oxidar al *m*-cresol con una $E_{m\text{-cresol}}$ del 100% y un aumento en la $q_{m\text{-cresol}}$, la cual llegó a un valor máximo de 0.450 mg C/mg proteína microbiana.h al ciclo 227. Al aumentar la velocidad de consumo de *m*-cresol, disminuyó su efecto inhibitorio y aumentaron las velocidades de la nitrificación.

Cuando se añadió *o*-cresol (10 mg C/l) por primera vez al SBR (ciclo 241) en mezcla con el *m*-cresol (30 mg C/l), hubo de nuevo un descenso en los valores de las velocidades de la nitrificación, indicando el efecto inhibitorio de los dos isómeros en el proceso nitrificante. Sin embargo, la inhibición fue menor que en el primer ciclo de adición de *m*-cresol al reactor, mostrando una mayor tolerancia del lodo a la presencia de cresoles a través de los ciclos. Durante este primer ciclo de adición de *o*-cresol al SBR (ciclo 241), el consorcio presentó la capacidad metabólica para oxidar tanto el *m*-cresol como el *o*-cresol y los dos isómeros fueron completamente oxidados en 1 h, siendo el *o*-cresol el más recalcitrante de los dos isómeros. Nuevamente al aumentar el número de ciclos y la concentración en *o*-cresol (10 a 30 mg C/l), se observó una tendencia general al aumento en las velocidades de oxidación del *o*-cresol, mostrando una mayor capacidad metabólica del lodo para consumir el *o*-cresol. El aumento en las velocidades de consumo de los dos isómeros en mezcla binaria estuvo relacionado con una disminución de su efecto inhibitorio en la nitrificación a través de los ciclos.

Cuando se adicionó *p*-cresol (30 mg C/l) por primera vez en el reactor en mezcla con *m*-cresol (30 mg C/l) y *o*-cresol (30 mg C/l) (ciclo 355), la q_{NH_4} siguió aumentando y la q_{NO_3} no cambió significativamente, indicando que el *p*-cresol no causó inhibición en la nitrificación bajo este esquema de alimentación del reactor nitrificante con cresoles. Al ciclo 369, q_{NH_4} y q_{NO_3} alcanzaron valores de 0.060 y 0.028 mg N/mg proteína.h, respectivamente, representando el 75 y 93% de los valores obtenidos en el reactor control sin adición de cresoles. Estos resultados muestran que el uso del SBR puede ser una buena alternativa para favorecer la disminución del efecto inhibitorio de los cresoles sobre la nitrificación a través de los ciclos. Desde el primer ciclo de adición de la mezcla ternaria de cresoles al SBR (ciclo 355), se obtuvo la completa oxidación de los tres isómeros del cresol en menos de 2 h, obteniéndose eficiencias ($E_{m\text{-cresol}}$, $E_{o\text{-cresol}}$ y $E_{p\text{-cresol}}$) del 100% y no se detectó por HPLC la presencia de intermediarios de la oxidación de los cresoles en el efluente. El lodo en el SBR fue capaz de

oxidar completamente el amonio ($145 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{l.d}$) a nitrato con alta eficiencia y alto rendimiento a pesar de la alimentación del reactor con una mezcla ternaria de los isómeros del cresol a 30 mg C/l cada uno ($180 \text{ mg C-cresoles/l.d}$). 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.

1 Introducción

Las aguas residuales tienen un impacto considerable sobre el ambiente ya que pueden contener compuestos tóxicos, afectando la flora y los seres vivos de los cuerpos acuíferos receptores. Lo alarmante en México es que se trata muy poca cantidad de esa agua propagando contaminación (Monroy y col., 2000). Según la SEMARNAT (2008), se generan al año alrededor de $8.03 \times 10^9 \text{ m}^3$ de agua residual proveniente de las ciudades y $5.62 \times 10^9 \text{ m}^3$ de agua de otras fuentes, principalmente las desechadas por la industria. De este enorme caudal, sólo se trata 36% de las aguas residuales municipales y sólo 15% de las industriales. Por ello, es importante tratar estos efluentes por métodos que remedien esta situación. Los procesos fisicoquímicos son una opción pero no la mejor en algunos casos, ya que pueden ser costosos y no son amigables con el ambiente. Los procesos de tratamiento de tipo biológico presentan las ventajas de ser de bajo costo, pueden ser muy eficientes y son amigables con el ambiente.

Los efluentes provenientes de la industria química y petrolera contienen amonio, nitrito, nitrato y compuestos fenólicos como los cresoles (Olmos y col., 2004). Los isómeros del cresol (orto, meta y para) pueden causar efectos nocivos sobre la salud del ser humano. Se ha propuesto que el uso de consorcios microbianos con actividad nitrificante previamente estabilizada en reactores de lotes secuenciados representa una alternativa de tratamiento efectiva para llevar a cabo la oxidación simultánea de compuestos aromáticos y nitrogenados (Texier y Gómez, 2007). Al realizarse todo el proceso en un solo reactor, el proceso es más económico. Cabe señalar que existen todavía pocos estudios de la oxidación del *p*-cresol y *m*-cresol por lodos nitrificantes y aún menos información sobre la eliminación del *o*-cresol (Silva y col., 2009, 2011b; Zepeda y col., 2013). Además, hacen falta estudios sobre la oxidación de los cresoles en mezclas. El estudio de la biotransformación del amonio y de los isómeros del

cresol (*o*-cresol, *m*-cresol, *p*-cresol) en reactores nitrificantes de lotes secuenciados podría dar resultados muy interesantes, contribuyendo al mejoramiento del proceso nitrificación/desnitrificación en presencia de compuestos fenólicos y a obtener procesos más amigables con el ambiente, obteniéndose la mineralización de compuestos aromáticos en mezclas y la oxidación de amonio a nitrógeno molecular.

2 Antecedentes

Las formas iónicas de nitrógeno inorgánico más comunes en los ecosistemas acuáticos son el amonio (NH_4^+), nitrito (NO_2^-) y nitrato (NO_3^-). El nitrógeno de amonio provoca eutroficación (que se caracteriza por un crecimiento desmedido de las algas, que “agotan” o disminuyen el oxígeno disponible en el agua), la acidificación de cuerpos de agua dulce y la bioacumulación. El amonio llega a ser tóxico a la fauna (Bédard C., Knowles R (1989). Physiology, biochemistry, and specific inhibitors of CH_4 , NH_4^+ , and CO oxidation by methanotrophs and nitrifiers. *Biology and Molecular Biology Review*. 53(1):68., 2010). Además, algunos compuestos fenólicos pueden ser encontrados en efluentes industriales en conjunto con el amonio (Veeresh y col., 2005). Por ejemplo, en aguas provenientes de la industria petroquímica se reportaron concentraciones de 60 mg/l de *p*-cresol, 20 mg/l de *o*-cresol y 710 mg/l de nitrógeno de amonio (Olmos y col., 2004). Los compuestos fenólicos como los cresoles son tóxicos y pueden llegar a ser cancerígenos, mutagénicos y teratogénicos en altas concentraciones (Autenrieth y col., 1991). Algunos de los efectos de compuestos nitrogenados y fenólicos se describen en la Tabla 1, así como las concentraciones máximas permisibles.

Tabla 1. Concentraciones permisibles de diferentes contaminantes en el agua.

Fuente	Contaminante	Nivel máximo (mg/l)	Efectos a la salud
EPA (1986)	N-Nitrato	10	Diuresis, hemorragia de la bilis, dificultad respiratoria y síndrome de bebé cianótico (azul), cancerígeno, teratogénico.
EPA (1986)	N-Nitrito	1	

NOM ECOL (1996)	N total	10-14	Tóxico
NOM-052- SEMARNAT- (1993)	Cresol y sus isómeros	200	Si se ingieren pueden producir dolor abdominal, vómitos, quemaduras internas, daño del hígado, riñón y posiblemente la muerte.
NOM-052- SEMARNAT- (1993)	Fenol	14.4	La absorción sistémica provoca un deterioro del sistema nervioso central, el hígado y los riñones. Los efectos locales incluyen irritación de los ojos, piel y membranas mucosas.

La contaminación de agua por nitrógeno representa un problema serio tanto para la salud del ser humano como para la fauna y flora, para lo cual se han diseñado diferentes métodos de tratamiento para mejorar la calidad del agua, los fisicoquímicos y los biológicos. Los procesos fisicoquímicos más usados 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. El arrastre de amoniaco es un proceso de desorción para reducir el contenido de amoniaco en un agua residual mediante una fuerte corriente de aire. Se utiliza cal viva o sosa caustica para alcalinizar el agua (pH de 10.8 a 11.5), lográndose la conversión de los iones amonio a amoniaco de acuerdo a la siguiente ecuación (pKa de 9.24 a 25°C) (Silva, 2011):



Las resinas de intercambio iónico son capaces de retener selectivamente sobre su superficie los iones disueltos en el agua, los mantiene temporalmente unidos a la superficie, y los cede frente a una disolución con un fuerte regenerante. La cloración al punto de rompimiento es la adición de cloro al agua hasta el punto donde el cloro libre residual disponible se incrementa proporcionalmente a la cantidad de cloro que está siendo añadido. En el punto de ruptura (breakpoint), todo el nitrógeno amoniacal ha sido oxidado a nitrógeno molecular (Tchobanoglous y Burton, 1991).

Especialidad en biotecnología

Sin embargo, estos métodos no remedian el problema de raíz, el beneficio adquirido es superado por sus inconvenientes ya que suelen ser muy costosos y solamente trasladan los contaminantes de un lugar a otro o generan una contaminación colateral. Debido a esto, se han desarrollado métodos biológicos basados en los procesos microbianos del ciclo del nitrógeno como los procesos de nitrificación, desnitrificación, ANAMMOX, entre otros (Tabla 2). El método convencional de nitrificación-desnitrificación constituye una forma efectiva, sustentable y económicamente factible de eliminar biológicamente el nitrógeno de aguas residuales (Cervantes y col., 2000). Este proceso se define como el acoplamiento de los procesos nitrificante y desnitrificante para transformar al amonio hasta nitrógeno molecular. Se realiza en dos fases, 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) (Silva y col., 2011a).

Tabla 2. Comparativo de tratamientos fisicoquímicos y biológicos de aguas residuales.

Tipo de tratamiento	Ventaja	Inconveniente
Fisicoquímicos	<ul style="list-style-type: none">• Altas tasas de eliminación de amonio	<ul style="list-style-type: none">• No resuelven el problema sólo lo trasladan de un lugar a otro.
ANAMMOX, SHARON, SHARON-ANAMMOX, etc.	<ul style="list-style-type: none">• Alta eficiencia en eliminación de nitrógeno	<ul style="list-style-type: none">• Necesita un escrupuloso control de variables (pH, temperatura y concentración de oxígeno)• El arranque puede ser muy lento
Nitrificación/desnitrificación	<ul style="list-style-type: none">• Alta eficiencia• Costo de operación bajo• Proceso fácil de manejar• Proceso amigable con el ambiente	<ul style="list-style-type: none">• Las cepas nitrificantes autótrofas poseen una baja tasa de crecimiento.

2.1 Nitrificación/desnitrificación

2.1.1 Nitrificación

Tanto la nitrificación como la desnitrificación forman parte del ciclo natural del nitrógeno (Figura 1).

