



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Evaluación de la inhibición de la nitrificación en presencia de 2-clorofenol y la dinámica poblacional del consorcio nitrificante.

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

I.B.I. MIGUEL ÁNGEL MARTÍNEZ JARDINES

DIRECTORA DEL TRABAJO:

Dra. FLOR DE MARÍA CUERVO LÓPEZ.

ASESORES:

Dra. ANNE CLAIRE TEXIER,

Dr. HUMBERTO GONZÁLEZ MÁRQUEZ.

MÉXICO, D.F. JULIO 2015

Esta tesis se llevó a cabo en el Laboratorio de Fisiología Microbiana W-004 del Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa, gracias al apoyo otorgado por el **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** con el proyecto CB-2011-01-165174.

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

Iztapalapa, D.F. a 23 de Julio de 2015

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

Evaluación de la inhibición de la nitrificación en presencia de 2-clorofenol y la dinámica poblacional del consorcio nitrificante.

Que presentó

I.B.I. Miguel Ángel Martínez Jardines

Comité tutorial

Dra. Flor de María Cuervo López

Directora, UAM-Iztapalapa

Dra. Anne Claire Texier

Asesor, UAM-Iztapalapa

Dr. Humberto González Márquez

Asesor, UAM-Iztapalapa

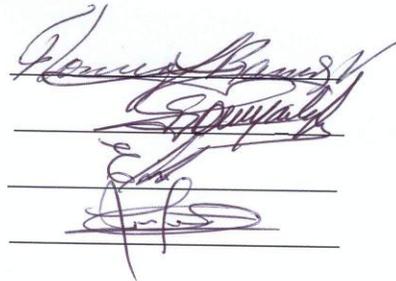
H. Jurado

Presidenta: Dra. Florina Ramírez Vives

Secretario: Dr. Humberto González Márquez

Vocal: Dra. Emir Martínez Gutiérrez

Vocal: Dr. Iván Moreno Andrade

Three handwritten signatures are present on the right side of the page, each written over a horizontal line. The top signature is the most legible, appearing to be 'Florina Ramírez Vives'. The middle signature is less legible, and the bottom signature is also less legible.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Flor de María Cuervo López por la dirección, asesoría y revisión de este trabajo. Gracias por su profesionalismo, dedicación, consejos y el tiempo invertido en mi formación.

A la Dra. Anne Claire Texier y al Dr. Humberto González Márquez por su asesoría, colaboración a este trabajo, sus sugerencias, disposición, críticas constructivas y el tiempo invertido en la revisión de la tesis.

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

Y por último agradezco a la skabulilla family, a los galloburguer a los compañeros del W-004, a los compañeros de posgrado, amigos de la UAM-I y a todas esas personas que han compartido algunos momentos con migo, gracias por su amistad.

DEDICATORIA

A mi familia.

Por todo su cariño, apoyo, comprensión, confianza y sobre todo por estar incondicionalmente a mi lado.

“Se trata de seguir adelante. Y si sigues adelante el tiempo suficiente, supongo que al final es como empezar de nuevo”

John Katzenbach

Índice General

I.	RESUMEN	v
II.	ABSTRACT	vi
1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	Nitrificación	3
1.1.1.	Aspectos bioquímicos de la nitrificación	5
1.1.2.	Microbiología de la nitrificación	7
1.1.3.	Factores que afectan la nitrificación	8
1.1.3.1.	Efecto de la temperatura	9
1.1.3.2.	Efecto del pH	9
1.1.3.3.	Efecto del oxígeno	10
1.1.3.4.	Efecto de la materia orgánica	11
1.2.	2-Clorofenol	12
1.3.	Nitrificación, materia orgánica y 2-clorofenol	13
1.4.	Nitrificación en reactores de lotes secuenciados (SBR)	15
1.5.	Dinámica poblacional	17
2.	JUSTIFICACIÓN	21
3.	HIPÓTESIS	21
4.	OBJETIVOS	22
4.1.	General	22
4.1.1.	Objetivos particulares	22
5.	MATERIALES Y MÉTODOS	23
5.1.	Reactores	23
5.2.	Medio de cultivo	24
5.3.	Ensayos abióticos	24
5.4.	Proceso nitrificante en presencia de 2-clorofenol	25
5.5.	Variables de respuesta para evaluar el proceso respiratorio	25
5.6.	Métodos moleculares	27
5.6.1.	Extracción de ADN del lodo	27
5.6.2.	Amplificación de ADN y separación por DGGE	27

5.7.	Técnicas analíticas	28
5.7.1.	Cuantificación de amonio	29
5.7.2.	Cuantificación de nitrito y nitrato	30
5.7.3.	Cuantificación de 2-Clorofenol	31
5.7.4.	Cuantificación de proteína microbiana	32
6.	RESULTADOS	34
6.1.	Ensayos abióticos	34
6.2.	Proceso nitrificante en presencia de 2-CP	35
6.3.	Actividad metabólica de los lodos nitrificantes en presencia de diferentes concentraciones de 2-CP	35
6.3.1.	Reactor SBR1 inoculado con lodos expuestos previamente a 2-CP	35
6.3.2.	Reactor SBR2 inoculado con lodos expuestos previamente a <i>p</i> -cresol	43
6.4.	Actividad cinética de los lodos nitrificantes en presencia de diferentes concentraciones 2-CP	51
6.5.	Dinámica poblacional de los lodos nitrificantes en presencia de 2-CP	57
6.5.1.	Extracción y amplificación de ADN de los lodos nitrificantes en presencia de 2-CP	57
6.5.2.	Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE)	59
7.	CONCLUSIONES	66
8.	RECOMENDACIONES	68
9.	REFERENCIAS	69

Índice de Figuras

Figura 1. Ciclo biogeoquímico del nitrógeno.	4
Figura 2. 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).....	8
Figura 3. Ruta de degradación aerobia. (1) Fenol hidroxilasa, (2) Catecol 2,3-dioxigenasa. Fuente. Farrell y Quilty, (1999).....	13
Figura 4. Etapas de un ciclo de operación de un reactor SBR.....	16
Figura 5. Ejemplo de una curva de calibración para la cuantificación de amonio.....	30
Figura 6. Ejemplos de curvas de calibración para la cuantificación de nitrito y nitrato por electroforesis capilar.....	31
Figura 7. Ejemplo de curva de calibración de 2-clorofenol por HPLC.....	32
Figura 8. Ejemplo de curva de calibración para la cuantificación de proteína microbiana por el método de Lowry.....	33
Figura 9. Ensayos abióticos con ausencia de biomasa y en presencia de 2-CP en un reactor SBR: con aireación intermitente y burbujeo con O ₂ a lo largo del tiempo.....	34
Figura 10. Perfil de la nitrificación en el reactor SBR1 con 20 mg/l de C-2-CP en el ciclo 1 (A) y con 60 mg/l de C-2-CP en el ciclo 6 (B) de operación.....	36
Figura 11. Perfiles del comportamiento nitrificante con respecto al número de ciclos de operación del SBR1 alimentado con 20, 40 y 60 mg/l de C-2-CP.....	38
Figura 12. Perfiles de eficiencia de consumo de amonio y rendimientos de producción de nitrato a lo largo de los ciclos de operación en presencia de 2-CP.....	41
Figura 13. Fases lag del lodo nitrificante en el SBR1 a lo largo de los ciclos de operación en presencia de 2-CP.....	43
Figura 14. Perfil de la nitrificación en el reactor SBR2 con 20 mg/l de C-2-CP en el ciclo 1 (A) y con 60 mg/l de C-2-CP en el ciclo 6 (B) de operación.....	44
Figura 15. Perfiles del comportamiento nitrificante con respecto al número de ciclos de operación del SBR2 alimentado con 20, 40 y 60 mg/l de C-2-CP.....	46
Figura 16. Perfiles de eficiencia de consumo de amonio y rendimientos de producción de nitrato a lo largo de los ciclos de operación en presencia de 2-CP.....	48
Figura 17. Fases lag del lodo nitrificante en el SBR2 a lo largo de los ciclos de operación en presencia de 2-CP.....	49

Figura 18. Eficiencias de consumo de amonio de los lodos nitrificantes en los reactores SBR1 y SBR2 a lo largo de los ciclos de operación en presencia de 2-CP.	50
Figura 19. Rendimientos de producción de nitrato de los lodos nitrificantes en los reactores SBR1 y SBR2 a lo largo de los ciclos de operación en presencia de 2-CP.....	51
Figura 20. Velocidades específicas de amonio (A), nitrato (B) y 2-CP (C) a lo largo de los ciclos de operación en los reactores SBR1 y SBR2.	56
Figura 21. Amplificación de ADN de uno de los lodos nitrificantes por PCR.	58
Figura 22. DGGE del lodo expuesto previamente a 2-CP en presencia de 2-CP en los ciclos de operación: Control, 1 (C1), 2 (C2), 3 (C3), 4 (C4), 5 (C5), 6 (C6) y 7 (C7).	62
Figura 23. DGGE del lodo expuesto previamente a <i>p</i> -cresol en presencia de 2-CP en los ciclos de operación: Control, 1 (C1), 2 (C2), 3 (C3), 4 (C4), 5 (C5), 6 (C6) y 7 (C7).	64

Índice de Tablas

Tabla 1. Reacciones y valores de ΔG° de amonio y nitrito oxidación en el proceso nitrificante (Texier y col., 2012).....	5
Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas del 2-CP. Handbook of Environmental Data on Organic Chemicals Index Merk (1996).	12
Tabla 3. Composición del medio de cultivo utilizado para los reactores de lotes secuenciados.	24
Tabla 4. Coeficientes de determinación y de variación de las pendientes correspondientes a las curvas de calibración realizadas por los diferentes métodos analíticos.	29
Tabla 5. Balance de materia registrado en el SBR1, inoculado con lodos con contacto previo al 2-CP y alimentados con 2-CP durante 7 ciclos de operación.	37
Tabla 6. Variables de respuesta determinadas en el reactor SBR1 en presencia de 2-CP durante 7 ciclos de operación.....	40
Tabla 7. Balance de materia registrado en el SBR2, inoculado con lodos con contacto previo al <i>p</i> -cresol y alimentados con 2-CP durante 7 ciclos de operación.....	45
Tabla 8. Variables de respuesta determinadas en el reactor SBR2 en presencia de 2-CP durante los 7 ciclos de operación.....	47
Tabla 9. Velocidades específicas determinadas en el reactor SBR1 en presencia de 2-CP hasta el ciclo 7 de operación.	53
Tabla 10. Velocidades específicas determinadas en el reactor SBR2 en presencia de 2-CP hasta el ciclo 7 de operación.....	55
Tabla 11. Muestras sometidas a extracción, PCR y DGGE.	58

I. RESUMEN

En este trabajo se evaluó un proceso nitrificante en presencia de 2-clorofenol (2-CP, mg C/l: 20, 40 y 60), en términos del comportamiento metabólico, cinético y poblacional. Se llevó a cabo en dos reactores de lotes secuenciados (SBR) inoculados con lodos expuestos previamente a compuestos fenólicos. El SBR1 se inoculó con un lodo expuesto previamente a 2-clorofenol, mientras que el SBR2 con un lodo previamente expuesto a *p*-cresol. Se realizaron 7 ciclos de operación de 30 días cada uno en presencia de diferentes concentraciones de 2-clorofenol (mg C/l): dos ciclos con 20, dos ciclos con 40 y tres ciclos con 60. El comportamiento fisiológico de los lodos se evaluó mediante la eficiencia de consumo (E), el rendimiento de formación de productos (Y) y la velocidad específica de consumo de sustrato y formación de productos (q). Su dinámica poblacional se evaluó por medio de un análisis de DGGE del ADN de las bacterias al final de cada ciclo de operación. Los valores de $EN-NH_4^+$ y de $YN-NO_3^-$ indicaron un efecto negativo de la adición e incremento del 2-CP en la actividad amonio oxidante del lodo del SBR1 en los ciclos 3 y 5, mientras que un efecto negativo sobre la nitrito oxidación del lodo del SBR2 en los mismos ciclos. Sin embargo, al final del ciclo 7, ambos lodos recuperaron su actividad metabólica y se obtuvo un proceso nitrificante completo, estable y eficiente ($EN-NH_4^+=99.2\pm0.6\%$, $YN-NO_3^-=0.96\pm0.03$). En ambos lodos, la adición de 2-CP provocó un efecto inhibitorio sobre el proceso nitrificante, pues las velocidades específicas disminuyeron de acuerdo a un control sin el compuesto clorado. El efecto inhibitorio sobre la cinética amonio y nitrito oxidante de ambos lodos disminuyó a lo largo de los ciclos de operación. Ambos lodos fueron capaces de consumir completamente desde 20 hasta 60 mg C-2-CP/l. El análisis de la dinámica poblacional de los lodos nitrificantes indicó que en el reactor SBR1 la estructura de la población cambió al adicionar las diferentes concentraciones de 2-CP, mientras que en el lodo del SBR2, la estructura poblacional cambió al adicionar 20 mg C-2-CP/l y posteriormente se mantuvo estable independientemente del incremento en la concentración a 40 y 60 mg C- 2-CP/l. La nitrificación completa y estable en el SBR1, podría atribuirse a una mejora metabólica de las especies participantes y a la diversidad poblacional encontrada. Por otro lado, dado que la diversidad microbiana del lodo del SBR2 fue constante, los cambios de la nitrificación se podrían atribuir a una mejora metabólica y cinética de los microorganismos presentes, más que a los cambios observados en la población microbiana.

II. ABSTRACT

In this work a nitrification process was evaluated in presence of 2-chlorophenol (2-CP mg C/l: 20, 40 and 60), in terms of its metabolic, kinetic and population behavior. It was carried out in two sequenced batch reactor (SBR) inoculated with sludge previously exposed to phenolic compounds. The SBR1 was inoculated with sludge previously exposed to 2-chlorophenol, while SBR2 was inoculated with sludge previously exposed to *p*-cresol. Seven cycles of 30 operation days were performed in the presence of different concentrations of 2-chlorophenol (mg C/l): two cycles with 20, two cycles with 40 and three cycles with 60. The physiological behavior of the sludge was evaluated by consumption efficiency (E), yield of product formation (Y) and specific rates of substrate consumption and product formation (q). The population dynamics of the nitrifying sludge exposed to different concentrations of 2-CP was evaluated by DGGE analysis of bacteria DNA content throughout the operation cycles. The oxidizing ammonium activity of the sludge of SBR1 was influenced in cycles 3 and 5 by the increase in 2-CP, whereas a negative effect on nitrite oxidation of the sludge in SBR2 was noticed as $\text{ENH}_4^+\text{-N}$ and $\text{YNO}_3^-\text{-N}$ values indicated. However, at the end of cycle 7, both sludge recovered their metabolic activity as a complete, stable and efficient nitrifying process was obtained ($\text{ENH}_4^+\text{-N}=99.2\pm 0.6\%$, $\text{YNO}_3^-\text{-N}=0.96\pm 0.03$). The addition of 2-CP provoked an inhibitory effect on the nitrification process in both sludge, as the specific rate decreased according to a control without the chlorinated compound. The inhibitory effect on ammonium and nitrite oxidation processes in both sludge decreased throughout the operation cycles and they were able to completely consume from 20 to 60 mg 2-CP-C/l. The population structure of the sludge previously exposed to 2-CP was varying as the 2-CP concentration was increased, whereas in the sludge previously exposed to *p*-cresol, the structure changed as a result of the addition of 20 mg C-2-CP/l. Moreover, the structure remained constant irrespectively to the increase to 40 y 60 mg C- 2-CP/l. The stable and complete nitrifying process achieved in SBR1 could be related to the bacterial diversity and its metabolic enhancement. On the other hand, the variations in nitrifying performance in SBR2 could be related to metabolic and kinetic enhancement of the sludge rather than changes in its microbial population structure.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el ser humano tiene una influencia notable sobre los ecosistemas del planeta. El crecimiento de la población lo ha llevado a conseguir cada vez más recursos para su supervivencia. Las actividades que realiza en lo cotidiano, así como en el ramo tecnológico o industrial, han provocado que la problemática de la contaminación de los cuerpos acuáticos vaya en aumento día con día, y que los cursos de agua arrastren compuestos muy variados y en concentraciones muy diversas. En general, se puede decir que los problemas de contaminación por desechos industriales se agravan por la falta de tratamiento de los efluentes finales, por el gran desarrollo industrial que genera efluentes más complejos y por la falta de planes reguladores (Monroy y col., 2000, 2006). La composición de los efluentes contaminantes varía con el tipo de industria y con el tipo de proceso que se lleva a cabo. Dentro de las sustancias disueltas hay elementos orgánicos que pueden ser biodegradables o no, y/o elementos inorgánicos nitrogenados como el amonio, nitrato o nitrito (Camargo y Alonso, 2006). Estos compuestos pueden repercutir en la salud de muchos seres vivos.

Uno de los compuestos contaminantes nitrogenados encontrados en efluentes tanto industriales como municipales es el amonio (NH_4^+). Debido a las actividades humanas, su cantidad cada vez es mayor (McClelland y col., 1998; Bremmen, 2002), particularmente, los efluentes de la industria química, refinería del petróleo, textil, tenerías, procesadoras de alimentos y papel, producción de látex, manufactureras de explosivos y plaguicidas, entre otras, contienen concentraciones altas de compuestos nitrogenados (Lens y Kuenen, 2001). Olmos y col. (2004) por ejemplo, encontraron concentraciones de 710 ± 590 mg N- NH_4^+ /l, en los efluentes de la refinería de Tula, México. En ecosistemas acuáticos, el amonio es uno de los causantes de la eutroficación, que trae como consecuencia la muerte de organismos por asfixia (Bock y col., 1986; Prosser, 1989). Además, la contaminación por nitrógeno inorgánico podría inducir efectos perjudiciales sobre la salud humana. Genera malestares como

dolor de cabeza e incluso desmayos, irritación de ojos, nariz y garganta, asimismo, su presencia en el agua impide consumirla (Camargo y Alonso, 2007).

Además del amonio, los compuestos fenólicos pueden estar presentes en los efluentes industriales en concentraciones altas. Dentro de los compuestos fenólicos, los halogenados, en particular los clorados como el 2-clorofenol (2-CP), se encuentran contaminando suelos y acuíferos, debido a su uso generalizado como parte estructural de pesticidas y preservadores en la industria de la madera (Puhakka y col. 1995). Aunque actualmente su uso para este fin está prohibido en casi todo el mundo, en muchos países madereros, los problemas de contaminación por clorofenoles persisten debido a su alta vida media en el ambiente (Manimekalai y Swaminathan, 2000). El 2-CP también se utiliza en las industrias petroquímicas, textiles y de papel (Kostyal y col., 1997). Es un compuesto soluble en agua (2.8 g/100 mL de H₂O) (Solomons, 2000), por lo que puede migrar fácilmente y contaminar el medio acuoso. Es considerado por la OSHA (Occupational Safety and Health Administration, 1998) como un contaminante serio debido a su toxicidad y persistencia en el medio ambiente. Los clorofenoles y el 2-CP podrían llegar a ser mutagénicos y cancerígenos (Armenante y col., 1999), por lo que su impacto ambiental en el aire, el agua y el suelo es significativo (Majumder y Gupta, 2007).

De acuerdo con lo anterior, surge la necesidad de implementar sistemas de tratamiento que permitan eliminar tanto al amonio como al 2-CP de los efluentes industriales. Para eliminar nitrógeno amoniacal del agua se puede hacer uso de tratamientos fisicoquímicos y/o biológicos. Uno de los procedimientos fisicoquímicos principales para eliminar nitrógeno amoniacal del agua es el arrastre de amoniaco o “stripping”, que consiste en alcalinizar el agua hasta alcanzar un pH entre 10.5 y 11.5, de forma que el equilibrio NH₄⁺/NH₃ esté desplazado hacia la formación de amoniaco y éste último sea eliminado mediante una corriente de aire (EPA, 1987). La desventaja de este proceso es el elevado costo de la aireación y que el amoniaco sólo se separa del efluente y no se le transforma a un compuesto menos dañino, transportándolo del agua a la atmósfera. Para la eliminación fisicoquímica de

compuestos de tipo fenólico de las aguas residuales, en general existen tres formas: a) La retención (adsorción) sobre un agente externo cuya reutilización o disposición final esté asegurada, b) el uso de agentes físicos que destruyen químicamente las moléculas hasta llevarlas a subproductos y, c) técnicas que se basan en el aprovechamiento de la capacidad de los fenoles para reaccionar con otras sustancias dando lugar a compuestos de solubilidad menor y así poder separarlos del efluente (Pérez-Alfaro, 2010). De manera general, los tratamientos fisicoquímicos para eliminar amonio y 2-CP del agua podrían ser 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. Tomando en cuenta lo anterior, los procesos biológicos, tienen una gran ventaja. Por ejemplo mediante la nitrificación, definida como un proceso respiratorio aerobio el amonio es secuencialmente oxidado a nitrito y posteriormente a nitrato (Prosser, 1989; Bernet y Spérandio, 2009); posteriormente, mediante la desnitrificación, se puede producir nitrógeno molecular, por lo que es posible eliminar completamente los contaminantes nitrogenados y convertirlos en compuestos inocuos. Asimismo, mediante la desnitrificación, también es posible oxidar simultáneamente materia orgánica de tipo fenólica hasta CO_2 (Hernández 2005; Hernández y col., 2008).

1.1. Nitrificación

Desde hace más de 100 años, la nitrificación ha sido estudiada como parte del ciclo biogeoquímico del nitrógeno, para comprender su papel en ecosistemas acuáticos y terrestres (Winogradsky, 1890) (Figura 1). La nitrificación es la oxidación biológica del amonio a nitrato (NO_3^-) a través de nitrito (NO_2^-). Se trata de un proceso respiratorio aerobio donde las bacterias nitrificantes utilizan amonio o nitrito como fuente de energía, dióxido de carbono como fuente de carbono y oxígeno molecular como aceptor final de electrones (Prosser, 1989).

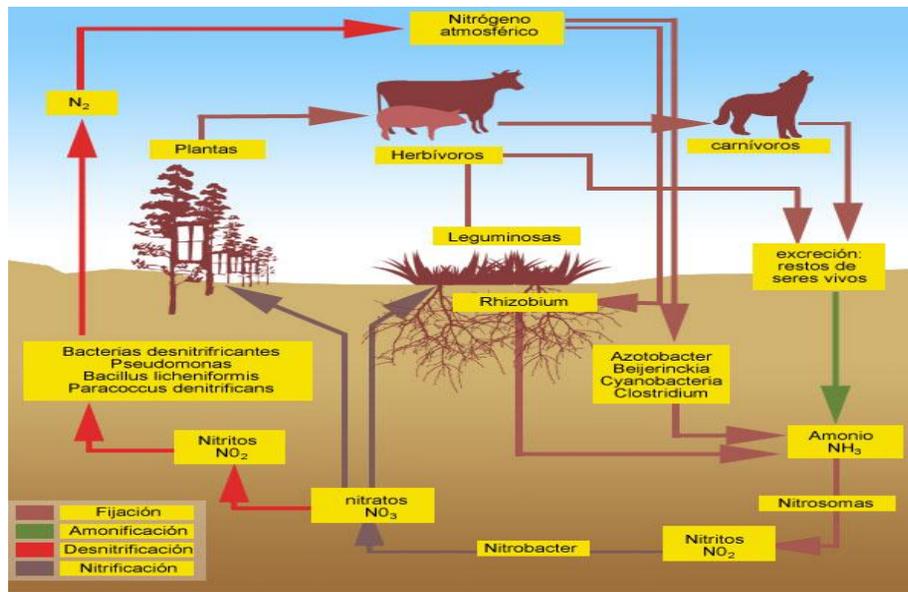


Figura 1. Ciclo biogeoquímico del nitrógeno.

Se ha investigado extensamente a la nitrificación como una primera etapa de eliminación de nitrógeno en el tratamiento biológico de aguas residuales, puesto que la oxidación del amonio y de nitrito a nitrato, puede acoplarse con una segunda etapa, la desnitrificación, proceso mediante el cual el nitrato es convertido a nitrógeno molecular (Gijs and Robertson, 1994).

La nitrificación se realiza en dos etapas metabólicas sucesivas. En la primera etapa, el amonio es oxidado a hidroxilamina (NH_2OH) por la enzima amonio monooxigenasa (AMO) de las bacterias amonio oxidantes (AOB por sus siglas en inglés) y la oxidación de la hidroxilamina a nitrito se lleva a cabo por la actividad de la enzima hidroxilamina óxidoreductasa. 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 bacterias nitrificantes utilizan amonio o nitrito como fuente de energía, oxígeno molecular como aceptor final de electrones y CO_2 como fuente de carbono. En la naturaleza, la nitrificación es un proceso que se lleva a cabo en conjunto con la desnitrificación, manteniendo una eficiente recirculación del nitrógeno, pero debido a la enorme generación de amonio

por el hombre, la velocidad de recirculación de este elemento puede verse disminuida y causar grandes problemas ambientales (Madigan y col., 2003).

El rendimiento de energía libre estándar (ΔG°) de la oxidación del amonio a nitrito es -275 kJ/mol, lo que indica que esta oxidación es el paso principal donde las AOB pueden obtener energía (Tabla 1). El ΔG° para la oxidación de nitrito a nitrato es menor que para la oxidación de amoníaco a nitrito y la consecuencia es un menor rendimiento de crecimiento de las NOB que de las AOB (Bernet y Spérandio, 2009). Debido a la baja disponibilidad de energía para la biosíntesis celular en el proceso respiratorio, el crecimiento de las bacterias nitrificantes es lento y escaso, incluso en condiciones óptimas. Por ejemplo, se han encontrado algunos valores de rendimiento de crecimiento de 0.08 g de células/g N-NH₄⁺ para AOB y 0.05 g de células/g N-NO₂⁻ para NOB, respectivamente (Wiesmann, 1994).

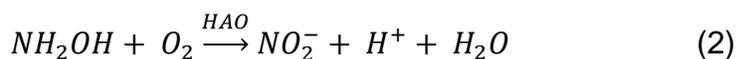
Tabla 1. Reacciones y valores de ΔG° de amonio y nitrito oxidación en el proceso nitrificante (Texier y col., 2012).

Reacciones	Ecuaciones	ΔG° (kJ/reacción)
Amonio oxidación	$NH_4^+ + 0.5O_2 \rightarrow NH_2OH + H^+$	-8
	$NH_2OH + O_2 \rightarrow NO_2^- + H^+ + H_2O$	-267
Reacción global	$NH_4^+ + 1.5 O_2 \rightarrow NO_2^- + 2H^+ + H_2O$	-275
Nitrito oxidación	$NO_2^- + 0.5 O_2 \rightarrow NO_3^-$	-74

1.1.1. Aspectos bioquímicos de la nitrificación

El proceso amonio-oxidante se lleva a cabo por dos reacciones. En la primera de ellas, catalizada por la enzima amonio monooxigenasa (AMO), el amonio es convertido a hidroxilamina (Ec. 1) (Castingnetti y Hollocher, 1985) y posteriormente, en una segunda reacción, ésta es convertida a nitrito (Ec. 2) mediante la acción de la enzima hidroxilamina oxidorreductasa (HAO) (Andersson y col., 1984).