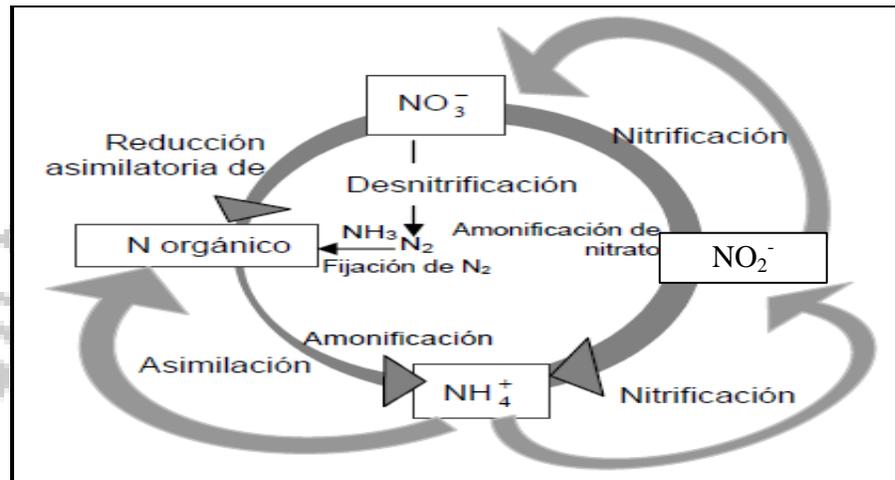


Figura 1. Ciclo del nitrógeno (Zumft, 1997).

La nitrificación se define como un proceso respiratorio aerobio y litoautotrófico mediante el cual se lleva a cabo la oxidación del amonio hasta nitrato vía nitrito, por bacterias amonio oxidantes (AOB, por sus siglas en inglés) y nitrito oxidantes (NOB) (Figura 2) (Prosser, 1989; Bock y col., 1991). Las AOB y NOB son quimiolitótrofas, obteniendo la energía de la oxidación del nitrógeno amoniacal y del nitrito, respectivamente, y utilizando el oxígeno como aceptor final de electrones, por lo que son aerobias estrictas (Lolmede y col., 2000). Son bacterias autótrofas ya que son capaces de elaborar todos sus compuestos de carbono celulares (proteínas, lípidos, carbohidratos) a partir de CO_2 (Conn y Stumpf, 1993).

El primer paso donde se oxida el amonio (NH_4^+) a nitrito (NO_2^-), es catalizado por pocas especies de bacterias que empiezan con el prefijo nitroso, como: *Nitrosomonas*, *Nitrosospira*, *Nitrosolobus*, *Nitrosococcus* y *Nitrosovibrio*, siendo *Nitrosomonas* el género más

representativo. El segundo paso corresponde a la oxidación del nitrito (NO_2^-) a nitrato (NO_3^-), a través del grupo de géneros: *Nitrobacter*, *Nitrospina*, *Nitrococcus* y *Nitrospira*, siendo *Nitrobacter* el más estudiado.

La primera reacción es catalizada por la enzima amonio monooxigenasa (AMO) y la segunda por la enzima hidroxilamina oxidoreductasa (HAO). Por último, la tercera reacción de oxidación del nitrito a nitrato es catalizada por la enzima llamada nitrito óxido reductasa (NOR).

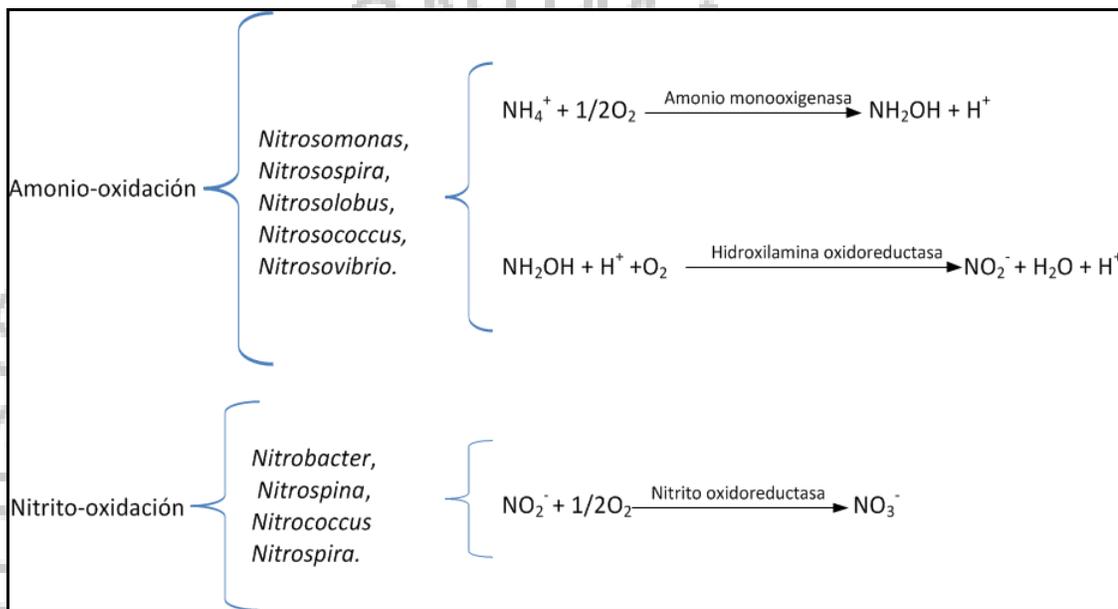


Figura 2. Reacciones del proceso nitrificante.

Entre los factores que afectan la nitrificación, se encuentran:

- La presencia de compuestos orgánicos e inorgánicos como la alitiourea (ATU), el cianuro de potasio, la tiourea, el dietiltiocarbamato y la nitrapirina. Estos compuestos han sido catalogados como inhibidores específicos de la amonio oxidación (Hooper y Terry, 1973; Bedard y Knowles, 1989). Silva y col. (2009) encontró que en cultivos en lote la adición de ATU (25 mg/l) provoca una inhibición completa de la amonio oxidación durante 24 h de incubación, resultando en una eficiencia de consumo en amonio (E_{NH_4}) de $1.7 \pm 1.1\%$ y un rendimiento en nitrato (Y_{NO_3}) de 0.97 ± 0.05 g N-

$\text{NO}_3^-/\text{g N-NH}_4^+$ consumido. Estos resultados indicaron 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 concentración de oxígeno disuelto: las bacterias nitrificantes utilizan oxígeno molecular como aceptor final de electrones en el proceso respiratorio y lo requieren para su crecimiento. En reactores de lodos activados, se ha reportado que la concentración mínima en oxígeno disuelto sería de 2 mg/l para mantener una actividad nitrificante correcta (Gerardi, 2002).
- La concentración inicial de nitrito y amonio: algunos estudios señalaron que el NH_3 podría ser un inhibidor de la enzima nitrito óxido reductasa (Yang y Alleman, 1992), así mismo el nitrito es un inhibidor de la nitrificación (Silva y col., 2011a).
- El valor de pH: las bacterias nitrificantes se ven favorecidas a valores de pH neutro a alcalino próximo a valores de 7.5-8.0. Valores de pH por debajo de 5 pueden provocar que la nitrificación se detenga por completo, aunque no es claro si el causante es el pH o la acumulación de ácido nitroso (HNO_2), el cual inhibe la oxidación de amonio (Cervantes y col., 2000).
- La temperatura: se sabe que la velocidad específica de reacciones bioquímicas puede modificarse con la temperatura y en consecuencia, la temperatura puede alterar las velocidades tanto del proceso respiratorio microbiano como del crecimiento celular. Las bacterias nitrificantes pueden sobrevivir a temperaturas de entre 4 a 45°C, sin embargo, presentan un mejor crecimiento entre 28 y 36°C dependiendo de las especies (Silva, 2011).
- La relación C/N: uno de los parámetros más importantes en el proceso de nitrificación es la relación entre el carbono orgánico y el nitrógeno, debido a que el contenido de estos macronutrientes en el agua residual puede determinar la competencia en el crecimiento establecida entre las poblaciones de microorganismos autótrofos y heterótrofos (Ferrara y Ramírez, 2010).
- La presencia de compuestos orgánicos de tipo aromático: diferentes estudios han demostrado la inhibición tanto de la amonio oxidación como de la nitrito oxidación por compuestos orgánicos, incluyendo compuestos aromáticos como benceno, tolueno, *m*-

xileno, fenol y *p*-cresol (Texier y Gómez, 2002; Amor y col., 2005; Zepeda y col., 2006).

2.1.2 Desnitrificación

La desnitrificación es un proceso metabólico anóxico donde el nitrato es utilizado como aceptor terminal de electrones y es reducido a nitrógeno molecular por una sucesión de reacciones catalizadas por enzimas específicas (Martínez, 2007). A diferencia de la nitrificación, ésta puede ser litotrófica u organotrófica. La desnitrificación requiere un sustrato oxidable ya sea orgánico o inorgánico que actúe como fuente de energía, por lo que la desnitrificación puede llevarse a cabo tanto por bacterias heterótrofas como autótrofas. En la desnitrificación organoheterotrófica, un sustrato orgánico, como metanol, etanol, ácido acético, glucosa, etc. actúa como fuente de energía (donador de electrones) y fuente de carbono. En la desnitrificación litoautotrófica, la fuente de energía es inorgánica, como hidrógeno o compuestos reducidos de azufre: ácido sulfhídrico (H_2S) o tiosulfato ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) y la fuente de carbono también es inorgánica (CO_2).

El proceso desnitrificante se realiza a través de 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 (Cuervo-López y col., 2009). La secuencia enzimática de la desnitrificación es la siguiente:

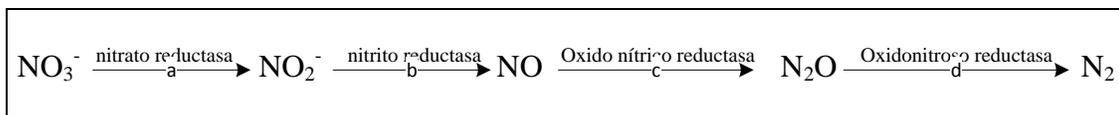


Figura 3. Reacciones del proceso desnitrificante.

2.2 Oxidación de compuestos fenólicos por lodos nitrificantes

La nitrificación puede verse afectada por distintos compuestos inorgánicos y orgánicos, incluyendo a compuestos aromáticos y fenólicos. Sin embargo, esto no quiere decir que detengan el proceso sino que de alguna manera sólo lo ralentizan, manteniéndose altos los valores de eficiencia y rendimiento de la nitrificación (Texier y Gómez, 2007). Además, se ha reportado que estos mismos compuestos orgánicos pueden ser eliminados eficientemente usando un consorcio microbiano fisiológicamente estable (Silva y col., 2009, 2011b).

En la literatura, se puede encontrar estudios sobre el efecto inhibitorio de compuestos fenólicos en la nitrificación y en conjunto sobre la capacidad metabólica de los lodos nitrificantes en oxidar dichos compuestos: fenol (Weinberger R. (1993). Practical capillary electrophoresis. Academic Press, San Diego CA. pp 6-7. y col., 2001; Amor y col., 2005; Silva y col., 2011b), *p*-cresol (Texier y Gómez, 2007; Beristain-Cardoso y col., 2011), 2-clorofenol (Martínez-Hernández y col., 2011; Silva y col., 2011b; Pérez-Alfaro y col., 2013), *p*-hidroxibenzaldehído (Téllez-Pérez y col., 2012). Texier y Gómez (2002) estudiaron el efecto del *p*-cresol en cultivos nitrificantes en lote. Se observó que éste inhibió la formación de nitrato en un 70% a una concentración de 17 mg/l. Posteriormente, los mismos autores realizaron un estudio en un reactor nitrificante de lotes secuenciados (SBR, por sus siglas en inglés) (Texier y Gómez, 2007). Observaron que conforme aumentó el número de ciclos de operación en el reactor SBR, el porcentaje de inhibición de la nitrificación por la adición de *p*-cresol disminuyó significativamente hasta llegar a un estado estacionario. Posteriormente, Silva (2011) observó que el lodo nitrificante fue capaz de consumir totalmente el *p*-cresol y mineralizarlo a CO₂ sin afectar la eficiencia y el rendimiento de la nitrificación en un reactor de lotes secuenciados.

Zepeda y col. (2013) trabajaron con un lodo nitrificante en un reactor SBR operado durante 4 meses, adicionando *m*-cresol a diferentes concentraciones (0-150 mg C/l) y 50 mg N-NH₄⁺/l. Se obtuvo la total eliminación de amonio ($E_{\text{NH}_4} = 98 \pm 2\%$), así como la completa eliminación de *m*-cresol ($E_{m\text{-cresol}} = 100\%$).

Estos resultados muestran la capacidad metabólica de consorcios nitrificantes en oxidar simultáneamente amonio y cresoles y que el reactor SBR podría ser una buena alternativa ya

que permite atenuar el efecto inhibitorio a través de los ciclos de operación. Sin embargo, el cresol que más se ha estudiado es el *p*-cresol y la información disponible sobre la oxidación de los otros dos isómeros del cresol (*o*-cresol y *m*-cresol) por lodos nitrificantes es casi inexistente y más aún en mezclas de isómeros y en reactores biológicos.

2.3 Reactor de lotes secuenciados

Los reactores de lotes secuenciados (SBR: Sequential Batch Reactor) son reactores discontinuos donde el proceso biológico y la sedimentación ocurren en un solo tanque. Esto provee a los reactores de lote secuenciado ventaja en cuanto a su operación, tienen un bajo costo de operación, una fácil automatización, una gran flexibilidad de operación, y presentan un ahorro en espacio y en mantenimiento (Mace y Mata-Álvarez, 2002). El SBR opera en ciclos consecutivos de cuatro etapas: llenado, reacción biológica, sedimentación y drenado (Figura 4) (Texier y Gómez, 2004). Los reactores SBR son utilizados para tratar aguas como las industriales por nitrificación/desnitrificación (Artan y col., 2001).

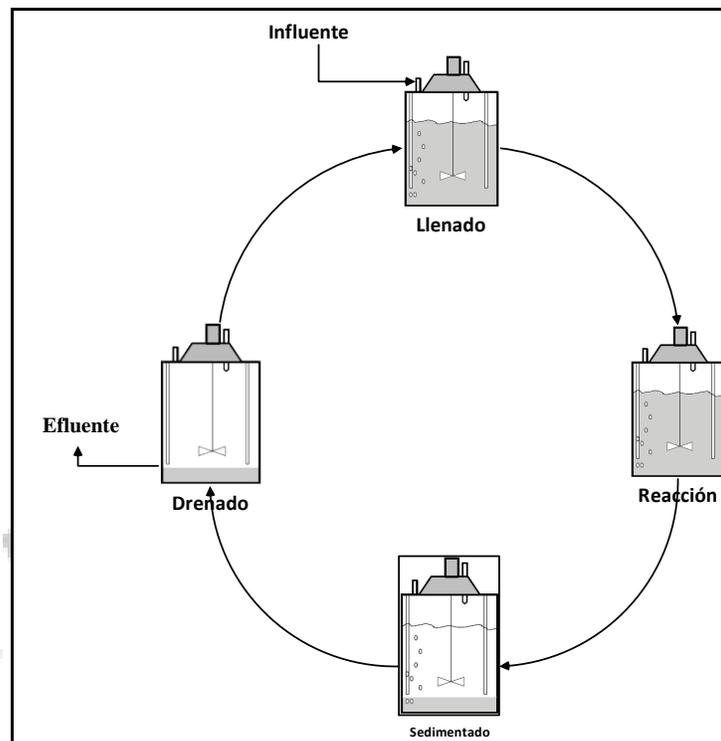


Figura 4. Etapas del ciclo de operación de un reactor SBR.

Además, los reactores SBR constituyen una buena herramienta de estudio básico para caracterizar cinéticamente procesos biológicos ya que se pueden establecer cinéticas de consumo en sustratos y formación de productos en cada ciclo de operación. Esto permite evaluar cómo cambian las velocidades específicas del proceso a través de los ciclos bajo diferentes condiciones de operación. Silva (2011) observó en un reactor SBR nitrificante alimentado con *p*-cresol (25-200 mg C/L) que las velocidades específicas de consumo de *p*-cresol aumentaban con el número de ciclos, demostrando que la capacidad metabólica del lodo para oxidar el compuesto fenólico aumentaba a través de los ciclos. En este mismo estudio, se obtuvo una velocidad específica de consumo de *p*-cresol mayor que en otros estudios en lote. Además, se obtuvo el consumo total y la mineralización del *p*-cresol en paralelo con una completa conversión del amonio a nitrato. De acuerdo a sus resultados, Silva (2011) propuso que el SBR podría constituir una buena alternativa para eliminar simultáneamente amonio y compuestos inhibitorios o recalcitrantes de aguas residuales. Sin embargo, hacen falta más

estudios en reactores SBR para evaluar la eliminación de amonio y mezclas de cresoles a través de los ciclos de operación.

3 Justificación

En la actualidad el problema del agua reside principalmente en los problemas de desabasto, contaminación y purificación. El agua forma parte de todo ser vivo y sin ella la vida sería imposible. Empleamos el agua en nuestras actividades diarias, también la usamos en la agricultura y en la actividad industrial: industria minera, química y petrolera entre otras. Las industrias utilizan enormes volúmenes para sus procesos emitiendo grandes cantidades de efluentes contaminados repercutiendo en el ambiente y la salud de la población. En efluentes industriales, el amonio puede estar presente en conjunto con contaminantes orgánicos de tipo aromático como los compuestos fenólicos. El sistema nitrificante-desnitrificante constituye una forma efectiva, sustentable y económicamente factible de eliminar biológicamente el nitrógeno de aguas residuales en forma de nitrógeno molecular. Recientemente, se ha demostrado que puede ser ventajoso usar lodos nitrificantes en reactores SBR para eliminar simultáneamente amonio y compuestos aromáticos. Existe información previa que demuestra que el amonio puede ser oxidado a nitrato vía nitrificación en reactores SBR con alta eficiencia y alto rendimiento aun cuando el reactor este alimentado con *p*-cresol o *m*-cresol. Sin embargo, todavía no se ha estudiado la capacidad metabólica de lodos nitrificantes para oxidar los tres isómeros del cresol (*o*-, *m*- y *p*-cresol) cuando están presentes en mezcla. Hacen falta más estudios fisiológicos y cinéticos de la biotransformación de los diferentes cresoles por lodos nitrificantes en reactores biológicos para llegar a entender mejor y mejorar el proceso respiratorio nitrificante. Este tipo de información podría ayudar a proponer alternativas de tratamiento de efluentes de tipo industrial.

4 Hipótesis

Un lodo con respiración nitrificante estable será capaz de oxidar simultáneamente al amonio, *m*-cresol, *o*-cresol y *p*-cresol en un reactor de lotes secuenciados.

5 Objetivos

5.1 Objetivo general

Evaluar la capacidad de un consorcio nitrificante para oxidar el *m*-cresol, *o*-cresol y *p*-cresol en un reactor de lotes secuenciados.

5.2 Objetivos específicos

- Evaluar la nitrificación en un reactor de lotes secuenciados en ausencia y presencia de cresoles, a través de las variables de respuesta: eficiencia y rendimiento.
- Evaluar el efecto inhibitorio en la nitrificación del *m*-cresol, *o*-cresol y *p*-cresol en un mismo reactor a partir de la comparación de las velocidades específicas.
- Evaluar la biotransformación de los cresoles a través de los ciclos de operación y a diferentes concentraciones iniciales.

6 Materiales y métodos

6.1 Fuente de inóculo

El inóculo se obtuvo de un reactor nitrificante en continuo de tanque agitado en estado estacionario. El reactor continuo se alimenta continuamente con un medio de cultivo litoautotrófico para la nitrificación con una velocidad de carga en amonio de 250 ± 14 mg N/l.d. Durante el periodo de operación del reactor continuo en el cual se utilizó el lodo como fuente de inóculo para el reactor SBR, la velocidad de descarga en amonio residual se mantuvo muy baja y la velocidad de producción de nitrato fue de 237 ± 12 mg N/l.d. La velocidad de descarga en nitrito siempre se mantuvo cercana a cero. El reactor continuo presentó los siguientes valores promedio de eficiencia y rendimiento: $99 \pm 5\%$ y 0.95 ± 0.05 g $\text{N-NO}_3^-/\text{g N-NH}_4^+$ consumido. De acuerdo con los resultados obtenidos, el consorcio del

reactor en continuo presentó una actividad fisiológica nitrificante estable con altos valores de eficiencia de consumo de amonio y rendimiento de formación de nitrato, consecuentemente fue adecuado utilizarlo como inóculo para el reactor de lotes secuenciados. El reactor SBR se inoculó inicialmente con una concentración de 200 mg de proteína microbiana por litro.

6.2 Medio de cultivo

La alimentación del reactor SBR se realizó mediante dos medios de cultivo utilizados como fuentes de nitrógeno y carbono, suministrados por separado para evitar la posible cristalización de sales. La concentración inicial en amonio en cada ciclo de operación fue de 72.4 ± 16.5 mg N/l. Se utilizó un medio de cultivo para el presente estudio de acuerdo a las relaciones C/N, C/S y C/P utilizadas por Silva (2011) (Tablas 3 y 4).

Tabla 3. Relaciones C/N, C/S y C/P (Silva, 2011).

C/N	C/S	C/P
2.6	6.8	6.2

Tabla 4. Composición química del medio de cultivo en el reactor SBR.

Fuente de nitrógeno (g/l)		Fuente de carbono (g/l)	
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.585	NaHCO ₃	4.573
NH ₄ Cl	0.474	CaCl ₂	0.032
KH ₂ PO ₄	0.459		
MgSO ₄	0.353		
NaCl	0.541		

6.3 Reactor de lotes secuenciados

Se utilizó un reactor de volumen nominal de 1 l (Microferm Fermentor, New Brunswick Scientific, mod. MF-114). La Figura 5 muestra el esquema general del SBR.

Todos los ensayos fueron realizados a temperatura ambiente ($25 \pm 5^\circ\text{C}$). La aireación en los cultivos se mantuvo constante y la agitación de 250 rpm. La concentración promedio de oxígeno disuelto se mantuvo a 5.8 ± 0.2 mg/l. El valor promedio de pH se mantuvo en un intervalo de 7-8 utilizando bicarbonato de sodio como amortiguador.