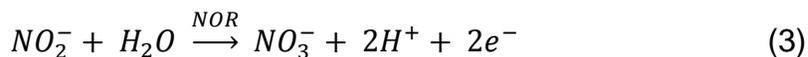




En la primera reacción de conversión de amonio a hidroxilamina (NH_2OH), uno de los átomos de oxígeno O_2 se transfiere al NH_4^+ , produciendo la hidroxilamina, mientras que el otro está implicado en la formación de H_2O (Hollecher y col., 1981). La AMO está localizada en la membrana citoplasmática tiene la capacidad para la co-oxidación de numerosos compuestos orgánicos, incluyendo alifáticos recalcitrantes, aromáticos y moléculas halogenadas (Juliette y col, 1993; Keener y Arp, 1993, 1994; McCarty, 1999). La segunda reacción de la oxidación de amoníaco, es la conversión de NH_2OH en NO_2^- . Es catalizada por el complejo enzimático del sistema HAO, que está situado en el espacio periplásmico (Whittaker y col., 2000). Dos de los electrones producidos en la segunda reacción se utilizan para compensar la entrada de electrones de la primera reacción, mientras que los otros dos se pasan a través de una cadena de transporte de electrones a la oxidasa terminal, generando así una fuerza motriz de protones (Kowalchuk y Stephen, 2001). Esta fuerza motriz de protones se utiliza como fuente de energía para la producción de ATP. Se puede observar que durante la amonio-oxidación se produce acidez (formación de protones) y que esta reacción es de gran consumo de oxígeno: 1.5 mol de oxígeno por mol de amonio lo que es 3.43 g de oxígeno por g de nitrógeno amoniacal (Bernet y Spérandio, 2009).

En el segundo paso de la nitrificación, el nitrito es oxidado a nitrato por las bacterias nitrito oxidantes. Esta reacción (Ec. 3) es catalizada por una nitrito óxidoreductasa (NOR) que se encuentra en la membrana (Bock y col., 1991). El nitrito es el donante de electrones, mientras que el oxígeno es el aceptor final. 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. 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*.



1.1.2. Microbiología de la nitrificación

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 *Proteobacteria: beta* y *gamma*. *Nitrosomonas*, *Nitrospira*, *Nitrosovibrio*, *Nitrosolobus* y *Nitrosococcus* constituyen un conjunto de géneros cercanamente relacionados con la subclase *beta* de *Protobacteria* (Head y col., 1993; Teske y col., 1994). Mientras que *Nitrosococcus oceanus* y *Nitrosococcus halophilus* son especies que pertenecen a la subclase *gamma* de *Protobacteria* (Purkhold y col., 2000).

Las bacterias nitrito oxidantes que han podido ser cultivadas se han clasificado 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 2). 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).

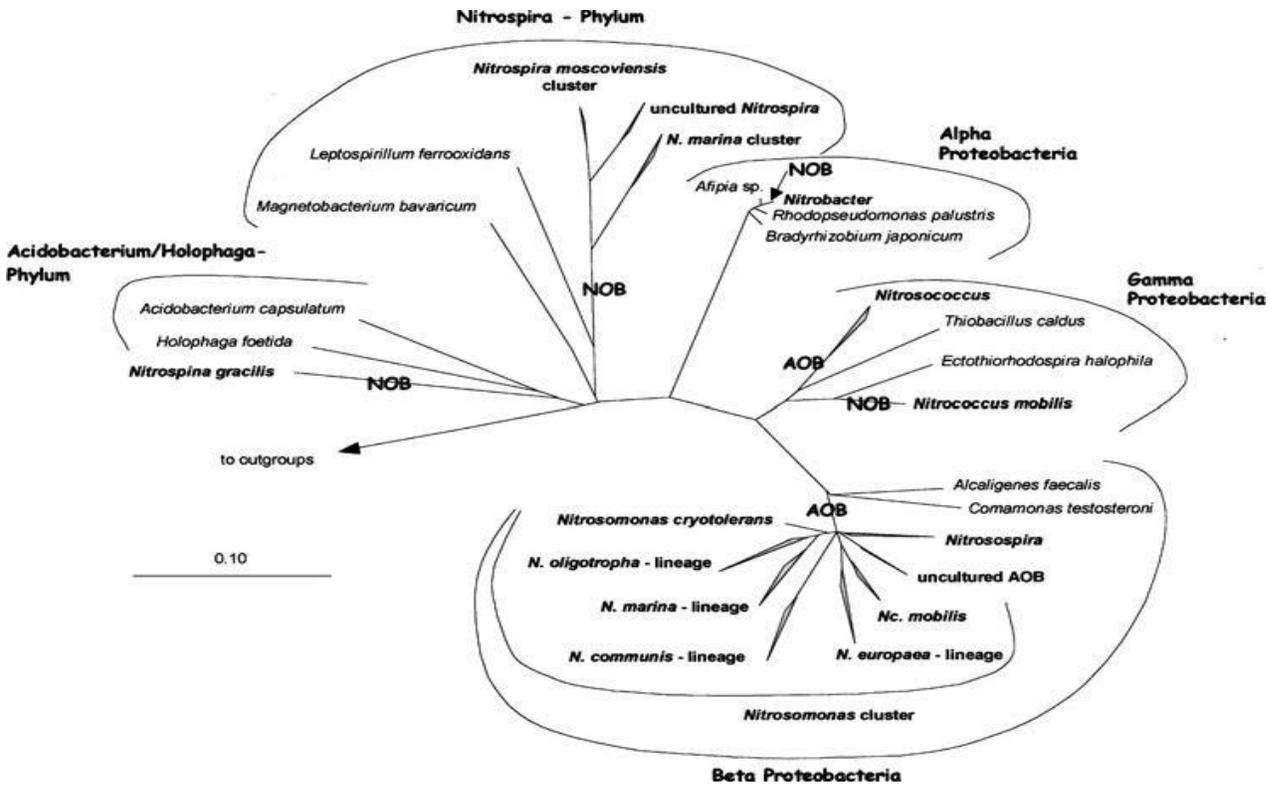


Figura 2. Árbol filogenético de las bacterias nitrificantes basado en el análisis comparativo del 16S rRNA. Los grupos de las bacterias nitrificantes están mostrados en negritas. La barra en escala indica un cambio estimado de 0.1 por nucleótido (Schramm, 2003).

1.1.3. Factores que afectan la nitrificación

Como cualquier proceso biológico, la nitrificación está condicionada al ambiente que la rodea. Se sabe que la eficiencia de la transformación de amonio a nitrato puede estar determinada, entre otros factores, por la temperatura, pH, concentración de oxígeno y también por la presencia del mismo sustrato (amonio) o de materia orgánica.

1.1.3.1. Efecto de la temperatura

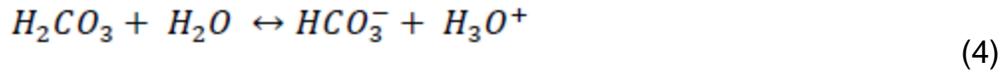
Tanto las AOB como las NOB pueden sobrevivir en un intervalo de temperatura de 4-45°C, sin embargo, al ser microorganismos mesófilos, su mejor crecimiento se puede encontrar entre 28 y 36°C (Bernet y Spérandio, 2009). Aunque la temperatura tiene un efecto en la velocidad de crecimiento de los microorganismos nitrificantes, a temperaturas superiores a 15°C, las AOB presentan una velocidad de crecimiento mayor que las NOB (Bernet y Spérandio, 2009).

La temperatura tiene también un efecto en las velocidades de amonio y nitrito oxidación. Shammass (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, encontrando que 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.

1.1.3.2. 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). Los 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). Un pH bajo en el medio, permite la formación y acumulación de ácido nitroso (HNO_2), que es el resultado de la protonación del nitrito. 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). 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 pH ácidos, el equilibrio entre las especies $H_2CO_3/HCO_3^-/CO_3^{2-}$ se desplazaría a H_2CO_3 (CO_2) disminuyendo la disponibilidad de bicarbonato en el medio de cultivo.



También la nitrificación puede ser afectada por pH alcalino, ya que puede cambiar la disponibilidad de NH_4^+ en el cultivo (Stein y col., 1997). En la ecuación siguiente se muestra el equilibrio entre amonio y amoniaco.



El par NH_4^+/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.

1.1.3.3. Efecto del oxígeno

En el proceso respiratorio nitrificante, se utiliza oxígeno como aceptor final de electrones. Se asume generalmente que las concentraciones de oxígeno superiores a 2 mg/l son adecuadas para una nitrificación con éxito (Gerardi, 2002). La nitrificación es muy sensible a concentraciones de oxígeno disuelto bajas. Las bacterias nitrificantes tienen una afinidad alta por él (bajos valores de K_s entre 0.4 y 0.6 mg/L) (Robinson y col., 2004). Las AOB y NOB pueden presentar afinidades diferentes por el oxígeno (KO_2) y las NOB son más sensibles a la limitación de O_2 que las AOB (Laanbroek y Gerards, 1993). Por lo tanto, una concentración baja de oxígeno disuelto, alrededor de 0.2 a 0.5 mg/l, es una condición posible para limitar la actividad nitrito-oxidante en los sistemas de nitrificación (Bernet y Sperandio, 2009).

1.1.3.4. Efecto de la materia orgánica

Aunque las bacterias amonio oxidantes presentan cierta capacidad para oxidar materia orgánica, también está bien documentada la alta sensibilidad de las bacterias nitrificantes a los efectos tóxicos o inhibitorios de los compuestos orgánicos (Schweighofer y col., 1996, Texier y col., 2012). La mayoría de los estudios sobre los efectos de los compuestos orgánicos en la nitrificación han utilizado como inóculo cultivos axénicos o consorcios, como es el caso de los lodos activados. 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). Se ha mostrado que los efectos dependen principalmente de la concentración, estructura química y tipo de contaminante orgánico, así como también el tipo de cultivo (axénicos o consorcio) y el origen de los lodos (Gómez y col., 2000; Zepeda y col., 2006).

Desde la década de los 80, se ha estudiado el efecto de la materia orgánica sobre el proceso nitrificante, proponiéndose dos posturas. Una en la que se dice que la presencia de materia orgánica favorece el crecimiento de organismos heterotróficos sobre los organismos nitrificantes (Digger y col., 1985; Michael y col., 1985). Así pues, se propone que la presencia de la materia orgánica ocasiona la disminución en la eficiencia nitrificante al desviar el proceso respiratorio a uno asimilativo. La otra postura propone un efecto directo sobre las enzimas nitrificantes. Keener y Arp (1994) realizaron ensayos con *Nitrosomonas europaea* en los cuales observaron que si la concentración de materia orgánica se aumentaba, el proceso nitrificante se veía afectado en la oxidación de amonio. Los autores proponen una competencia entre el amonio y la materia orgánica por el sitio activo de la enzima encargada de la oxidación del amonio (inhibición competitiva), o bien, que la materia orgánica se une al sitio activo de la enzima, cambiando su configuración espacial y alterando su capacidad oxidativa.

1.2. 2-Clorofenol

El 2-clorofenol (C_6H_5OCl , 2-CP)₇ es un líquido desde incoloro a ámbar con un olor desagradable. El 2-CP es muy soluble en agua (28.5 g/l a 25°C y pH neutro (Tabla 2). Esta característica implica peligro de movilización en suelos, contaminación de acuíferos y acumulación en ecosistemas acuáticos. De acuerdo con su coeficiente de partición octanol-agua (K_{ow} del 2-CP = 2.16), que es una medida de cómo una sustancia química puede distribuirse fácilmente en dos solventes inmiscibles, agua (solvente polar) y octanol (solvente relativamente no polar, que representa a las grasas), el 2-CP puede fijarse con firmeza a materia orgánica, sedimentos y microorganismos (partes lipofílicas como membranas celulares). Debido a esto y considerando que la vía de exposición al 2-CP puede ser a través de la cadena alimenticia, este compuesto tiende a bioacumularse en la grasa corporal de los animales (Loehr y Krishnamoorthy, 1988).

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas del 2-CP. Handbook of Environmental Data on Organic Chemicals Index Merk (1996).

Punto de fusión	9.3°C
Punto de ebullición	175°C
Densidad relativa a 25°C	1.26
Coefficiente de partición (K_{ow})	2.16
Constante de Henry a 20°C	1.31×10^{-2} atm l /mol,
pKa a 25°C	8.48
Solubilidad en agua	28.5 g/l
Peso molecular	128.56
Presión de vapor a 20°C	2.9×10^{-3} atm

Durante la degradación microbiológica aerobia de clorofenoles, el oxígeno sirve como aceptor de electrones. El paso inicial de la degradación aerobia de los monoclorofenoles es su transformación a clorocatecoles, que son los metabolitos centrales de la degradación aerobia de la mayoría de los clorofenoles. Farrell y Quilty (1999), proponen una posible ruta de oxidación del 2-CP y sus isómeros el 3 y 4-clorofenol bajo condiciones aerobias (Figura 3). Para los 2 primeros se observó la formación de catecoles, en específico el 3-clorocatecol. La ruptura del anillo aromático se puede producir mediante la vía *orto* o *meta*. La mayoría de la ruptura de

los clorocatecoles se realiza por vía *meta*. Posteriormente, mediante una oxigenasa, se forma el ácido 5-cloroformil-2-hidroxi-penta-2,4-dienoico. Este compuesto ha sido determinado como suicida, ya que inactiva a la enzima dioxigenasa, resultando por tanto en la acumulación del 3-clorocatecol. En el caso del 4-CP los autores proponen su oxidación completa debido a que por la acción de dioxigenasas, una vez roto el anillo bencénico, es posible su incorporación posterior al ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Considerando que la nitrificación es un proceso aerobio, cabe la posibilidad que se presente la ruta metabólica propuesta por Farrell y Quilty (1999) y se formen compuestos suicidas que podrían complicar aún más el que la nitrificación se lleve a cabo exitosamente en presencia de 2-CP.