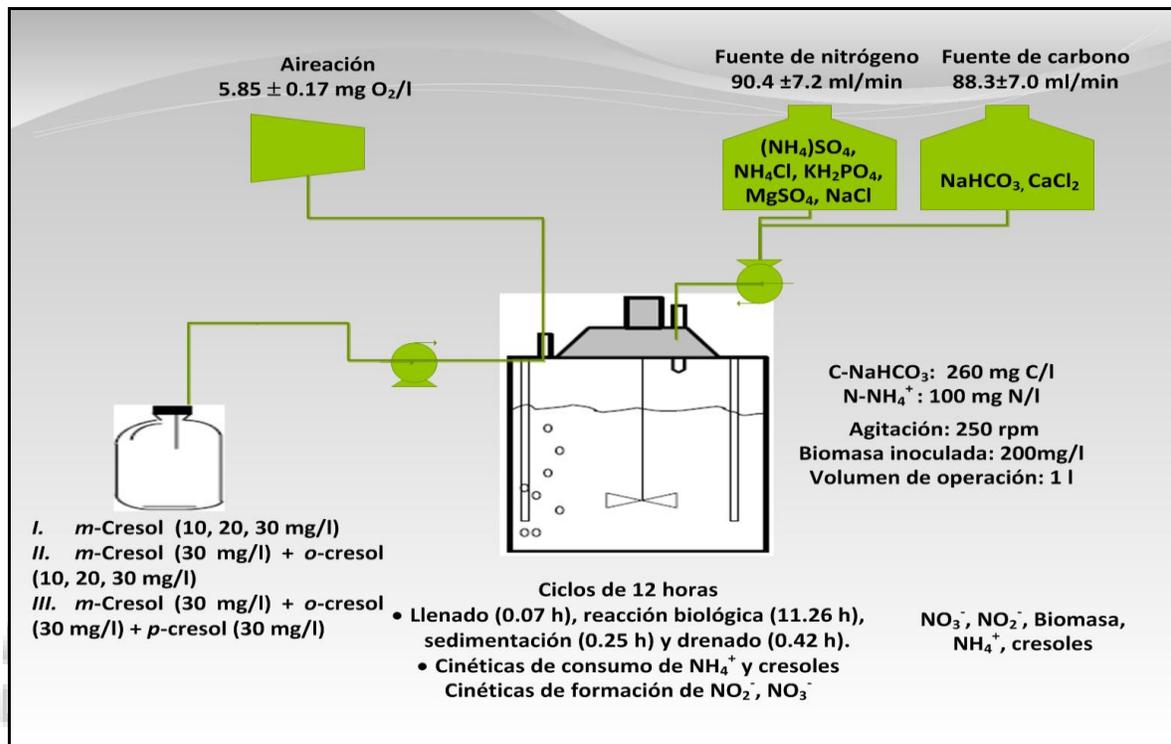


Figura 5. Esquema del SBR nitrificante.

Cada ciclo de operación de 12 h consistió de las siguientes fases: llenado (0.07 h), reacción biológica (11.26 h), sedimentación (0.25 h) y drenado (0.42 h).

Primeramente, se efectuaron ensayos abióticos control en el reactor. Esto se realizó con el fin de descartar posibles interferencias dentro del reactor como pueden ser reacción química con los componentes del medio de cultivo, adsorción en la unidad experimental y/o volatilización de los cresoles y garantizar la reproducibilidad de los estudios.

Posteriormente, se inoculó el reactor pero se operó bajo condiciones nitrificantes sin la adición de cresol para obtener un proceso respiratorio nitrificante estable con altos valores de

eficiencia de eliminación de amonio y de rendimiento de formación de nitrato. Finalmente, se procedió a la adición de los diferentes isómeros de acuerdo a la Tabla 5.

Tabla 5. Concentraciones iniciales de cresoles adicionados en el SBR nitrificante.

Compuesto(s)	Concentración (mg C/l)	Ciclos
<i>m</i> -Cresol	10	173-198
	20	199-226
	30	227-240
<i>m</i> -Cresol (30 mg C/l) + <i>o</i> -cresol	10	241-282
	20	283-310
	30	311-354
<i>m</i> -Cresol + <i>o</i> -cresol + <i>p</i> -cresol	30 cada cresol	355-413

6.4 Variables de respuesta

Para evaluar el proceso nitrificante en el SBR sin y con la adición de cresoles, se realizaron cinéticas de consumo de amonio y de formación de nitrito y nitrato a diferentes ciclos. Se determinaron las siguientes variables de respuesta: la eficiencia de consumo en amonio (E_{NH_4}), los rendimientos de formación de nitrito (Y_{NO_2}), nitrato (Y_{NO_3}) y biomasa (Y_{BM}) y las velocidades específicas de consumo de amonio (q_{NH_4}) y de formación de nitrato (q_{NO_3}).

La eficiencia (E) se define como la capacidad del consorcio nitrificante para consumir su sustrato y se calcula de acuerdo a la siguiente ecuación (1):

$$E = \left(\frac{[Sustrato\ inicial] - [Sustrato\ final]}{[Sustrato\ inicial]} \right) \times 100 \quad (1)$$

Especialidad en biotecnología

El rendimiento (Y) se define como la cantidad de producto (nitrito, nitrato o biomasa) formada a partir del sustrato consumido (ecuación 2). La importancia de esta variable radica en que determina qué vías metabólicas predominan en un proceso biológico.

$$Y = \frac{[\text{Producto formado}]}{[\text{Sustrato consumido}]} = \frac{[\text{Producto formado}]}{[\text{Sustrato inicial}] - [\text{Sustrato final}]} \quad (2)$$

Se determinaron las velocidades volumétricas (V) a partir de las cinéticas realizadas a través de una regresión lineal y se calcularon las velocidades específicas (q) con la ecuación 3:

$$q = \frac{v}{x} \quad (3)$$

Dónde: X es la concentración en biomasa.

Se utilizaron las mismas variables de respuesta para evaluar la capacidad del lodo en oxidar los diferentes cresoles en el SBR.

Las variables que son evaluadas en cada etapa se resumen a continuación en la Tabla 6.

Tabla 6. Variables de respuesta.

Etapa	Nitrificación	Oxidación de cresoles
Estabilización del proceso nitrificante	$E_{\text{NH}_4}, Y_{\text{NO}_3}, Y_{\text{NO}_2}, Y_{\text{BM}}, q_{\text{NH}_4}, q_{\text{NO}_3}$	--
Adición de cresoles	$E_{\text{NH}_4}, Y_{\text{NO}_3}, Y_{\text{NO}_2}, Y_{\text{BM}}, q_{\text{NH}_4}, q_{\text{NO}_3}$	$E_{m\text{-cresol}}, E_{o\text{-cresol}}, E_{p\text{-cresol}}, q_{m\text{-cresol}}, q_{o\text{-cresol}}, q_{p\text{-cresol}}$

6.5 Métodos analíticos

Se realizaron al menos tres curvas de calibración para garantizar la reproducibilidad de los diferentes métodos de análisis. Se analizaron los coeficientes de determinación y de variación en el valor de la pendiente (Tabla 7).

Tabla 7. Coeficientes de variación en la pendiente y coeficientes de regresión (R^2) para cada método analítico.

Análisis	Coeficiente de variación (%) (pendiente)	Coeficiente de determinación
Amonio	2.2	0.999 ± 0.001
<i>m</i> -Cresol	1.4	0.999 ± 0.001
<i>o</i> -Cresol	2.6	0.999 ± 0.001
<i>p</i> -Cresol	5.6	0.980 ± 0.019
Proteína microbiana	4.3	0.982 ± 0.008
Nitrito	3.6	0.997 ± 0.010
Nitrato	3.8	0.998 ± 0.020

Los métodos analíticos presentaron un coeficiente de variación en la pendiente menor que 6% y los valores de R^2 fueron cercanos a 1, lo que indica una alta reproducibilidad y linealidad de los métodos.

A continuación se describe cada método analítico con el que se analizó amonio, nitrito, nitrato, proteína microbiana, cresoles, oxígeno disuelto y pH.

6.5.1 Amonio

Se utilizó un electrodo selectivo (pHoenix electrode Co. Mod. NH331501). La prueba consiste en desplazar el equilibrio del par $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ en solución acuosa mediante la alcalinización de las muestras y así medir el gas amoniacado que pasa a través de una membrana selectiva (Figura 6).

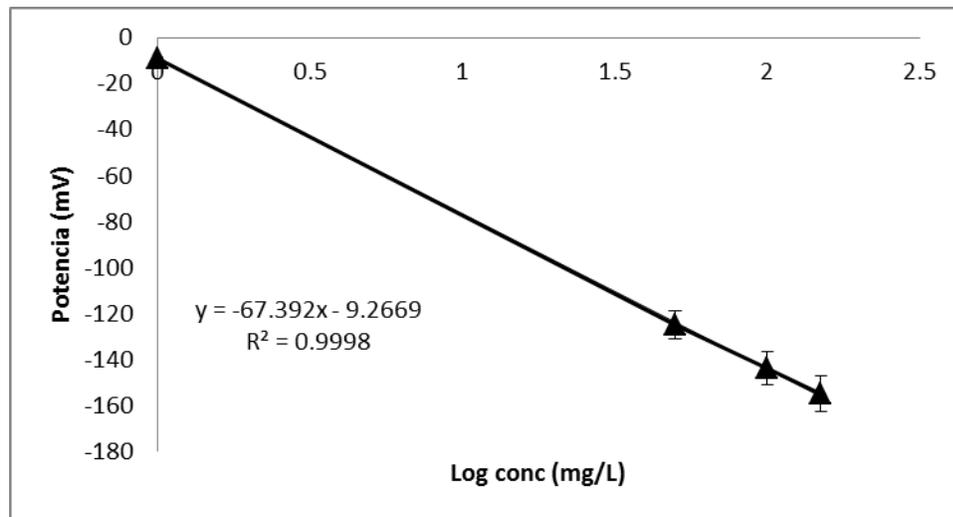


Figura 6. Curva de calibración para amonio.

6.5.2 Nitrito, nitrato

Para esta cuantificación, se utilizó un equipo HPLC (Perkin Elmer serie 200) y un equipo de electroforesis capilar (Beckman Coulter, proteomeLab PA 800). En la cromatografía líquida, los componentes a separar se añaden de forma soluble por la parte superior de la columna quedando retenidos en la misma, posteriormente los componentes se desplazan arrastrados por una fase móvil líquida, al final se obtiene un sistema de registro gráfico (cromatograma) que es un registro de picos donde para cada componente el área del pico es proporcional a su concentración (Figura 7).

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).

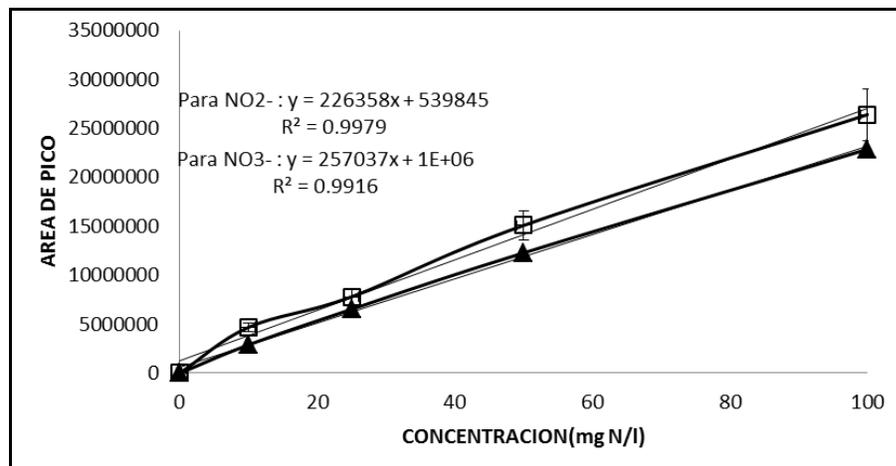


Figura 7. Curva de calibración para NO₂⁻ (▲) y NO₃⁻ (□).

6.5.3 Proteína microbiana

El método de Lolmede Ph., Jácome A., Vidart T. y Tejero I., (2000). Tratamiento de agua residual con elevado contenido de nitratos utilizando reactores de biomembrana aireados. *Ingeniería del agua*. 7,3. (1951) combina la reacción de Biuret con la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu (ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico) por la oxidación de tirosina, triptofano, cisteína, cistina de las cadenas polipeptídicas. El proceso de óxido-reducción se acompaña de la formación de un color azul característico en el complejo Cu-proteína y la posterior reducción de este complejo por el reactivo de Folin-Ciocalteu. Este método es útil para determinar pequeñas cantidades de proteína en una disolución. El desarrollo de color depende en gran medida del pH, que se debe mantener entre 10 y 10.5.

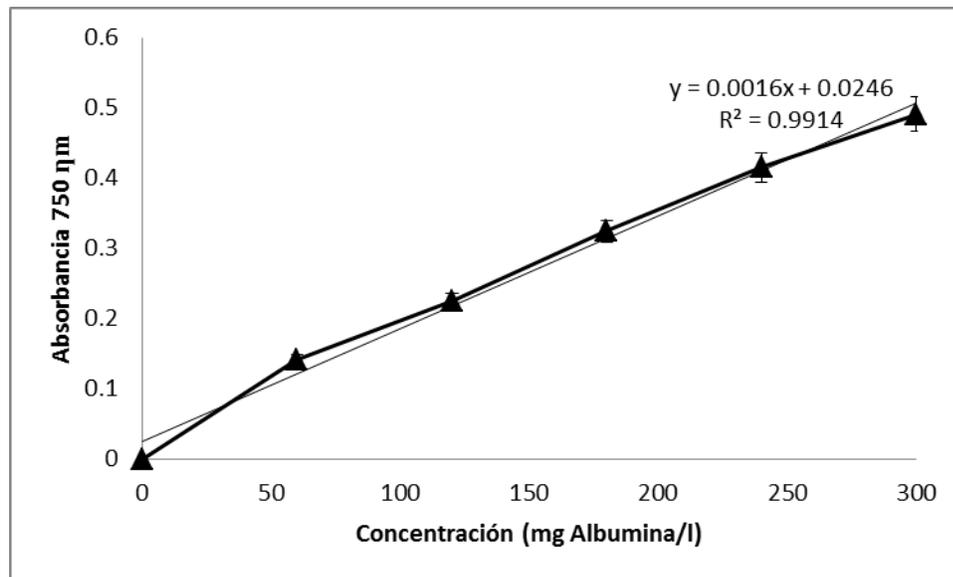


Figura 8. Curva de calibración para proteína.

6.5.4 Cresoles

La determinación de las concentraciones de cresoles en las muestras se llevó a cabo por HPLC (Perkin Elmer serie 200) (Figura 9). La separación de los compuestos fenólicos está determinada por la fuerza de las interacciones de los cresoles 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 empleó una columna Bondclone 10u C18 (Phenomenex, 300 x 3.9 mm). Se realizaron diversas pruebas para poder cuantificar a los cresoles en mezcla y se encontró que las mejores condiciones para separar al menos una mezcla binaria de cresoles fue medir a una longitud de onda de 254 nm y un flujo de 1 ml/min empleando una mezcla de acetonitrilo-agua (50:50 v/v). Bajo estas condiciones, se pudo separar el *o*-cresol de los otros dos isómeros pero no se pudo separar el *m*-cresol del *p*-cresol. En consecuencia, se pudo separar y cuantificar por HPLC los cresoles en las siguientes combinaciones binarias: *o*-cresol y *m*-cresol, *o*-cresol y *p*-cresol.

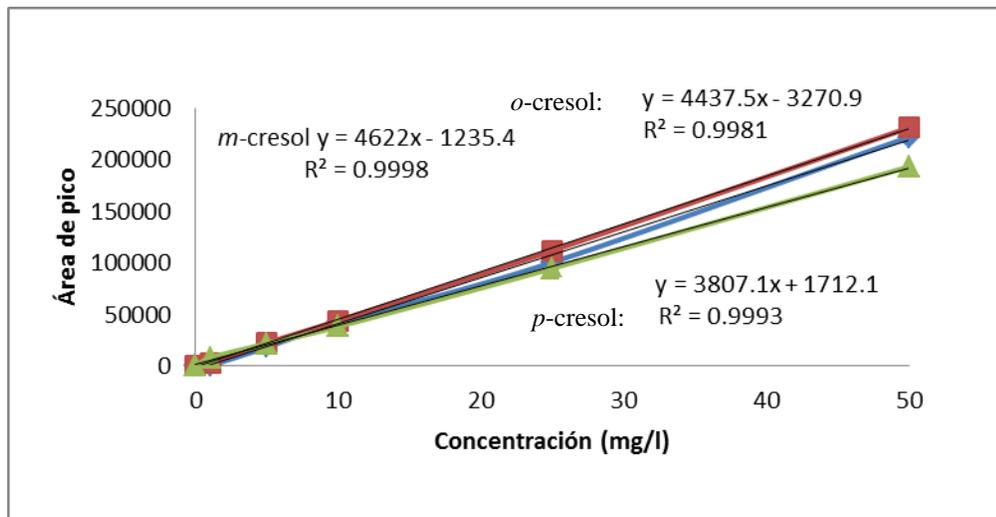


Figura 9. Curvas de calibración de *o*-cresol (●), *m*-cresol (■) y *p*-cresol(▲).

6.5.5 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 para las lecturas de oxígeno disuelto. El valor de pH fue medido mediante un medidor portátil (Digi-Sense, Cole Palmer) acoplado a un electrodo combinado de calomel y vidrio.

7 Resultados y Discusión

7.1 Ensayos abióticos en el SBR

Con el fin de descartar posibles pérdidas de *o*- y *m*-cresol del reactor SBR por fenómenos de adsorción, reacción química con los componentes del medio de cultivo y/o volatilización, se procedió a realizar ensayos abióticos sin biomasa (Figura 10). Se realizó el muestreo a diferentes tiempos (2, 5, 15, 30 y 60 minutos) dentro de un mismo ciclo de operación.

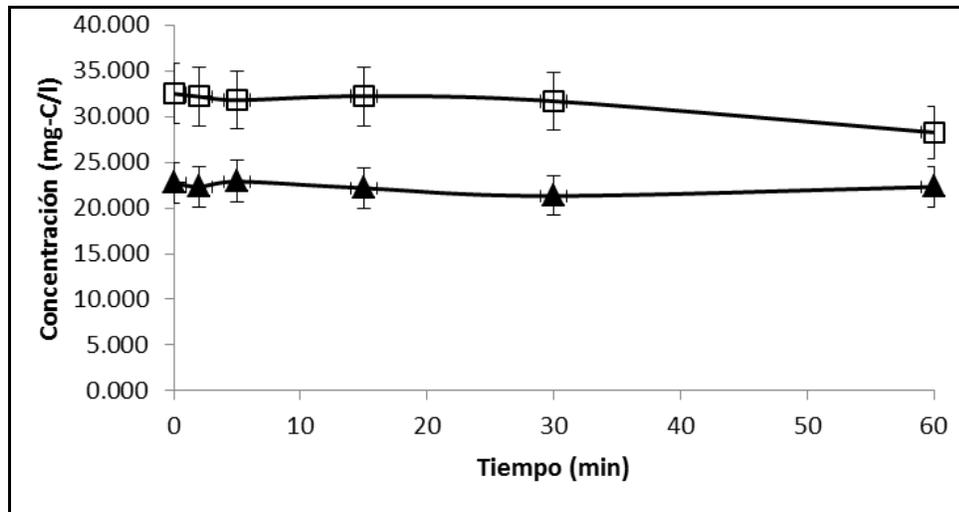


Figura 10. Controles abióticos con *o*-cresol (□) y *m*-cresol (▲) en el reactor SBR.

Si ocurre volatilización, adsorción y/o reacción química de los cresoles, esto se da en los primeros minutos que se han añadido al reactor. La Figura 10 muestra que en el transcurso de 1 hora las concentraciones de *o*-cresol y *m*-cresol no cambiaron significativamente, de lo cual se puede deducir que no hubo pérdida de los compuestos fenólicos bajo las condiciones experimentales utilizadas en el sistema. En un estudio previo desarrollado bajo condiciones de operación similares a las utilizadas en el presente trabajo, Texier y Gómez (2007) demostraron que no hubo pérdida significativa de *p*-cresol en un reactor de lote secuenciado durante un ensayo abiótico control.

7.2 Estabilización del proceso nitrificante sin adición de cresoles

Se llevó a cabo la estabilización del proceso nitrificante dentro del reactor, obteniendo altos valores de consumo de amonio y nitrato como producto mayoritario, y no se encontró nitrito en el efluente (Figura 11).

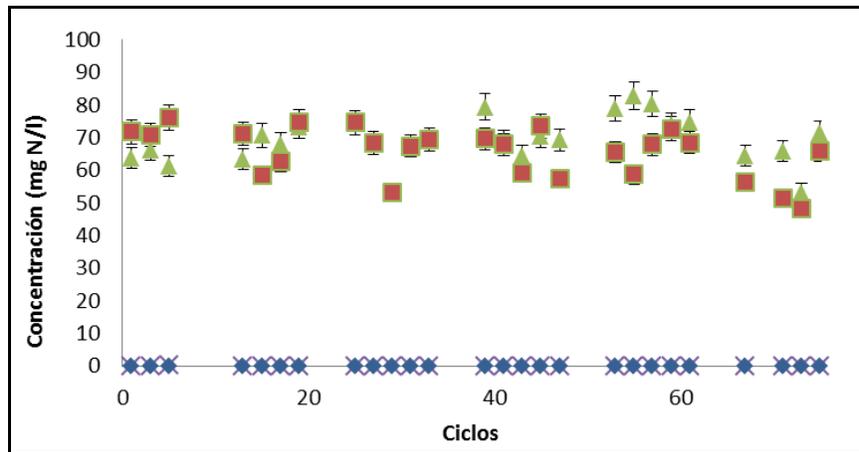


Figura 11. Estabilización del proceso nitrificante en el SBR NH_4^+ inicial (\blacktriangle), NO_3^- final (\blacksquare), NO_2^- final (\times), NH_4^+ final (\blacklozenge).

El balance de nitrógeno correspondiente se presenta a continuación (mg N/l):

$[N - \text{NH}_4^+]_i$	$[N - \text{NH}_4^+]_f$	$[N - \text{NO}_3^-]_f$	$[N - \text{NO}_2^-]_f$	$[N - \text{BM}]$
69.7 ± 8.1	0	65.4 ± 7.1	0	0.30 ± 0.03

Las desviaciones estándares bajas muestran que el proceso nitrificante fue estable. En la Tabla 8, se presentan las eficiencias y los rendimientos de la nitrificación en el reactor control (sin adición de cresoles) a diferentes ciclos de operación. En todos los ciclos, la E_{NH_4} fue del 100%, el Y_{NO_2} de cero y el Y_{NO_3} cercano a un valor de 1. Estos resultados muestran que las condiciones de operación utilizadas para el SBR fueron adecuadas para obtener un proceso nitrificante eficiente, con alto rendimiento de nitrato y estable fisiológicamente.

Tabla 8. Eficiencias y rendimientos del proceso respiratorio nitrificante en el reactor control sin adición de cresoles.

Ciclo	E_{NH_4} (%)	$Y_{NO_2}^*$	$Y_{NO_3}^*$
3	100	0	1.07
17	100	0	0.92
55	100	0	0.84
73	100	0	0.91
99	100	0	0.87

*mg N/mg N-NH₄⁺ consumido.