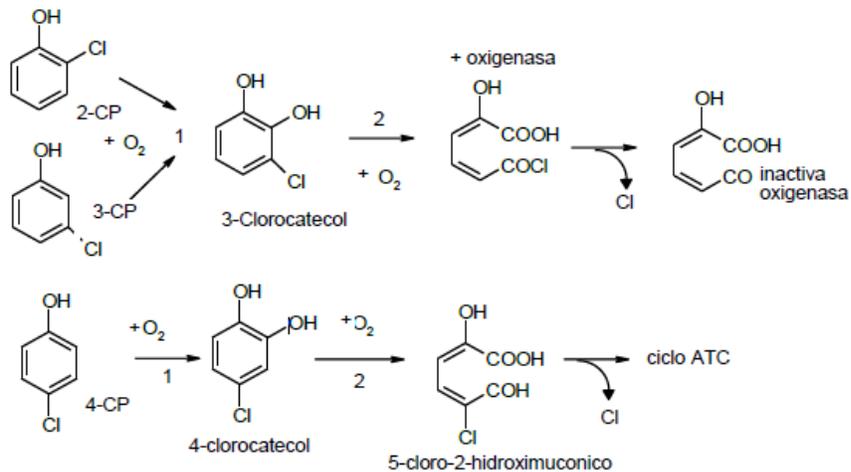


Figura 3. Ruta de degradación aerobia. (1) Fenol hidroxilasa, (2) Catecol 2,3-dioxigenasa. Fuente. Farrell y Quilty, (1999).

1.3. Nitrificación, materia orgánica y 2-clorofenol

Existen pocos trabajos en la literatura que abordan el efecto del 2-CP en un proceso nitrificante. Satoh y col. (2005), utilizando microelectrodos y una biopelícula nitrificante, reportan que 10 mg C/l de 2-CP inhibe la respiración aerobia y el consumo de amonio. Inui y col. (2002), utilizando un cultivo de *Nitrosomonas* como biosensores para la presencia de clorofenoles en un sistema de tratamiento de aguas

municipales, encuentran que con 0.9 mg/l de 2-clorofenol, se inhibe en un 10% la velocidad de respiración nitrificante. Sin embargo, no hacen mención a la producción de nitrito o nitrato o al destino del 2-CP. Pérez-Alfaro y col. (2013) encontraron que cuando un lodo nitrificante fisiológicamente estable, que no ha tenido un contacto previo con 2-CP, se pone en presencia de concentraciones iniciales de 2.5 y hasta 10 mg C-2-CP/l, no existe consumo de amonio y por tanto no hay formación de nitrito ni de nitrato, es decir, no se lleva a cabo la nitrificación, aunque sí fue posible eliminar las concentraciones de 2-CP, en 40 y 80 días de cultivo, respectivamente. Por otra parte, estudios en lote utilizando un lodo nitrificante expuesto previamente a 5 mg/l de 2-CP, indicaron que aunque el 2-CP tiene efectos inhibitorios sobre el lodo nitrificante, donde el proceso de amonio oxidación fue más afectado que el de la nitrito oxidación, fue posible recuperar una parte de la actividad nitrificante del lodo (Martínez-Hernández y col., 2011).

Buitrón y col. (1998) mencionan que con un contacto previo del 4-CP al inóculo, aumenta la velocidad específica de consumo. También se ha reportado que el incremento en las velocidades específicas de consumo de 4-CP, dependerán del contacto previo que el lodo ha tenido a ciertos compuestos, en donde se ve una mejora del proceso cuando el lodo ha estado aclimatado a una gran diversidad de compuestos fenólicos (Moreno y Buitrón, 2004).

Por otro lado, se encontró que la utilización de lodos metanogénicos con un contacto previo (80 días) al 2-CP, resultó en una reducción de 57% en la fase de retardo para su consumo y en un incremento de 114% en la velocidad específica de su consumo (Beristain-Montiel y col., 2010). Posteriormente, utilizando un reactor anaerobio de lotes secuenciados, fue posible aumentar hasta en cinco veces la velocidad específica de consumo de 2-CP (28 - 112 mg C-2-CP/l) (Beristain-Montiel y col. 2011). Basu y col. (1996), reportan que después de 200 días de cultivo y en contacto al 2-CP, la velocidad específica de consumo fue de 0.0019 mg C/g SSV·d, mayor a la obtenida con 80 días de cultivo. Por lo tanto, la utilización de los lodos con contacto

previo al 2-CP podría ser una estrategia clave para mejorar la velocidad específica de consumo, como lo proponen Beristain-Montiel y col. (2010).

1.4. Nitrificación en reactores de lotes secuenciados (SBR)

Para llevar a cabo la nitrificación se han utilizado geometrías diferentes de reactores nitrificantes, 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) (Texier y Gómez., 2004). Este tipo de reactores tiene un sistema de trabajo por etapas, dividido en cuatro fases (Figura 4): llenado, reacción biológica, sedimentación y drenado (Lloyd y Ketchum, 1997). Es fácil de operar y la calidad del efluente se puede regular controlando los tiempos de retención, reacción y de sedimentación (Lee y Jong 1999; Alemayehu y col., 2001). Una de las características principales de este tipo de reactor, es que los procesos biológicos tienden a alcanzar una etapa de adaptación y estabilización, pues se ha observado que los tiempos de reacción disminuyen conforme transcurre el número de ciclos (Texier y Gómez, 2007). Se ha propuesto que en estos reactores, ocurre una selección de especies microbianas capaces de adaptarse a ambientes diversos, por lo que pueden mantener su actividad aún cuando haya cambios en el efluente (Irvine y col., 1997; Ketchum, 1997). Así, al incrementarse el número de ciclos, las velocidades específicas de consumo y producción aumentan hasta llegar a un punto en el cual no sufren cambios significativos, es decir, se puede llegar a un estado estacionario (Moreno-Andrade y Buitrón, 2004). Entre las ventajas principales de este tipo de reactores se encuentran: rendimientos de eliminación de materia orgánica biodegradable y nutrientes altos, flexibilidad de operación, costos de inversión menores y una mejor operación sobre los sistemas aireados tradicionales (Fernández-Polanco y col., 1993; Schleypen y col., 1997; Torrijos y Moletta, 1997).

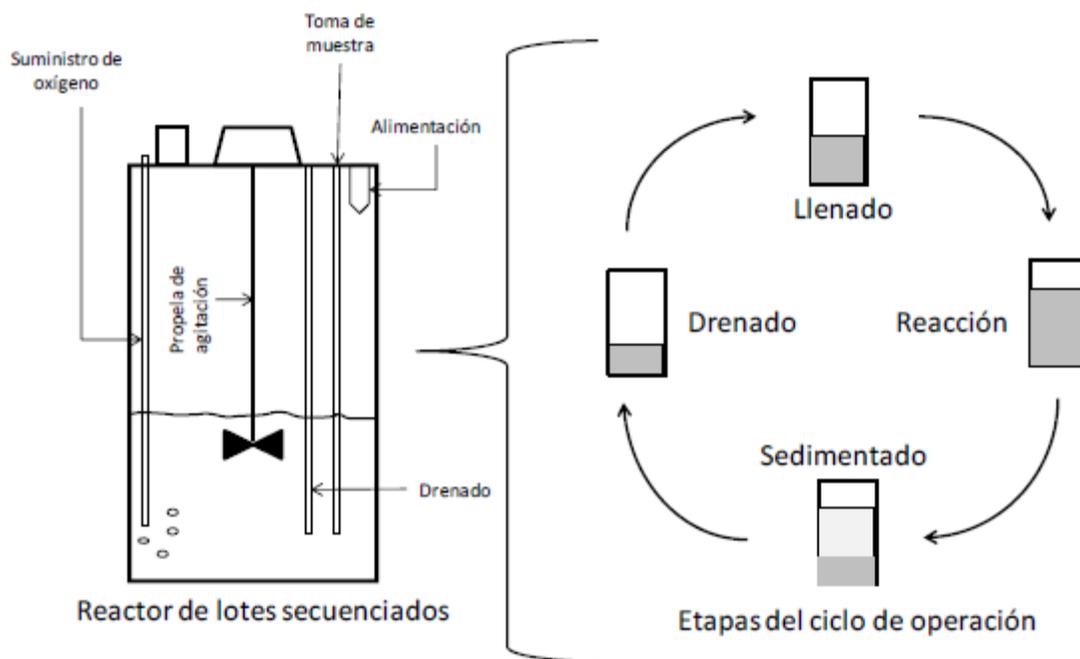


Figura 4. Etapas de un ciclo de operación de un reactor SBR.

Hay varios trabajos que reportan el uso de reactores SBR para tratar aguas sintéticas con amonio y algunos compuestos aromáticos mediante la nitrificación, reportándose algunos efectos de la materia orgánica sobre el proceso respiratorio. Por ejemplo, la eficiencia de consumo de amonio y el rendimiento de producción de nitrato no se afectan en presencia de hasta 30 mg C-fenol/l, mientras que al adicionar 100 mg C-fenol/l, ambos parámetros cayeron en un 13%. Sin embargo, bajo estas condiciones y después de 244 ciclos de operación, se observó un aumento en las velocidades específicas de consumo de amonio, fenol y producción de nitrato (Pérez-Alfaro, 2007). Asimismo, se ha reportado que el efecto inhibitorio del *p*-cresol (25 mg/l) sobre la nitrificación, puede ser disminuido después de 30 ciclos de operación en un reactor de lotes secuenciados, mostrando que la eficiencia de consumo de amonio y el rendimiento de producción de nitrato no son afectados y las velocidades específicas de consumo de *p*-cresol incrementaron (Texier y Gómez, 2007).

En trabajos recientes (Martínez-Jardines, 2013), se reporta que utilizando lodos expuestos a compuestos fenólicos previamente (2-CP y *p*-cresol) en un proceso

nitrificante y con un reactor de lotes secuenciados (SBR), la adición de 20 mg de C-2-CP/l provocó un efecto inhibitorio sobre el proceso nitrificante, pues se observó una disminución significativa en las velocidades específicas ($q_{N-NH_4^+}$, $q_{N-NO_3^-}$) con respecto a un control. Sin embargo la inhibición del proceso nitrificante disminuyó a través de los ciclos de operación, observando consumo de 2-CP, NH_4^+ y producción de NO_3^- al final del estudio. Se propone que esta disminución, así como el consumo y producción de compuestos carbonados y nitrogenados, puede estar asociada con la exposición previa de los lodos a compuestos fenólicos y a la utilización de los sistemas SBR, pero es necesario hacer más investigación al respecto.

1.5. Dinámica poblacional

En los sistemas bacterianos de biorremediación es necesario mejorar el entendimiento de los roles y diversidad de las poblaciones mediante técnicas moleculares. Al respecto, es frecuente preguntarse si un ecosistema funcionalmente estable implica necesariamente una comunidad persistente (Fernández y col., 1999), o si cambios ambientales, entre ellos el tipo y concentración de nutrientes, pueden determinar el tipo de poblaciones presentes en un consorcio, o en dado caso, si los cambios ambientales sólo modifican el metabolismo de la población microbiana. Existen técnicas microbiológicas convencionales basadas en el aislamiento de cultivos puros y análisis morfológicos, metabólicos, bioquímicos y genéticos, los cuales han proporcionado información sobre la biodiversidad de las comunidades microbianas en sistemas naturales e ingenieriles. Sin embargo, estas técnicas presentan algunos inconvenientes, tales como un conocimiento incompleto sobre sus necesidades fisiológicas (nutricionales y fisicoquímicas) y sus relaciones simbióticas.

La posibilidad de identificar poblaciones de microorganismos específicas en su hábitat natural sin la necesidad de aislarlos está revolucionando la ecología microbiana y ha dado lugar a nuevas aplicaciones en numerosos campos de investigación. El uso de herramientas moleculares para el estudio de la dinámica

poblacional de cultivos tiene la finalidad de identificar los cambios poblacionales que pueden ocurrir (Godon y col., 1997; Sekiguchi y col., 1998). Una variedad de métodos se han desarrollado para tratar de entender la diversidad y abundancia de microorganismos o secuencias genéticas de interés. El uso de las técnicas de separación de ADN por electroforesis en gel con gradientes desnaturalizantes (DGGE) ofrece la posibilidad de analizar géneros bacterianos específicos, dentro de comunidades complejas. Esta técnica permite la separación de bandas de ADN de igual tamaño (masa molecular) pero con diferente información de secuencia. Idealmente, el perfil electroforético (definido por el número de bandas) reflejará la abundancia relativa de miembros diferentes de una comunidad microbiana (Muyzer y col., 1993; Felske y col., 1997). Esta técnica ya se ha aplicado para determinar la filogenia de los miembros de una comunidad microbiana (Ferris y col., 1996; Watanabe y col., 2000).

La dinámica de las poblaciones podría utilizarse para relacionar la estabilidad fisiológica con la composición microbiana, es decir, si un ecosistema funcionalmente estable implica necesariamente una comunidad constante o si una comunidad variable implica variaciones en el patrón respiratorio. Los avances en las técnicas de biología molecular pueden proporcionar herramientas para seguir la estructura y dinámica de una comunidad en el tiempo, caracterizar y cuantificar microorganismos en muestras. Además de caracterizar y cuantificar las poblaciones microbianas en un sistema biológico, la importancia de estudiar la dinámica de las poblaciones en el tiempo podría permitir entender mejor cómo son los procesos biológicos en reactores.

En la literatura, existe información que puede ayudar a entender los mecanismos por los cuales las bacterias nitrificantes actúan en los sistemas de tratamiento de aguas residuales pero todavía hay pocos trabajos que buscan asociar el comportamiento fisiológico con la comunidad microbiana. Se ha reportado en reactores nitrificantes de biopelícula, lodos activados y en una combinación de ambos, la presencia de distintas comunidades bacterianas nitrificantes, así como diferentes concentraciones

de bacterias AOB y NOB, que resultan a su vez en velocidades específicas nitrificantes diferentes (Feng y col., 2012). Así, estos autores reportan diferentes $q\text{NH}_3^+$ para cada sistema, siendo 0.073, 0.054 y 0.069 (g N/g MLSS d) para biopelícula, lodos activados y una combinación de ambos respectivamente, sugiriendo que la acumulación de algunas secuencias de AOB y NOB dominantes en cada sistema, podría ser la causa de las variaciones observadas en las velocidades específicas. En otro trabajo, utilizando gránulos nitrificantes en un SBR, se observa que al cambiar la fuente de nitrógeno de amonio a nitrito ocurre un cambio en la comunidad microbiana, ya que al inicio se tienen una proporción mayor (60%) de bacterias amonio oxidantes (*Nitrosomonas*), una menor (30%) de bacterias nitrito oxidantes, (*Nitrobacter*) y la ausencia de *Nitrospira*. Al realizarse los cambios de fuente de nitrógeno, la comunidad microbiana cambia, pues *Nitrosomonas* casi desaparece y la proporción de *Nitrobacter* y *Nitrospira* coexisten en proporciones similares en 42% (Vázquez-Padín y col., 2009). Lydmark y col. (2007) observan que en una planta piloto de tratamiento de aguas residuales, las velocidades específicas de consumo de amonio se relacionan con la cantidad de bacterias amonio oxidantes que están presentes. Al comparar diferentes tanques, la comunidad microbiana en cada tanque estuvo presente en diferentes proporciones, siendo el tanque que tenía mayor presencia de AOB, era donde se obtenían las velocidades específicas de consumo de amonio mayores. En otro trabajo, en un SBR utilizando gránulos aerobios en un proceso nitrificante, se dio seguimiento a bacterias amonio oxidantes (*Proteobacterias* α y β) y bacterias nitrito oxidantes (*Nitrospira*). En este estudio, se observó un cambio en las comunidades bacterianas en el transcurso del tiempo, ya que al arranque del reactor, la biodiversidad de *Proteobacterias* α era mayor que *proteobacterias* β y al final del estudio, la proporción de *Nitrospira* disminuyó (Feng y col., 2007). Magdalena y col. (2008) reportan que en reactores SBR, con lodos activados aireados constante e intermitentemente, se encuentran poblaciones de bacterias amonio y nitrito oxidantes en diferentes proporciones, y que estas proporciones están relacionadas con las velocidades específicas de consumo, ya que en el sistema aireado intermitentemente, se obtuvo una $q\text{NH}_3^+$ más alta en

donde existía una mayor proporción de AOB de 25.9% y 13.7% de NOB, y una $q\text{NH}_3^+$ menor en los sistemas donde la aireación fue constante, pero con proporciones de 19.9% y 10.8% de AOB y NOB, respectivamente.

Es importante señalar que, en la mayoría de los trabajos, no se reportan rendimientos de producción de nitrato, ni eficiencias de consumo de amonio, quedando en duda si el proceso nitrificante se llevó a cabo establemente. Asimismo, por lo regular, los resultados de los estudios de biología molecular, sólo muestran el cambio en las comunidades microbianas al cambiar las condiciones ambientales o al aumentar o disminuir las cargas de sustrato. Por lo tanto, es necesario evaluar las variables en la respuesta metabólica que permitan entender y asociar el comportamiento nitrificante con su dinámica poblacional.

A la fecha existen pocos trabajos donde se reporta el efecto de un tóxico como el 2-CP en el proceso nitrificante y su dinámica poblacional. De esta manera, junto con estudios fisiológicos y la evaluación del comportamiento de la dinámica poblacional, se abriría la posibilidad de entender el papel de los microorganismos en los diversos sistemas y la posible relación con su respuesta metabólica cuando están en presencia de compuestos recalcitrantes o inhibitorios.

2. JUSTIFICACIÓN

Las aguas residuales contaminadas por compuestos aromáticos y compuestos nitrogenados, representan una problemática de gran interés hacia la salud humana y al medio ambiente. Una alternativa viable para la eliminación de estos compuestos son los procesos biológicos como la nitrificación. Sin embargo, los procesos nitrificantes pueden sufrir efectos negativos por la presencia de compuestos orgánicos como el 2-CP. Se ha reportado que al utilizar lodos expuestos previamente al 2-CP y el uso de un reactor de lotes secuenciados, se observa una mejora tanto en el proceso respiratorio como en el consumo del 2-CP, ya que al transcurso de los ciclos, el efecto inhibitorio del 2-CP sobre la nitrificación se ve disminuido. De esta forma, ha sido posible mantener y aumentar la capacidad nitrificante (en términos de velocidad de consumo de amonio y generación de nitrato) de un lodo aún en presencia del compuesto inhibitorio.

Los cambios metabólicos que ocurren dentro del proceso nitrificante en presencia de 2-CP y en un reactor de lotes secuenciados, también podrían estar asociados a los cambios en la comunidad microbiana. Sin embargo, no se cuenta con información al respecto, por lo que todavía no queda claro el efecto y la relación de los cambios en la comunidad sobre el proceso nitrificante en presencia del 2-CP. Por lo tanto, la evaluación de la dinámica poblacional del consorcio microbiano por técnicas de biología molecular, podría ayudar a entender, cómo es que se logra disminuir en un consorcio microbiano, los efectos inhibitorios del 2-CP sobre la nitrificación.

3. HIPÓTESIS

La relación del comportamiento metabólico de un lodo nitrificante expuesto al 2-CP, con su dinámica poblacional, permitirá entender la disminución de la inhibición en la nitrificación por el 2-CP en un SBR a lo largo de los ciclos de operación.

4. OBJETIVOS

4.1. General

Evaluar en dos reactores de lotes secuenciados, el proceso nitrificante y la dinámica poblacional en presencia de 2-CP utilizando lodos expuestos previamente a compuestos fenólicos.

4.1.1. Objetivos particulares

- Determinar en los reactores SBR nitrificantes, alimentados con diferentes concentraciones de 2-CP, las velocidades específicas de consumo de sustratos ($q_{N-NH_4^+}$, q_{C-2-CP}) y generación de producto ($q_{N-NO_3^-}$), así como las eficiencias de consumo ($E_{N-NH_4^+}$, E_{C-2-CP}) y rendimientos de producción ($Y_{N-NO_3^-}$) a lo largo de los ciclos de operación.
- Evaluar los cambios de la estructura poblacional a lo largo de los ciclos de operación de los reactores SBR nitrificantes en presencia de diferentes concentraciones de 2-CP.
- Evaluar la posible relación de la respuesta fisiológica de los lodos con su dinámica poblacional a lo largo de los ciclos de operación.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Reactores

Se utilizaron dos reactores de lotes secuenciados: SBR1 (Applikon, mod. p100) y SBR2 (Biolab), ambos de 2 l de capacidad, los cuales se alimentaron con bombas Masterflex de flujo reversible de la marca Cole-Parmer Instrument Company, programadas en su encendido y apagado con ayuda de temporizadores de la marca Sper Scientific 810080.

Se contó con dos reactores nitrificantes de lotes secuenciados alimentados con 100 mg/l de N-NH_4^+ y 20 mg/l de C-2-CP. La diferencia entre estos reactores radicó en la fuente de inóculo utilizado. El primer reactor (SBR1) se inoculó con 358 mg/l de proteína microbiana de un lodo nitrificante expuesto previamente al 2-CP de acuerdo a la metodología descrita por Pérez-Alfaro y col. (2013), mientras que el inóculo (372 mg/l de proteína microbiana) del segundo reactor (SBR2) provino de un reactor nitrificante de tanque agitado alimentado en continuo con 89 mg *p*-cresol/l durante 12 meses (Silva y col., 2011). Los reactores se mantuvieron herméticamente cerrados para evitar pérdidas del 2-CP por volatilización o arrastre, de forma que la aireación se realizó de manera intermitente. Así pues, la fase líquida se burbujeó con O_2 tres veces por día durante dos minutos, se mantuvo una agitación a 200 rpm, a un pH de 7.5 y una temperatura ambiente. Los ciclos de operación fueron de 30.125 d, repartidos de la siguiente forma: llenado = 0.02 d; tiempo de reacción = 30 d; sedimentación de lodos = 0.02 d, y drenado = 0.083 d (Martínez–Jardines, 2013). Bajo estas condiciones y durante 6 ciclos de operación, se encontró que la adición de 20 mg C-2-CP/l a los reactores SBR, provocó un efecto inhibitorio sobre el proceso nitrificante, el cual disminuyó a lo largo de los ciclos. Esto es, después de 6 ciclos de operación, se obtuvo una eficiencia de consumo de amonio de 99.74% en el SBR1 y de 99.76% en el SBR2. Los $\text{Y}_{\text{N-NO}_3^-}$ fueron 0.99 y 0.23 para el SBR1 y SBR2, respectivamente. La eficiencia de consumo del 2-CP fue de 100% en ambos reactores. Bajo estas condiciones, los reactores se continuaron alimentando con amonio y 20 mg C-2-CP/l por 5 ciclos más y posteriormente se procedió a evaluar su

comportamiento fisiológico y cinético en las condiciones mencionadas y posteriormente a mayores concentraciones de 2-CP (40 y 60 mg C-2-CP/l).

5.2. Medio de cultivo

El medio de cultivo que se empleó para alimentar los reactores se dividió en dos soluciones para evitar la posible precipitación de los componentes, y o el crecimiento de organismos no deseados en los tanques de alimentación. En el medio A está la fuente de nitrógeno y en el B la de carbono. La composición es la siguiente:

Tabla 3. Composición del medio de cultivo utilizado para los reactores de lotes secuenciados.

A	(g/l)	B	(g/l)
(NH ₄) ₂ SO ₄	(0.47)	NaHCO ₃	(3.5)
NH ₄ Cl	(0.38)	CaCl ₂	(0.02)
KH ₂ PO ₄	(0.56)	FeSO ₄	(0.075)
MgSO ₄	(0.4)		
NaCl	(0.4)		

5.3. Ensayos abióticos

Se llevaron a cabo ensayos abióticos en los reactores SBR1 y SBR2 utilizando el medio de cultivo antes mencionado (Tabla 3), pero en ausencia de biomasa, a fin de determinar la pérdida de 2-CP al ser sometidos a aireación constante y aireación intermitente. Se adicionaron 20 mg C-2-CP /l a los SBR, con una aireación constante y agitación a 200 rpm durante 3 días. Se realizó el mismo experimento con las condiciones antes mencionadas pero ahora con una aireación intermitente de oxígeno puro tres veces por día. La concentración de 2-CP se determinó a lo largo del tiempo para conocer la pérdida del compuesto por volatilización o arrastre.

5.4. Proceso nitrificante en presencia de 2-clorofenol

Una vez realizados los ensayos abióticos, se evaluó el comportamiento fisiológico y cinético de la nitrificación en presencia de diferentes concentraciones de 2-CP: dos ciclos de operación en presencia de 20 mg C-2-CP/l, dos ciclos con 40 mg C-2-CP/l y tres ciclos con 60 mg C-2-CP/l. Para esto se tomaron muestras a diferentes tiempos para obtener el comportamiento cinético con cada una de las concentraciones de 2-CP a lo largo de los ciclos de operación. Se cuantificó el consumo de sustratos y la formación de productos a fin de calcular las diferentes variables de respuesta ($q_{N-NH_4^+}$, q_{C-2-CP} , $q_{N-NO_3^-}$, $E_{N-NH_4^+}$, E_{C-2-CP} , $Y_{N-NO_3^-}$). Para cada SBR y en cada ciclo de operación, se tomaron muestras de lodos para determinar la dinámica poblacional a lo largo de los ciclos de operación.

5.5. Variables de respuesta para evaluar el proceso respiratorio

El comportamiento metabólico y cinético del proceso nitrificante con cada uno de los lodos se evaluó mediante las siguientes variables de respuesta:

Rendimiento de $N-NO_3^-$

$$Y_{N-NO_3^-} = \frac{mg\ de\ N-NO_3^- \frac{producido}{l}}{mg\ de\ N-NH_4^+ \frac{consumido}{l}} \quad (6)$$

Eficiencia de consumo de $N-NH_4^+$

$$E_{N-NH_4^+} = \frac{mg\ de\ N-NH_4^+ \frac{entrada}{l} - mg\ de\ N-NH_4^+ \frac{salida}{l}}{mg\ de\ N-NH_4^+ \frac{entrada}{l}} * 100 \quad (7)$$

Eficiencia de consumo del 2-CP

$$E_{C-2-CP} = \frac{mg\ de\ C-2-CP \frac{entrada}{l} - mg\ de\ C-2-CP \frac{salida}{l}}{mg\ de\ C-2-CP \frac{entrada}{l}} * 100 \quad (8)$$

*C-2-CP= Carbono de 2-CP

*N-NO₃⁻= Nitrógeno de nitrato y

*N-NH₄⁺= Nitrógeno de amonio.