La Figura 12 es un ejemplo de los perfiles cinéticos obtenidos en el reactor SBR (ciclo 73) que muestra los valores de concentración encontrados a lo largo del tiempo para amonio, nitrito y nitrato. Se observa un consumo total de amonio con una formación transitoria de nitrito, obteniéndose a las 5 h de cultivo un efluente libre de nitrito y conteniendo nitrato como producto mayoritario de la oxidación del amonio.

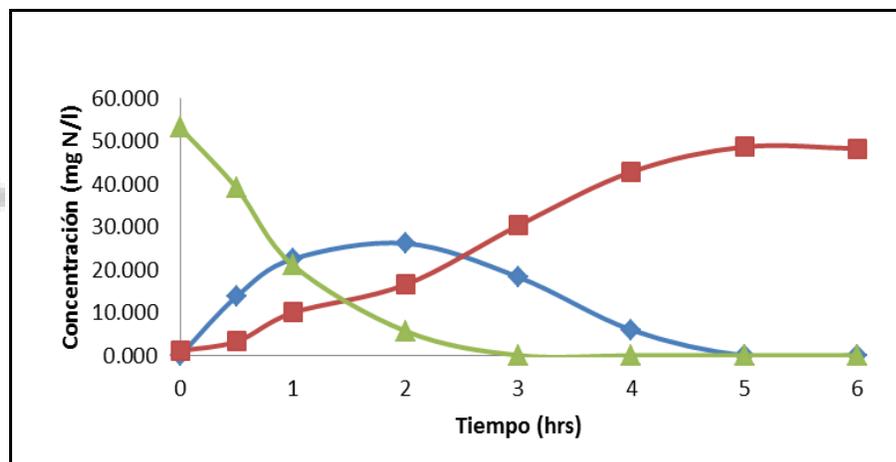


Figura 12. Cinéticas de la nitrificación en el SBR control nitrito (◆), nitrato (■) y amonio (▲) (ciclo 73).

7.3 Crecimiento microbiano

Se midió la concentración de proteína microbiana a lo largo de los ciclos del reactor control (Figura 13). Se encontró que la velocidad volumétrica de crecimiento celular fue de 1.9 ± 0.2 mg proteína/l.ciclo, resultando en un rendimiento en biomasa de 0.004 ± 0.001 mg N-proteína/mg N-NH₄⁺ consumido. Esto demuestra que el crecimiento celular fue bajo a través de un proceso respiratorio principalmente desasimilativo.

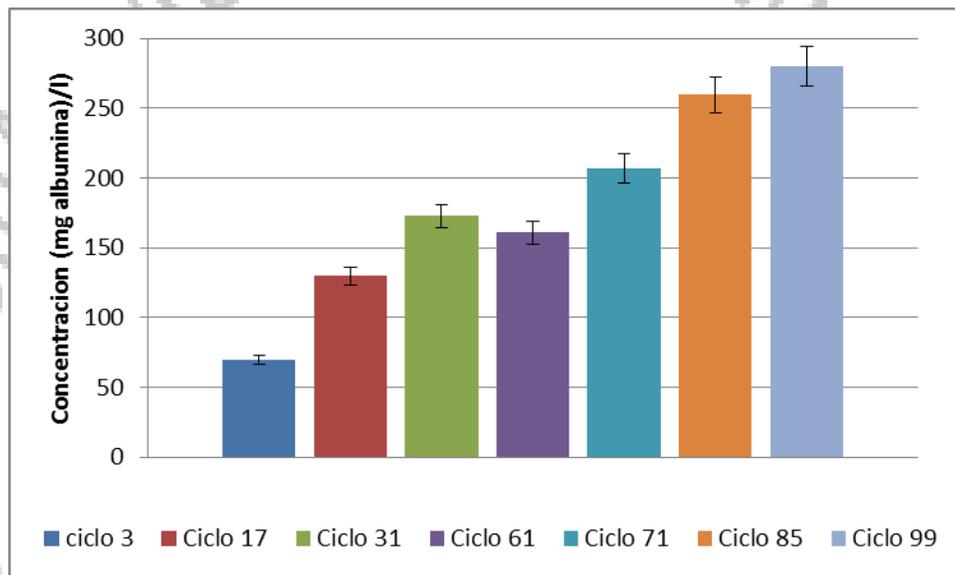


Figura 13. Crecimiento microbiano en el SBR control sin adición de cresoles.

7.4 Nitrificación en el SBR alimentado con cresoles

La Tabla 9 presenta de manera resumida la secuencia de alimentación de los diferentes cresoles al SBR y sus respectivas concentraciones iniciales.

Tabla 9. Concentraciones de cresoles añadidas al reactor y sus respectivos ciclos de operación.

Ciclo	Concentración de cresol (mg C/l)
173-240	<i>m</i> -cresol (10, 20, 30)
241-354	<i>m</i> -cresol (30) + <i>o</i> -cresol (10, 20, 30)
355-413	<i>m</i> -cresol (30) + <i>o</i> -cresol (30) + <i>p</i> -cresol (30)

El perfil nitrificante del SBR alimentado con cresoles se presenta en la Figura 14. Se observó una completa oxidación de amonio, la formación mayoritaria de nitrato sin acumulación de nitrito en el efluente, con lo que se puede concluir que la adición de los cresoles no afectó significativamente la actividad nitrificante del consorcio. Todo el amonio fue oxidado a nitrato ($E_{\text{NH}_4} = 100\%$ y $Y_{\text{NO}_3} = 0.91 \pm 0.04$) (Tabla 10). Se evidenció que los tres isómeros del cresol en mezcla no afectaron la nitrificación en el SBR en términos de eficiencia y rendimiento.

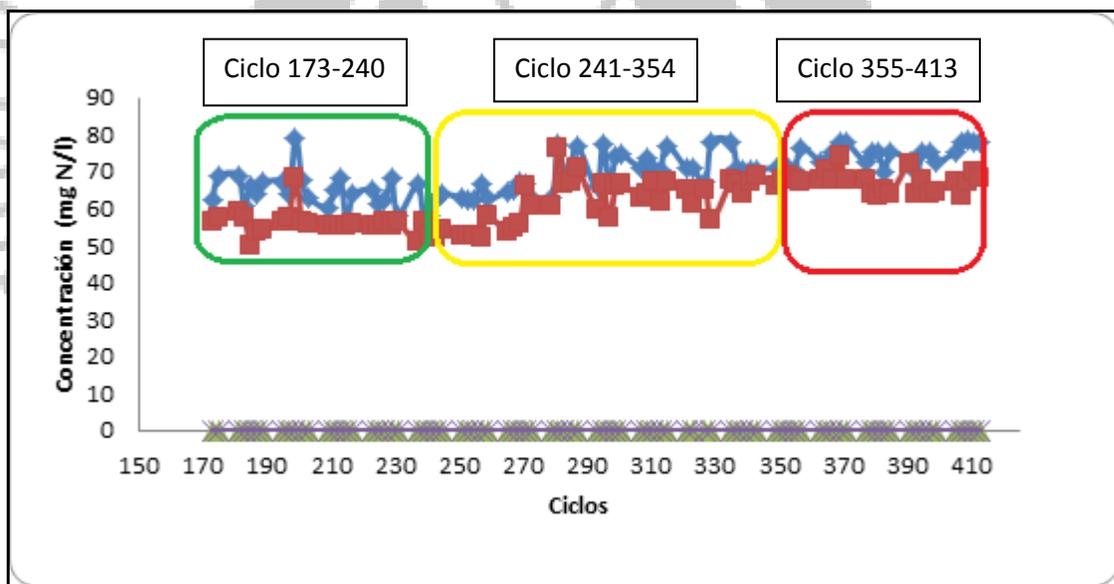


Figura 14. Perfil nitrificante del SBR alimentado con cresoles NH_4^+ inicial (◆), NO_3^- final (■), NO_2^- final (▲), NH_4^+ final (×).

Tabla 10. Eficiencias y rendimientos del proceso respiratorio nitrificante en el reactor SBR alimentado con cresoles.

Ciclo	Concentración de cresol (mg C/L)	E_{NH_4} (%)	$Y_{NO_2}^*$	$Y_{NO_3}^*$
1-172	0	100	0	0.92 ± 0.10
173-240	<i>m</i> -cresol (10, 20, 30)	100	0	0.87 ± 0.06
241-354	<i>m</i> -cresol (30) + <i>o</i> -cresol (10, 20, 30)	100	0	0.95 ± 0.02
355-413	<i>m</i> -cresol (30) + <i>o</i> -cresol (30) + <i>p</i> -cresol (30)	100	0	0.92 ± 0.05

*mg N/mg N-NH₄⁺ consumido.

7.5 Estudio cinético de la nitrificación en el SBR alimentado con cresoles

Se presentan los valores de las velocidades específicas de la nitrificación sin y con adición de cresoles en el reactor en la Tabla 11.

Tabla 11. Velocidades específicas de la nitrificación en el SBR alimentado con cresoles.

Concentración (mg C/l)	Ciclo	$q_{NH_4}^*$	$q_{NO_3}^*$
0	1-172	0.080 ± 0.003	0.030 ± 0.001
<i>m</i> -cresol (10)	173	0.027 ± 0.001	0.003 ± 0.001
<i>m</i> -cresol (10)	185	0.035 ± 0.001	0.041 ± 0.002
<i>m</i> -cresol (20)	199	0.045 ± 0.002	0.047 ± 0.002
<i>m</i> -cresol (20)	213	0.037 ± 0.001	0.020 ± 0.001
<i>m</i> -cresol (30)	227	0.054 ± 0.001	0.022 ± 0.001
<i>m</i> -cresol (30) + <i>o</i> -cresol (10)	241	0.038 ± 0.001	0.019 ± 0.001
<i>m</i> -cresol (30) + <i>o</i> -cresol (10)	257	0.043 ± 0.001	0.024 ± 0.001
<i>m</i> -cresol (30) + <i>o</i> -cresol (20)	283	0.058 ± 0.007	0.028 ± 0.004
<i>m</i> -cresol (30) + <i>o</i> -cresol (20)	297	0.051 ± 0.001	0.020 ± 0.001

<i>m</i> -cresol (30) + <i>o</i> -cresol (30)	311	0.063±0.001	0.020±0.001
<i>m</i> -cresol (30) + <i>o</i> -cresol (30)	339	0.047±0.002	0.030±0.002
<i>m</i> -cresol (30) + <i>o</i> -cresol (30) + <i>p</i> -cresol (30)	355	0.067±0.009	0.029±0.004
<i>m</i> -cresol (30) + <i>o</i> -cresol (30) + <i>p</i> -cresol (30)	369	0.060±0.006	0.028±0.003

*mg N/mg proteína microbiana.h

Cuando se añadió *m*-cresol (10 mg C/l) por primera vez al SBR (ciclo 173), este compuesto provocó una inhibición del proceso nitrificante con una disminución del 66% en la q_{NH_4} y del 90% en la q_{NO_3} respecto a los valores obtenidos en el reactor sin adición de cresol. Estos resultados muestran el efecto inhibitorio del *m*-cresol sobre la nitrificación, afectando más a la nitrito oxidación que a la amonio oxidación. Estos resultados coinciden con lo previamente reportado por Zepeda y col. (2012) en un reactor SBR alimentado con 50 mg N- NH_4^+ /l donde se observó también una importante disminución de q_{NH_4} (- 74%) y q_{NO_3} (- 59%) al alimentar el reactor por primera vez con 12.5 mg C-*m*-cresol/l. Sin embargo, en este caso, la amonio oxidación fue más sensible a la inhibición del *m*-cresol que la nitrito oxidación. Esto sugiere que el efecto inhibitorio sobre el metabolismo nitrificante puede ser diferente en función del inóculo (origen, historial, composición microbiológica y/o estado fisiológico nitrificante previo) y de las condiciones de operación. Al aumentar el número de ciclos y la concentración de *m*-cresol de 10 a 30 mg C/l, se observó una tendencia general al aumento para las velocidades nitrificantes. q_{NH_4} aumentó del doble y q_{NO_3} de hasta 7 veces sus valores obtenidos en el primer ciclo de adición de *m*-cresol (ciclo 173). Los valores no alcanzaron los valores obtenidos en el reactor control, indicando que el *m*-cresol siguió presentando un efecto inhibitorio en la nitrificación, sin embargo la inhibición fue disminuyendo a través de los ciclos.