Balances de materia

$$[N-NH_4^+ \text{ entrada}] = [N-NH_4^+ \text{ salida}] + [N-NO_2^-] + [N-NO_3^-] + [N\text{-biomasa}]. \quad (9)$$

Las velocidades específicas (q) de consumo de NH₄⁺, 2-CP y producción de NO₃⁻, así como las fases lag, se calcularon mediante el modelo de Gompertz (Zwietering y col., 1990).

$$Y = A \exp(-\exp(-B((t-C)))) \quad (10)$$

En donde Y es la concentración de amonio y 2-CP consumido o de nitrato producido durante el proceso nitrificante (mg/l), A es la concentración máxima de amonio y 2-CP consumida o de nitrato producida (mg/l) cuando t tiende al infinito, C es el tiempo de inflexión, mientras que B es la velocidad volumétrica de consumo o producción de amonio y 2-CP o nitrato (mg/l/d) y t el tiempo de cultivo (d). Se utilizó el paquete NCSS para analizar y ajustar los datos experimentales al modelo de Gompertz y obtener las constantes A, B, C, los coeficientes de determinación (r²) y la significancia del modelo. Con los coeficientes obtenidos se calcularon las velocidades máximas (Vmax) de consumo o producción (Ec. 11) y a partir de éstas, para cada ensayo se calculó la velocidad específica (q) con la ecuación 12. La fase lag (λ) se calculó de acuerdo a la ecuación 13.

$$V_{max} = \frac{AB}{\exp} \quad (11)$$

$$q = \frac{V_{max}}{\text{Proteína microbiana}} \quad (12)$$

$$\lambda = \frac{BC-1}{B} \quad (13)$$

5.6. Métodos moleculares

5.6.1. Extracción de ADN del lodo

De ambos reactores y a cada concentración de 2-CP evaluada, se tomaron muestras de lodo (50 ml) a lo largo de los ciclos de operación. Las muestras se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 min y los pellets se congelaron a -20 °C hasta la extracción de ADN.

El ADN se extrajo utilizando un kit de aislamiento de ADN UltraClean™ del suelo (MO BIO Laboratories, Carlsbad, CA, EE.UU.), siguiendo las recomendaciones del fabricante. La efectividad de la extracción se verificó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% (p/v) a 85 V durante 50 min. La cuantificación del ADN extraído y la pureza del mismo se determinaron en un espectrofotómetro para micromuestras (NanoDrop 2000, Thermo Scientific) midiendo la absorbancia a 260 nm y la relación entre la absorbancia a 260 y a 280 nm, respectivamente. El ADN se almacenó a -20 °C hasta su uso posterior.

5.6.2. Amplificación de ADN y separación por DGGE

Las regiones V6-V8 del gen 16S ADNr se amplificaron mediante el uso de los cebadores bacterianos 968F (5'-GAACGCGAAGAACCTTACC-3') con la abrazadera y 1401R (5'-CGGTGTGTACAAGACCC-3') (Grosskopf y col., 1998). La abrazadera consistía en una secuencia de 40 pb (5'-CGCCCGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG-3'). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de amplificación se realizó en un termociclador CG1-96 (Corbett Research, Sydney, Australia) como sigue: pre-desnaturalización a 94 °C durante 2 min, 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C para 45 s, hibridación a 60 °C durante 30 s y elongación a 72 °C por 90 s, y por último una post-elongación a 72 °C durante 10 minutos (García-Saucedo y col., 2008.). La mezcla de reacción de PCR consistió en (µl): 0.7 de cada cebador (20 mM), 25 µL de la solución Master Mix la cual contenía una mezcla de nucleótidos (concentración final: 10 mM por nucleótido), amortiguador de pH, MgCl₂ (concentración final: 25 mM) y Taq DNA

polimerasa (concentración final: 5u/ μ L), 4 de ADN de lodos y 18.2 de agua estéril. El rendimiento y calidad de los productos de amplificación se verificó por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%, la separación se realizó a 85 V durante 50 minutos. Con la finalidad de aumentar la cantidad de los productos de amplificación, una vez verificada la obtención de los fragmentos deseados, se procedió a realizar una re-amplificación consecutiva utilizando como molde los productos de PCR obtenidos en cada amplificación previa. Los fragmentos re-amplificados se guardaron en congelación a -20 °C hasta su posterior uso.

Los productos de amplificación se separaron mediante DGGE en un sistema universal de detección de mutación DCode (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EE.UU.). Los geles de poliacrilamida fueron a 6% (p/v) y los gradientes desnaturizantes fueron de 38% y 58% (la solución desnaturizante de stock 100% se realizó a 7 M de urea y 40% de formamida). El gel se corrió durante 5 min a 200 V y después durante 16 h a 85 V en buffer TAE 0.5x a 60 °C, de acuerdo con el procedimiento descrito por García-Saucedo y col. (2008). Al término de la electroforesis los geles se tiñeron por inmersión en una solución de GelRed 3x (Biotium) durante 2 h. El gel se retiró de la solución y se fotografió mediante un fotodocumentador Gel Pro 2200, Carestream.

5.7. Técnicas analíticas

Las técnicas analíticas que se emplearon en el desarrollo experimental de este trabajo se muestran a continuación. Para verificar la reproducibilidad y linealidad de los métodos analíticos utilizados en este trabajo, se realizaron al menos tres curvas de calibración para cada técnica analítica. En la Tabla 4 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 4. Coeficientes de determinación y de variación de las pendientes correspondientes a las curvas de calibración realizadas por los diferentes métodos analíticos.

Análisis	Coefficiente de variación (CV, %)	Coefficiente de determinación (R^2)
Amonio (electrodo selectivo)	7.6 %	0.999±0.003
Nitrito (CIA)	3.3 %	0.998±0.003
Nitrato (CIA)	1.7 %	0.995±0.004
2-CP (HPLC)	7.7%	0.999±0.002
Proteína microbiana (Lowry)	1.26%	0.997±0.003

Todos los métodos presentaron un CV menor al 10%, lo cual indicó una aceptable reproducibilidad, mientras que los R^2 fueron mayores a 0.992, demostrando una respuesta lineal de los métodos. A continuación se desglosan cada uno de los métodos realizados y se muestran ejemplos de las curvas de calibración obtenidas.

5.7.1. Cuantificación de amonio

Para cuantificar el amonio disuelto en solución acuosa mediante su conversión a amoniaco se utilizó un electrodo de ión selectivo (Phoenix electrode Co. Mod. NH331501). El principio del método se basa en desplazar el equilibrio del par NH_4^+/NH_3 en solución acuosa mediante la alcalinización de las muestras. El electrodo selectivo cuenta con una membrana permeable al amonio. Por lo cual fue necesario alcalinizar las muestras 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 150 mg/l). El valor del potencial es proporcional al logaritmo de la concentración, cuyo valor puede

ser calculado directamente de la ecuación de la recta (Ec. 14). La ecuación (15) fue utilizada para calcular la concentración de amonio en las muestras.

$$\text{Potencial} = m \logaritmo ([NH_4^+]) + b \quad (14)$$

$$[NH_4^+] = \text{antilog} \left(\frac{\text{Potencial} - b}{m} \right) \quad (15)$$

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

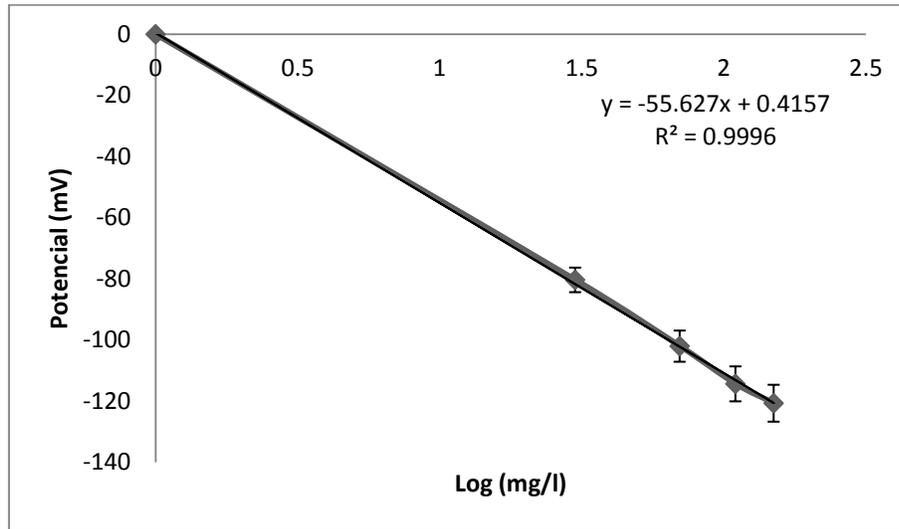


Figura 5. Ejemplo de una curva de calibración para la cuantificación de amonio.

5.7.2. Cuantificación de nitrito y nitrato

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 (CIA) con un detector UV (arreglo de yodos) y se trabajó a una longitud de onda de 240 nm. Las condiciones de operación fueron: voltaje de 12 KV, tiempo de corrida de 10 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 al momento de ser analizadas. Para comprobar la linealidad del método, se construyeron curvas de calibración. La Figura 6 es un ejemplo de éstas.

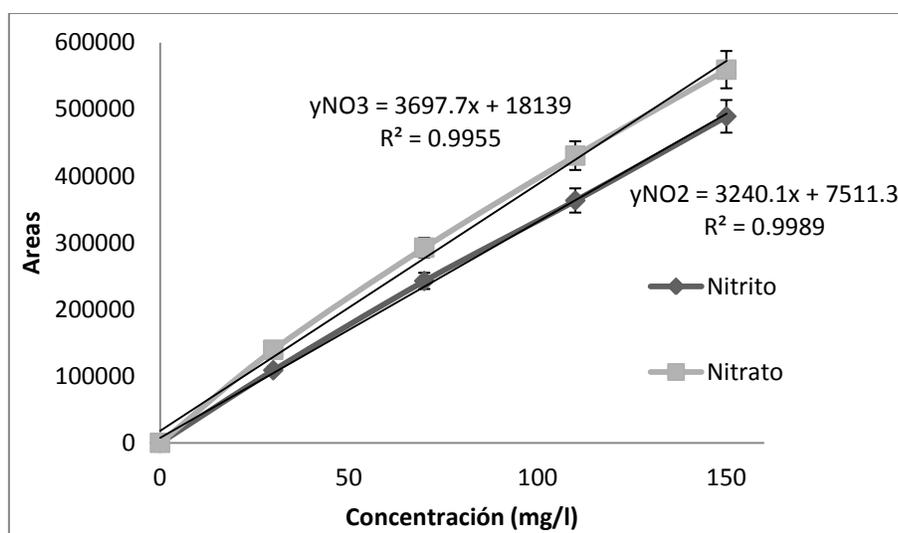


Figura 6. Ejemplos de curvas de calibración para la cuantificación de nitrito y nitrato por electroforesis capilar.

5.7.3. Cuantificación de 2-Clorofenol

Se utilizó un cromatógrafo de líquidos (HPLC) Perkin-Elmer series 200, una columna Bondclone 10u C-18 (Phenomenex, 300 x 3.9 mm). El equipo cuenta con un detector UV/VIS y la longitud de onda para la detección fue 274 nm. La fase móvil fue una mezcla de acetonitrilo y agua (60:40 v/v) y se utilizó un flujo de 1.5 ml/min 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. A partir de una solución madre se realizaron las soluciones estándar con 0, 5, 10, 20 y 30 mg C-2-CP/l. Todas las diluciones se

hicieron con agua desionizada y las soluciones fueron filtradas por una membrana de 0.45 μm para finalmente colocar 2 ml de muestra en cada vial. La Figura 7 es un ejemplo de las curvas de calibración construidas para la técnica de cuantificación de 2-clorofenol por HPLC.

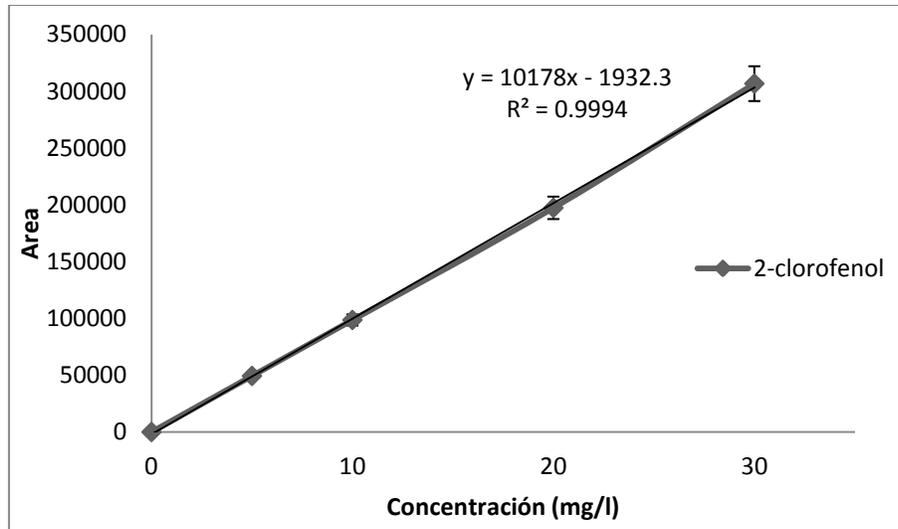


Figura 7. Ejemplo de curva de calibración de 2-clorofenol por HPLC.

5.7.4. Cuantificación de proteína microbiana

El método colorimétrico de Lowry y col. (1951) fue utilizado para determinar la concentración de proteína microbiana en el reactor de lotes secuenciados. 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 (Hycel) 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. 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 con (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 9 muestra un ejemplo de las curvas de calibración utilizadas en esta técnica.