En el primer ciclo de adición de *o*-cresol (10 mg C/l) en mezcla con el *m*-cresol (30 mg C/l) (ciclo 241), los valores de q_{NH_4} y q_{NO_3} disminuyeron un 53 y 37% en relación al control. Respecto a los valores de velocidades del ciclo 227 cuando el reactor fue alimentado solamente con *m*-cresol (30 mg C/l), q_{NH_4} disminuyó del 30% y q_{NO_3} del 14% al adicionar *o*-

cresol al reactor. Estos porcentajes de disminución en las velocidades fueron menores que con la sola adición de *m*-cresol. Esto muestra que la inhibición causada por el *o*-cresol fue menor que la inhibición provocada por el *m*-cresol. En su estudio realizado con lodos activados consumidores de cresoles, Ho y col. (2010) determinaron una menor constante de inhibición para el *m*-cresol ($K_i = 116 \text{ mg/l}$) que para el *o*-cresol ($K_i = 192 \text{ mg/l}$) y el *p*-cresol ($K_i = 211 \text{ mg/l}$), indicando que el *m*-cresol sería más inhibitorio que los otros dos isómeros. Sin embargo, Acuña-Argüelles y col. (2003), utilizando un cultivo mixto aerobio consumidor de compuestos fenólicos, reportaron una menor K_i para el *o*-cresol (3.2 mM) que para el *m*-cresol (5.4 mM) y el *p*-cresol (6.3 mM), indicando que en este estudio, el *o*-cresol fue el más inhibitorio. De acuerdo a estos autores, la posición del grupo metilo en la molécula juega un papel importante en el efecto inhibitorio de los isómeros del cresol. Cabe destacar que estos estudios previos se enfocaron a la biodegradación e inhibición por sustrato de los cresoles por lodos aerobios (modelo de Haldane) sin evaluar el efecto sobre la nitrificación. Nuevamente al aumentar el número de ciclos y la concentración en *o*-cresol (10 a 30 mg C/l), se observó un aumento en las velocidades específicas de la nitrificación, indicando que la inhibición fue disminuyendo a través de los ciclos.

Cuando se adicionó *p*-cresol (30 mg C/l) por primera vez en el reactor en mezcla con *m*-cresol (30 mg C/l) y *o*-cresol (30 mg C/l), la q_{NH_4} siguió aumentando y la q_{NO_3} no cambió significativamente. Esto indica que el *p*-cresol no causó inhibición en la nitrificación bajo este esquema de alimentación con cresoles del reactor nitrificante. Se ha demostrado previamente el efecto inhibitorio del *p*-cresol sobre la nitrificación en un reactor SBR (Texier y Gómez, 2007). Sin embargo, en el presente trabajo, la alimentación previa del reactor con *m*-cresol y *o*-cresol durante 3 meses podría explicar en parte la diferencia en los resultados con *p*-cresol. Esta alimentación previa con dos de los isómeros pudo haber favorecido una mayor tolerancia del lodo al *p*-cresol a través de una adaptación metabólica para degradar los cresoles a través de los ciclos.

Al ciclo 369, q_{NH_4} y q_{NO_3} alcanzaron valores de 0.060 y 0.028 mg N/mg proteína.h, respectivamente, representando el 75 y 93% de los valores obtenidos en el reactor control sin adición de cresoles. Estos resultados muestran que el uso del SBR puede ser una buena

alternativa para favorecer la disminución del efecto inhibitorio de los cresoles sobre la nitrificación a través de los ciclos. El lodo en el SBR fue capaz de oxidar completamente el amonio ($145 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{l.d}$) a nitrato con alta eficiencia y alto rendimiento a pesar de la alimentación del reactor con una mezcla ternaria de los isómeros del cresol a 30 mg C/l cada uno ($180 \text{ mg C-cresoles/l.d}$).

7.6 Oxidación de los cresoles por el lodo nitrificante

En la Figura 15, se muestra que en el primer ciclo de adición de *m*-cresol al SBR (ciclo 173), no hubo consumo significativo de *m*-cresol a lo largo de 6 h de cultivo. En este mismo ciclo, se observó la mayor inhibición en la nitrificación de acuerdo a los datos de velocidades específicas anteriormente presentados. Posteriormente, en el ciclo 185, todo el *m*-cresol (10 mg C/l) fue consumido en tan solo 1 h, indicando que el lodo adquirió una mayor capacidad metabólica para oxidar al *m*-cresol. Al ciclo 199, el lodo fue capaz de consumir 20 mg C/l de *m*-cresol en menos de 10 min.

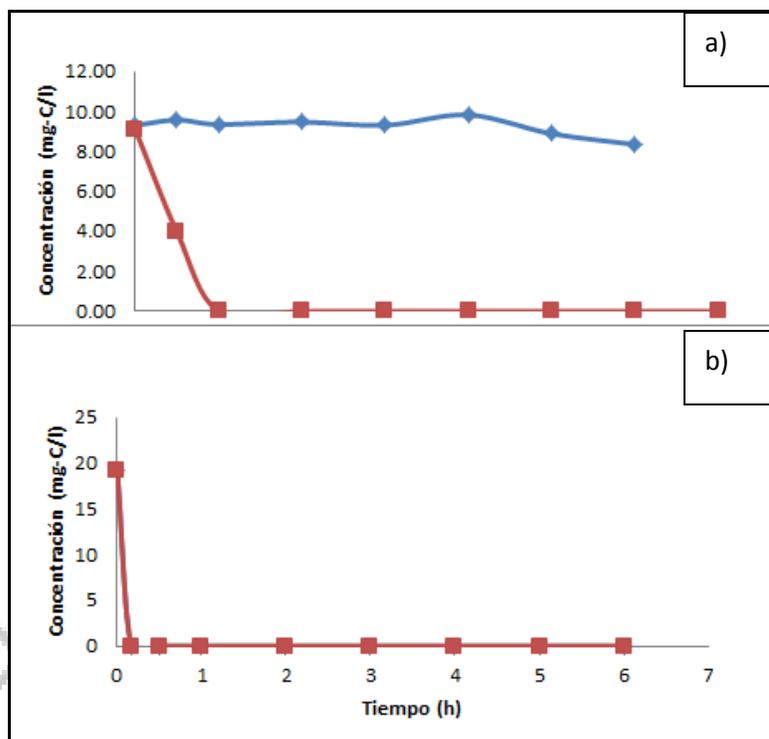


Figura 15. Cinética de consumo de *m*-cresol en el SBR nitrificante: a) 10 mg C/l en el ciclo 173 (♦) y el ciclo 185 (■); b) 20 mg C/l en el ciclo 199.

La velocidad específica de oxidación del *m*-cresol aumentó de 77 veces su valor entre el ciclo 173 y el ciclo 185 y de 12 veces entre el ciclo 185 y el 199, alcanzando un valor máximo de 0.450 mg C/mg proteína microbiana.h al ciclo 227 (Tabla 12). Estos resultados muestran que el lodo adquirió una mayor capacidad metabólica para oxidar al *m*-cresol a través de los ciclos, la cual podría ser relacionada con un mayor crecimiento de las cepas consumidoras de cresoles del consorcio y/o la inducción de enzimas involucradas en la degradación de cresoles. Cabe destacar que al aumentar la velocidad de consumo de *m*-cresol, también aumentaron las velocidades de la nitrificación (Tabla 11). Esto muestra que la disminución del efecto inhibitorio del *m*-cresol a través de los ciclos del SBR está relacionada con una mayor capacidad metabólica del consorcio en consumir el compuesto fenólico inhibitorio.

Tabla 12. Velocidades específicas de consumo de *m*-cresol, *o*-cresol y *p*-cresol en el SBR.

Ciclo	Concentración (mg C/l)	q (mg C/mg prot. h)		
		<i>m</i> -cresol	<i>o</i> -cresol	<i>p</i> -cresol
173	<i>m</i> -cresol (10)	0.0003±0.0001	--	--
185	<i>m</i> -cresol (10)	0.023±0.001	--	--
199	<i>m</i> -cresol (20)	0.277±0.011	--	--
213	<i>m</i> -cresol (20)	0.289±0.010	--	--
227	<i>m</i> -cresol (30)	0.450±0.009	--	--
241	<i>m</i> -cresol (30) + <i>o</i> -cresol (10)	0.137±0.003	0.024±0.001	--
257	<i>m</i> -cresol (30) + <i>o</i> -cresol (10)	0.140±0.003	0.158±0.003	--
283	<i>m</i> -cresol (30) + <i>o</i> -cresol (20)	0.026±0.003	0.019±0.002	--
297	<i>m</i> -cresol (30) + <i>o</i> -cresol (20)	0.062±0.001	0.024±0.001	--
311	<i>m</i> -cresol (30) + <i>o</i> -cresol (30)	0.189±0.004	0.096±0.002	--
339	<i>m</i> -cresol (30) + <i>o</i> -cresol (30)	0.312±0.016	0.061±0.003	--
355	<i>m</i> -, <i>o</i> - y <i>p</i> -cresol (30 cada uno)	--	0.094±0.012	0.193±0.025*
369	<i>m</i> -, <i>o</i> - y <i>p</i> -cresol (30 cada uno)	--	0.073±0.007	0.139±0.014*

*Velocidad de consumo de (*p*-cr + *m*-cr) ya que los dos isómeros no se pudieron separar por HPLC.

Posteriormente en el ciclo 241, se añadió *o*-cresol a 10 mg C/l junto con el *m*-cresol a 30 mg C/l y se observó que los dos isómeros fueron completamente oxidados en 1 h (Figura 16).

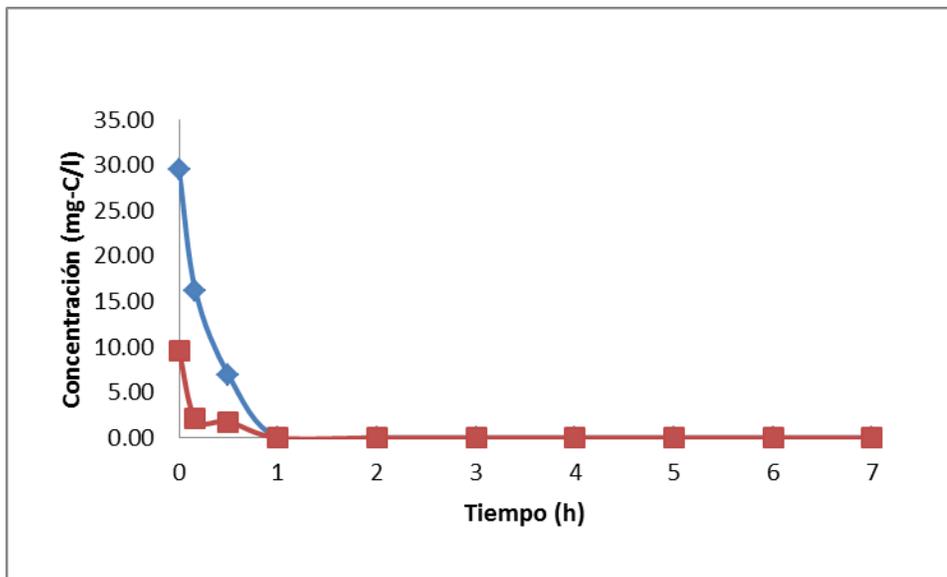


Figura 16. Cinéticas de oxidación de *m*-cresol (♦) (30 mg C/l) y *o*-cresol (■) (10 mg C/l) en el ciclo 241 del SBR nitrificante.

Es interesante observar que la velocidad de oxidación del *m*-cresol disminuyó de 70% cuando se añadió *o*-cresol (10 mg C/l) por primera vez al reactor, mostrando el efecto inhibitorio del *o*-cresol sobre la capacidad metabólica del lodo para consumir el *m*-cresol (Tabla 12). Estos resultados están de acuerdo con lo reportado por Zepeda y col. (2007) en su estudio con mezclas de compuestos BTX (benceno, tolueno y xileno). Estos autores enfatizan en la importancia de considerar las posibles interacciones (sin interacción, inhibición, inducción, co-metabolismo...) que pueden ocurrir en la biotransformación de mezclas de compuestos aromáticos en sistemas de nitrificación.

Del ciclo 241 al ciclo 257, la velocidad de consumo de *o*-cresol aumentó su valor de 7 veces, mostrando una mayor capacidad metabólica del lodo para oxidar también el *o*-cresol. Al aumentar la concentración inicial de *o*-cresol a 20 mg C/l (ciclo 283), las velocidades de oxidación tanto del *m*-cresol como del *o*-cresol disminuyeron, probablemente por el efecto inhibitorio del *o*-cresol y posteriormente aumentaron de nuevo. Es destacable que a pesar de la adición de 30 mg C-*o*-cresol/l al ciclo 311, las velocidades siguieron en aumento. La tendencia general al incremento del ciclo 241 al ciclo 339 de las velocidades de consumo de los dos

isómeros corresponde con la disminución de su efecto inhibitorio en la nitrificación (Tabla 11). Cabe hacer notar también que en la mayoría de los ciclos, el *o*-cresol fue más lentamente consumido que el *m*-cresol, indicando que el *o*-cresol fue el más recalcitrante de los dos isómeros (Tabla 12). Estos resultados concuerdan con los citados por Lee y col. (2010) en su estudio realizado con gránulos aerobios donde los autores identifican al *o*-cresol como el compuesto más recalcitrante con la siguiente secuencia de eliminación de los isómeros del cresol: *m*-cresol > *p*-cresol > *o*-cresol. Silva y col. (2014) reportaron previamente una velocidad de consumo de *p*-cresol de 0.91 mg C/mg proteína microbiana.h en un reactor SBR con un lodo nitrificante. Este valor es mayor que las velocidades obtenidas en el presente estudio para el *o*- y el *m*-cresol. De acuerdo a Ho y col. (2010), el *p*-cresol fue el isómero de los tres más rápidamente consumido en lodos activados. Estos resultados muestran que los isómeros presentan una recalcitrancia distinta en función de la posición del grupo funcional.

Por último, se añadieron los tres isómeros del cresol al reactor nitrificante a una concentración de 30 mg C/l cada uno (Tabla 12). En los ciclos 355 y 369, se obtuvo la completa oxidación de los tres isómeros del cresol en menos de 2 h, obteniéndose eficiencias ($E_{m\text{-cresol}}$, $E_{o\text{-cresol}}$ y $E_{p\text{-cresol}}$) del 100%. No se detectó por HPLC la presencia de intermediarios de la oxidación de los cresoles en el efluente.

8 Conclusiones

El lodo nitrificante presentó la capacidad metabólica para oxidar simultáneamente amonio, *m*-cresol, *o*-cresol y *p*-cresol en un reactor SBR, obteniéndose eficiencias de consumo del 100%. De manera general, se observó que las velocidades específicas de oxidación de los isómeros aumentaron con el número de ciclos de operación, mostrando una mayor capacidad metabólica del lodo en consumir los tres cresoles. En consecuencia a esta adaptación metabólica del lodo en oxidar los compuestos fenólicos, disminuyó la inhibición en el proceso nitrificante. 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.

9 Bibliografía

- 1- 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.
- 2- 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.
- 3- Autenrieth, R.L., Bonner, J.S., Akgerman, A., Okaygun, M. y McCrery, E.M. (1991). Biodegradation of phenolic waste. *Journal of Hazardous Materials*. 28, 29-53.
- 4- Bédard C., Knowles R (1989). Physiology, biochemistry, and specific inhibitors of CH_4 , NH_4^+ , and CO oxidation by methanotrophs and nitrifiers. *Biology and Molecular Biology Review*. 53(1):68.
- 5- Bejarano D. (2010). Efecto inhibitorio del sulfuro sobre un proceso respiratorio nitrificante. Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México.
- 6- Beristain-Cardoso R., Pérez-González D. N., González-Blanco G., Gómez J. (2011). Simultaneous oxidation of ammonium, *p*-cresol and sulfide using a nitrifying sludge in a multipurpose biorreactor: A novel alternative. *Bioresource Technology*. 102, 3623-3625.
- 7- 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.
- 8- Cervantes F., Pérez J., Gómez J. (2000). Avances en la Eliminación Biológica del Nitrógeno de las Aguas Residuales. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 42:73-82.

- 9- Conn E. y Stumpf P.K. (1993). Bioquímica fundamental. 3era ed. Limusa noriega editores. México pp. 631.
- 10 Cuervo-López F., Martínez-Hernández S., Texier A.-C. y Gómez J. (2009). Principles of denitrifying processes. Environmental technologies to treat nitrogen pollution. 1ra edición. Editorial: IWA Publishing, London. pp 41-54.
- 11 Ferrara de G., Ramírez A. (2010). Influencia de la relación C:N en la remoción de nitrógeno usando un sistema combinado de reactores por carga secuencial. *Revista de la Facultad de Ingeniería U.C.V.* 25:4 pp. 41–51.
- 12 Gerardi M.H. (2002). Nitrification and Denitrification in the Activated Sludge Process. Editorial: Wiley-Interscience, John Wiley & Sons, Inc., New York.
- 13 Hooper A. and Terry K. (1973). Specific Inhibitors of Ammonia Oxidation in *Nitrosomonas*. *Journal of Bacteriology*. 115(2): 480–485.
- 14 Lee Duu-Jong Lee, Ho Kuo-Ling y Yu-You Chen (2010). Degradation of cresols by phenol-acclimated aerobic granules. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 89:209–215.
- 15 Lolmede Ph., Jácome A., Vidart T. y Tejero I., (2000). Tratamiento de agua residual con elevado contenido de nitratos utilizando reactores de biomembrana aireados. *Ingeniería del agua*. 7,3.
- 16 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.
- 17 Mace S. y Mata-Alvarez J. (2002). Utilization of SBR technology for wastewater treatment: An overview. *Ind. Eng. Chem. Res.* 41(23), 5539-5553.
- 18 Martínez-Hernández S., Texier A.-C., Cuervo-López F.M., Gómez J. (2011). 2-chlorophenol consumption and its effect on the nitrifying sludge. *Journal of*

Hazardous Materials. 185, 1592-1595.

- 19 Martínez S. (2007). Análisis ecofisiológico de la desnitrificación en presencia de acetato y tolueno. Tesis de Doctorado en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México.
- 20 Monroy O., Fama G., Meraz M., Montoya L. y Macarie H. (2000). Anaerobic digestion for wastewater treatment in Mexico: State of the technology. *Water Research*. 36, 1803-1816.
- 21 Norma Oficial Mexicana, NOM-052-SEMARNAT-1993. Diario Oficial de la Federación. 23 de octubre de 1993.
- 22 Olmos A., Olguín 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.
- 23 Pérez-Alfaro J. E., Buitrón G., Gómez J., Texier A.-C. y Cuervo-López F. M. (2013). Kinetic and Physiological Evaluation of Ammonium and Nitrite Oxidation Processes in Presence of 2-Chlorophenol. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 169, 990-1000.
- 24 Prosser J.I. (1989). Autotrophic nitrification in bacteria. *Advances in Microbial Physiology*. 30, 125-181.
- 25 SEMARNAT. (2008). Compendio de estadísticas ambientales. Informe de la situación del medio ambiente en México, México; Gobierno federal.
- 26 Silva C.D., Gómez J., Houbron E., Cuervo-Lopez F.M., Texier A.-C. (2009). *p*-Cresol biotransformation by nitrifying consortium. *Chemosphere*. 75,1387-1391.
- 27 Silva Luna C. D. (2011). Estudio fisiológico de la nitrificación y oxidación del *p*-cresol en un consorcio nitrificante. Tesis de Doctorado en Biotecnología. Universidad

Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México.

- 28 Silva C.D., Cuervo-López F.M., Gómez J. y Texier A.-C. (2011a). Nitrite effect on ammonium and nitrite oxidizing processes in a nitrifying sludge. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 27, 1241-1245.
- 29 Silva C.D., Gómez J., Beristain-Cardoso R. (2011b). Simultaneous removal of 2-chlorophenol, phenol, *p*-cresol and *p*-hydroxybenzaldehyde under nitrifying conditions: Kinetic study. *Bioresource Technology*. 102, 6464-6468.
- 30 Tchobanoglous G. y Burton F.L. (1991). Metcalf & Eddy Wastewater engineering: Treatment, disposal and reuse. 3ra ed. McGraw-Hill, New York. pp. 735-740.
- 31 Téllez-Pérez S.K., Silva C.D., Texier A.-C. (2012). Oxidación simultánea de amonio y *p*-hidroxibenzaldehído en un reactor de lotes secuenciados. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 12, 97-104.
- 32 Texier A.-C. y Gómez J. (2002). Tolerance of nitrifying sludge to *p*-cresol. *Biotechnology Letters*. 24, 321-324.
- 33 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.
- 34 Texier A.-C. y Gómez J. (2007). Simultaneous nitrification and *p*-cresol oxidation in a nitrifying sequencing batch reactor. *Water Research*. 41, 315-322.
- 35 USEPA. (1986). Quality criteria for wáter. Washington DC; Office of wáter regulation.
- 36 Veeresh G.S., Kumar P., Mehrotra I. (2005). Treatment of phenol and cresols in up flow anaerobic sludge blanket (UASB) process: a review. *Water Research*. 39, 154-170.
- 37 Weinberger R. (1993). Practical capillary electrophoresis. Academic Press, San Diego CA. pp 6-7.

- 38 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.
- 39 Yang L. y Alleman J. E., (1992). Investigation of Batchwise Nitrite Build-Up by an Enriched Nitrification Culture. *Water Science & Technology*. 26, 997–1005
- 40 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.
- 41 Zepeda A., Ben-Youssef C., Rincón S., Cuervo-López F., Gómez J. (2013). Complete and simultaneous removal of ammonium and *m*-cresol in a nitrifying sequencing batch reactor. *Biodegradation* 24, 377-385.
- 42 Zumft, W. G. (1997). Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and molecular biology reviews*. 61(4): 533-616