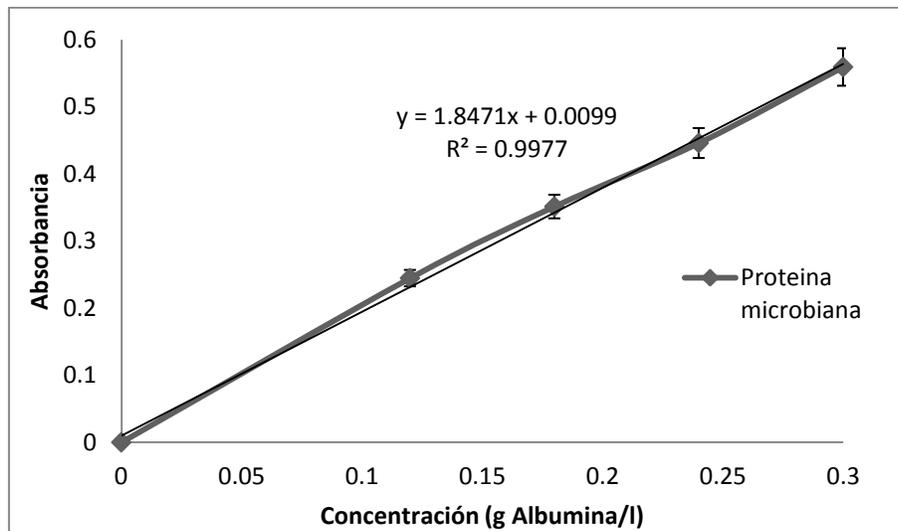


Figura 8. Ejemplo de curva de calibración para la cuantificación de proteína microbiana por el método de Lowry.

6. RESULTADOS

6.1. Ensayos abióticos

En uno de los reactores SBR se realizaron dos ensayos abióticos en presencia de 20 mg/l de C-2-CP, medio mineral, ausencia de biomasa y 200 rpm. Los primeros con aireación constante y los segundos con aireación intermitente tres veces por día. En el primer caso se cuantificó una pérdida del 42% de 2-CP después de 3 días de operación, mientras que en los ensayos con aireación intermitente, se observó que el 99% del 2-CP se mantuvo en el medio hasta el término del ensayo (Figura 9). Estos resultados indican que la forma para operar los reactores sin que el 2-CP se volatilice o se pierda por arrastre es con aireación intermitente de O₂ (Martínez-Jardines, 2013).

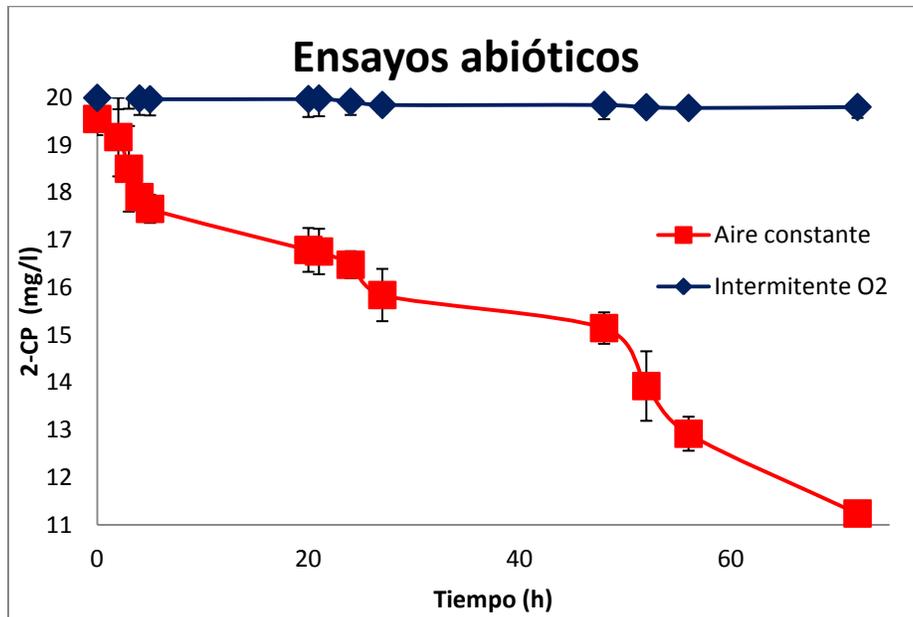


Figura 9. Ensayos abióticos con ausencia de biomasa y en presencia de 2-CP en un reactor SBR: con aireación intermitente y burbujeo con O₂ a lo largo del tiempo.

6.2. Proceso nitrificante en presencia de 2-CP

El proceso nitrificante en presencia de 20, 40 y 60 mg C-2-CP/l se evaluó durante 210 días de operación en los dos reactores SBR. Se realizaron dos ciclos con 20 mg/l de C-2-CP, dos con 40 mg/l de C-2-CP y tres con 60 mg/l de C-2-CP. Los resultados obtenidos se describen a continuación.

6.3. Actividad metabólica de los lodos nitrificantes en presencia de diferentes concentraciones de 2-CP

6.3.1. Reactor SBR1 inoculado con lodos expuestos previamente a 2-CP

Un ejemplo del comportamiento de la nitrificación obtenido con los lodos con contacto previo al 2-CP (reactor SBR1) durante el ciclo 1 de operación en presencia de 20 mg/l de C-2-CP se muestra en la figura 10.A. Se puede observar el consumo total de amonio durante los 30 días de operación. Se obtuvo una acumulación transitoria de nitrito, la cual desapareció al final del ensayo y el amonio consumido fue finalmente oxidado a nitrato. La producción máxima de nitrato se alcanzó hasta los 29 días. Por otra parte, se observó un consumo total del 2-CP en 23 días de operación. El perfil del lodo nitrificante en el reactor SBR1 durante el ciclo 6, cuando la concentración de 2-CP alimentado fue de 60 mg C/l se muestra en la figura 10.B. Se observó un consumo total para el amonio y una acumulación de nitrito transitoria que desapareció antes de los 30 días de operación. Todo el amonio consumido se oxidó a nitrato, indicando que a pesar del aumento en 2-CP, el proceso nitrificante se llevó a cabo completamente. Asimismo, el 2-CP continuó consumiéndose en su totalidad. Estos resultados indican que aun en presencia de concentraciones de 2-CP (20 y 60 mg C/l), los lodos nitrificantes tuvieron la capacidad de llevar a cabo el proceso respiratorio completo y contrastan con los reportes en la literatura que indican que, en ensayos en lote utilizando lodos sin una exposición previa al 2-CP, la adición de concentraciones pequeñas de 2-CP (5 mg C/l), resulta en una falta de

consumo de amonio y producción de nitrato (Martínez-Hernández y col. 2011; Pérez-Alfaro y col. 2013). Sin embargo todos ellos coinciden en que el 2-CP se consume totalmente.

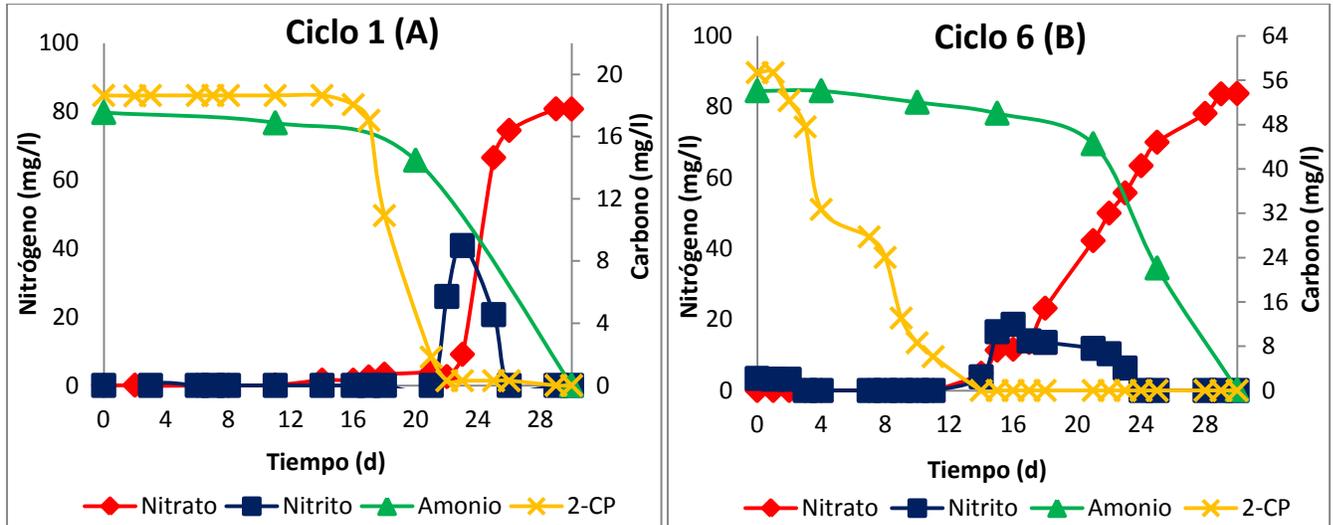


Figura 10. Perfil de la nitrificación en el reactor SBR1 con 20 mg/l de C-2-CP en el ciclo 1 (A) y con 60 mg/l de C-2-CP en el ciclo 6 (B) de operación.

El destino de los compuestos nitrogenados consumidos durante todos los ensayos se puede observar en la tabla 5, donde se presenta el balance de materia obtenido a lo largo de los siete ciclos de operación y el obtenido en el ensayo control en ausencia de 2-CP. Se encontró que la mayor parte del amonio consumido se oxidó a nitrato y que no hubo acumulación de nitrito al final de los ciclos de operación, con excepción del control y del ciclo 3, donde se presentó una concentración despreciable de nitrito. En todos los ciclos la producción de N-biomasa fue menor a 9.56 mg/l, con rendimientos de producción de biomasa de 0.046 ± 0.055 . Esto indica que bajo las condiciones experimentales establecidas y aun en presencia de concentraciones altas de 2-CP, se presentó un proceso completamente desasimilativo, ya que el amonio consumido se utilizó como fuente de energía y se dirigió hacia el proceso catabólico. Estos resultados coinciden con lo mencionado por Wiesmann (1994), quien indica que el proceso nitrificante, sin presencia de algún tipo de materia orgánica es prácticamente catabólico, y encontró valores bajos en los rendimientos

de crecimiento en bacterias amonio oxidantes y nitrito oxidantes de 0.08 g de células/g N-NH₄⁺ y 0.05 g de células/g N-NO₂ respectivamente.

Tabla 5. Balance de materia registrado en el SBR1, inoculado con lodos con contacto previo al 2-CP y alimentados con 2-CP durante 7 ciclos de operación.

Ciclo	Concentración de C-2-CP (mg /l)	Entrada (mg/l)		Salida (mg/l)		
		N-NH ₄ ⁺	N-NH ₄ ⁺	N-NO ₂ ⁻	N-NO ₃ ⁺	N-Biomasa
Control	0	98.95	0.36	2.62	92.7	2.52
1	20	82.82	0.07	0	80.75	2.72
2	20	82.02	0.04	0	79.64	2.26
3	40	82.02	50.57	2.53	25.89	4.35
4	40	102.84	18.32	0	75.51	9.56
5	60	83.33	31.04	0	51.34	0.45
6	60	84.51	0.247	0	83.74	0.11
7	60	79.65	0.22	0	78.86	0.38

En la Figura 11, se muestra el perfil de las concentraciones de los compuestos nitrogenados en el influente y efluente del SBR1 obtenidas en cada uno de los ciclos de operación y correspondiente un periodo de 210 días de experimentación. La concentración de amonio alimentada al reactor se mantuvo constante en 80 mg N/l, con excepción del ciclo 4, donde se registraron alrededor de 100 mg N/l. Esto se puede deber a que como resultado del incremento de 2-CP a 40 mg C/l en el ciclo tres, el consumo de amonio no fue completo, pues se cuantificó en el efluente una concentración de 50.57 mg/l de N-NH₄⁺. Sin embargo, al transcurso de los ciclos e independientemente del incremento en la concentración de 2-CP, la concentración de amonio en el efluente presentó una tendencia a la disminución, y a partir del ciclo 6 el amonio residual fue nulo.

En todos los ciclos, la concentración de nitrito a la salida fue mínima. En los primeros dos ciclos de operación, cuando se adicionaron 20 mg C-2-CP/l al reactor SBR, todo el amonio consumido fue convertido a nitrato, por lo que se encontraron

concentraciones de éste cercanas a 80 mg/l de N-NO_3^+ . Al incrementar la concentración de 2-CP a 40 mg C/l en el ciclo 3 y a 60 mg C-2-CP/l, en el ciclo 5, la concentración de nitrato disminuyó cerca de un 70 y 35% respectivamente con respecto al ciclo alimentado con 20 mg C-2-CP/l, sin embargo, al final del ciclo 6 y 7, se volvió a registrar una producción de nitrato cercana a 80 mg/l de N-NO_3^+ .

Estos resultados indican que, a pesar de los incrementos en la adición del compuesto clorado, el lodo expuesto previamente a 2-CP recuperó su capacidad metabólica nitrificante. Esto se puede atribuir a que el uso de sistemas operados en lotes secuenciados, promueve una adaptación metabólica de los lodos nitrificantes, como ha sido observado en procesos nitrificantes adicionados con diferentes compuestos aromáticos como fenol (Pérez-Alfaro, 2007), *p*-hidroxibenzaldehído (Téllez-Pérez y col., 2013) y 2-CP (Martínez-Jardines, 2013).

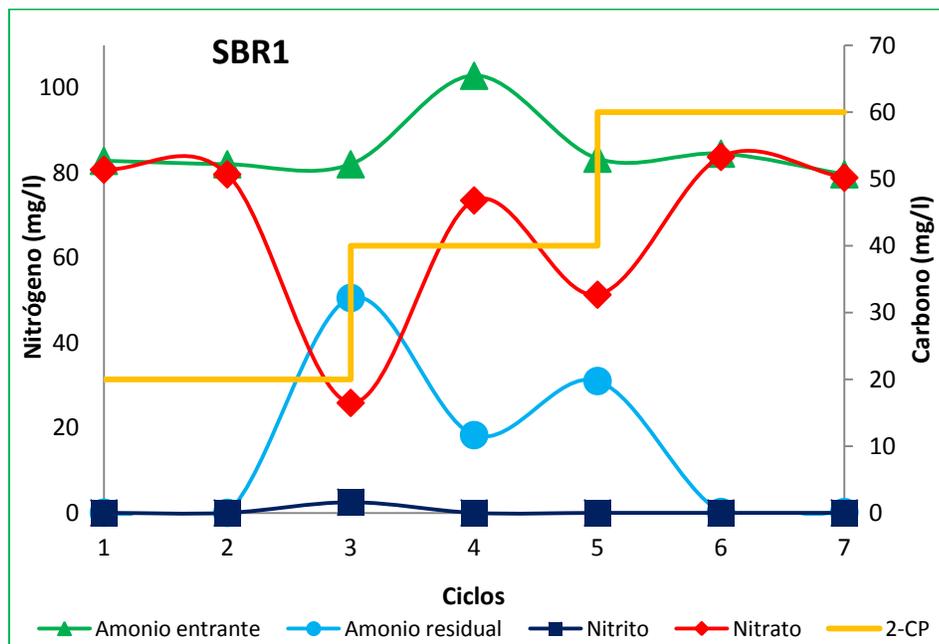


Figura 11. Perfiles del comportamiento nitrificante con respecto al número de ciclos de operación del SBR1 alimentado con 20, 40 y 60 mg/l de C-2-CP.

En los primeros dos ciclos de operación con una concentración de 20 mg/l de C-2-CP, la eficiencia de consumo de amonio ($E_{N-NH_4^+}$) y los rendimientos de producción de nitrato ($Y_{N-NO_3^-}$) se mantuvieron en valores muy parecidos a los obtenidos en el control sin el compuesto clorado y cercanos al 100% y 1, respectivamente, esto es, el proceso nitrificante se mantuvo estable (Tabla 6). Al incrementar la concentración del 2-CP hasta 40 mg C/l, la $E_{N-NH_4^+}$ disminuyó hasta 38.4%, sin embargo el $Y_{N-NO_3^-}$ se mantuvo alto (0.82). Un ciclo de operación después, la $E_{N-NH_4^+}$ fue de 82.17% y el $Y_{N-NO_3^-}$ se mantuvo en 0.86. Posteriormente, el incremento a 60 mg C-2-CP /l en el ciclo 5, provocó un efecto negativo en la eficiencia de consumo de amonio, puesto que disminuyó hasta 62.74%. Aunque es importante mencionar que esta disminución fue menor a la observada en el ciclo 3, cuando la concentración del compuesto fenólico fue de 40 mg/l de C-2-CP. Asimismo, al siguiente ciclo de operación y hasta el final de la experimentación, se obtuvo una $E_{NH_4^+}$ cercana al 100%. Bajo estas condiciones, no se observó un efecto significativo sobre los valores de $Y_{N-NO_3^-}$, puesto que se mantuvieron alrededor de 1.

En todos los ciclos con excepción del ciclo 3, se obtuvo un consumo total del 2-CP independientemente de la concentración adicionada. Se ha sugerido que la utilización de sistemas SBR es una buena estrategia para la degradación de compuestos fenólicos. Moreno y Buitrón, (2004) observaron que en un SBR y utilizando un lodo aclimatado a 4-clorofenol (4-CP), los tiempos de consumo de este compuesto disminuyeron a lo largo de los ciclos de operación. En el presente trabajo, la exposición prolongada del lodo nitrificante a concentraciones altas de 2-CP, resultó en una respuesta metabólica estable y eficiente que permitió un consumo simultáneo de NH_4^+ y concentraciones altas de 2-CP.

Tabla 6. Variables de respuesta determinadas en el reactor SBR1 en presencia de 2-CP durante 7 ciclos de operación.

Reactor		SBR1					
Ciclo	[2-CP]	EN-NH ₄ ⁺	YN-NO ₃ ⁻	Fase lag NH ₄ ⁺	Fase lag NO ₃ ⁻	EC-2-CP	Fase lag 2-CP
Control	----	99.63	0.94	0	0	----	----
1	20	99.9	0.97	10	23	100	17
2	20	99.94	0.97	15	22	100	15
3	40	38.34	0.82	21	23	70.2	19
4	40	82.17	0.86	16	21	100	14
5	60	62.74	0.98	16	17	100	6
6	60	99.7	0.99	20	15	100	1
7	60	99.71	0.99	10	12	100	3

[2-CP]= Concentración de 2-CP (mg C/l)

E N- NH₄⁺ = Porcentaje.

E C-2-CP = Porcentaje.

FL = Fase lag en días.

Y N- NO₃⁻ = mg de N producto/mg de N consumido.

El incremento en la adición de 2-CP a lo largo de los ciclos de operación, tuvo un efecto diferente sobre el proceso amonio y nitrito oxidante, como lo ilustra la Figura 12. En ella se puede observar que la amonio oxidación se afectó negativamente, puesto que la EN-NH₄⁺ disminuyó con cada incremento del 2-CP. Estos resultados concuerdan con los obtenidos con consorcios nitrificantes (Zepeda y col., 2003) y cultivos axénicos de *Nitrosomonas europaea* (Keener y Arp., 1994), donde se han reportado efectos negativos en el proceso amonio oxidante por la adición de compuestos aromáticos. Sin embargo, en el presente estudio, el lodo nitrificante expuesto previamente a 2-CP, tuvo la capacidad metabólica para recuperar su actividad amonio oxidante. En contraste, no se presentó un efecto negativo sobre el proceso nitrito oxidante a lo largo de los ciclos de operación o como consecuencia del aumento en la concentración del 2-CP, puesto que los valores del YN-NO₃⁻ siempre fueron altos. Estos resultados coinciden con los reportados por Pérez-Alfaro y col. (2013), en ensayos en lote en presencia de 5 mg C-2-CP/l, con los de Téllez-Pérez y col. (2013) en reactores SBR nitrificantes adicionados con *p*-hidroxibenzaldehído y

con los de Salas (2014) en reactores SBR adicionados con *o*-cresol, *m*-cresol y *p*-cresol, en los cuales, el proceso nitrito oxidante no fue afectado por la presencia de los compuestos fenólicos.

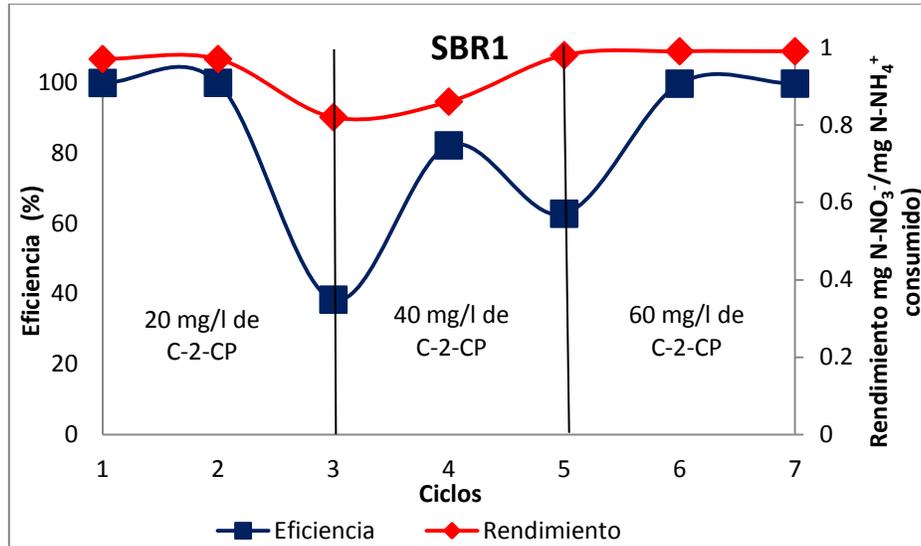


Figura 12. Perfiles de eficiencia de consumo de amonio y rendimientos de producción de nitrato a lo largo de los ciclos de operación en presencia de 2-CP.

En la figura 13 se muestra, el comportamiento de las fases lag obtenidas en el reactor SBR1 con el lodo nitrificante expuesto previamente a 2-CP. La fase lag requerida para el consumo de amonio alcanzó valores entre 10 y 21 días. En el ciclo 1 con 20 mg/l de C-2-CP fue de 10 días, se incrementó a 21 días cuando la concentración de 2-CP se aumentó hasta 40 mg C/l (ciclo 3) y finalmente, en el último ciclo de operación con 60 mg/l de C-2-CP la fase lag disminuyó a 10 días. Aunque la fase lag se mantuvo oscilando en el transcurso de los ciclos, el lodo nitrificante pudo mantener su capacidad metabólica para iniciar el consumo de amonio a pesar del incremento en la concentración del 2-CP. Es interesante notar que cuando los valores de las fases lag fueron mayores, se presentaron las menores eficiencias de consumo de amonio (Tabla 6). Este comportamiento pudo estar asociado con el efecto del 2-CP sobre las membranas celulares, pues se ha reportado que los compuestos aromáticos son capaces de modificar su estructura al disolverla o volverla más fluida (Sikkema y col., 1995). Otros autores como Guckert y

col. (1986), Segura y col. (2004) y Bernal y col. (2007), proponen que tras el contacto con este tipo de compuestos se observa la isomerización de los ácidos grasos de la membrana de la configuración *cis* a *trans*, lo cual es la causa de la rigidez de la membrana. Esto podría repercutir en el mecanismo de transporte para el amonio o bien en los mecanismos de reparación del mismo, como se ha sugerido recientemente (Pérez-Alfaro, 2015). Las fases lag requeridas para la producción de nitrato fueron de 23 días en los primeros cuatro ciclos, cuando se alimentaron 20 y 40 mg C-2-CP/l y a pesar del incremento a 60 mg C/l, éstas decrecieron a 12 días en el ciclo 7 de operación mostrando que a pesar de la concentración alta de 2-CP, el lodo nitrificante fue capaz de iniciar la producción de nitrato en un tiempo menor. Es importante recordar que a pesar de que en los primeros ciclos se requirió de mayor tiempo para la producción de nitrato, la conversión de amonio a nitrato fue muy cercana a 1 (Tabla 6), esto es, el proceso nitrato oxidante se mantuvo estable durante toda la experimentación independientemente de la concentración de 2-CP. Finalmente, se han reportado fases lag de hasta 35 días para iniciar el consumo de 10 mg/l C-2-CP en ensayos en lote con lodos no expuestos previamente a compuestos aromáticos (Pérez-Alfaro y col., 2013). En este estudio, la fase lag máxima fue de 19 días y se presentó cuando se inició la adición de 40 mg C-2-CP/l. Sin embargo esta fase lag disminuyó hasta 3 días en el último ciclo de experimentación. Estos resultados indican que el uso de lodos nitrificantes expuestos previamente a 2-CP y la utilización de un sistema tipo SBR favoreció la capacidad metabólica del lodo nitrificante para iniciar el consumo de los sustratos y la formación de productos aún en presencia de concentraciones altas de 2-CP.

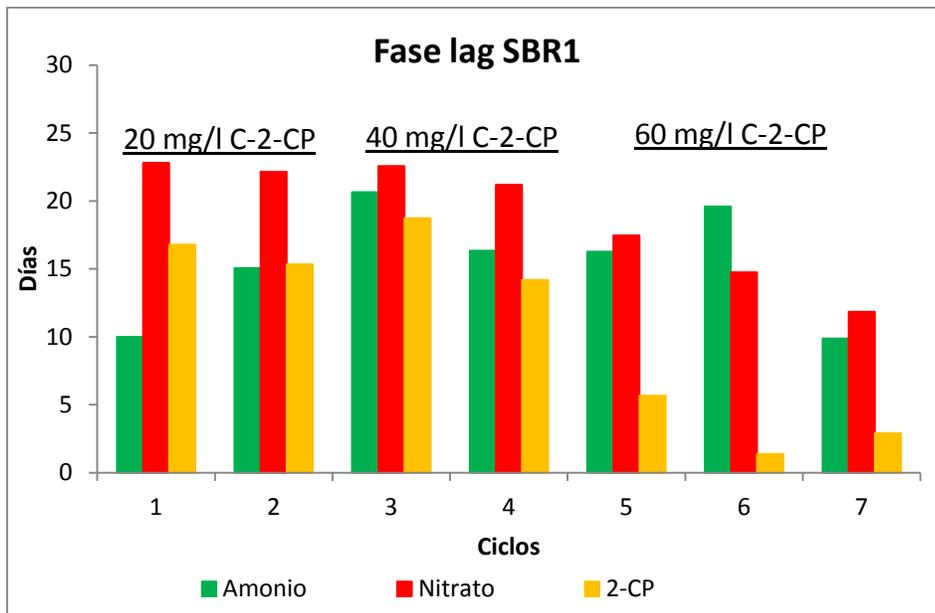


Figura 13. Fases lag del lodo nitrificante en el SBR1 a lo largo de los ciclos de operación en presencia de 2-CP.

6.3.2. Reactor SBR2 inoculado con lodos expuestos previamente a *p*-cresol

La figura 14 muestra los perfiles nitrificantes obtenidos con el lodo expuesto previamente a *p*-cresol (reactor SBR2). En el ciclo 1 de operación en presencia de 20 mg/l de C-2-CP (Figura 14.A), el consumo total de amonio y su oxidación a nitrato se alcanzó durante los primeros 22 días de operación. Se obtuvo una acumulación transitoria de nitrito la cual desapareció al final del ciclo. Asimismo, el consumo total de 2-CP se alcanzó a los 15 días de operación. En general, los lodos expuestos previamente a *p*-cresol, lograron llevar a cabo el proceso nitrificante en 8 días menos que los lodos con exposición previa a 2-CP. Para el ciclo 6 de operación con 60 mg/l de C-2-CP (Figura 14.B), se observa un consumo total del 2-CP y casi completo de amonio, pero éste es convertido a una mezcla de nitrito y nitrato, lo cual indica que a diferencia del reactor SBR1, se presentó una nitrificación parcial. Entonces, a pesar de estar en concentraciones altas de 2-CP (60 mg C/l), el lodo nitrificante expuesto previamente a *p*-cresol sigue presentando actividad nitrificante.

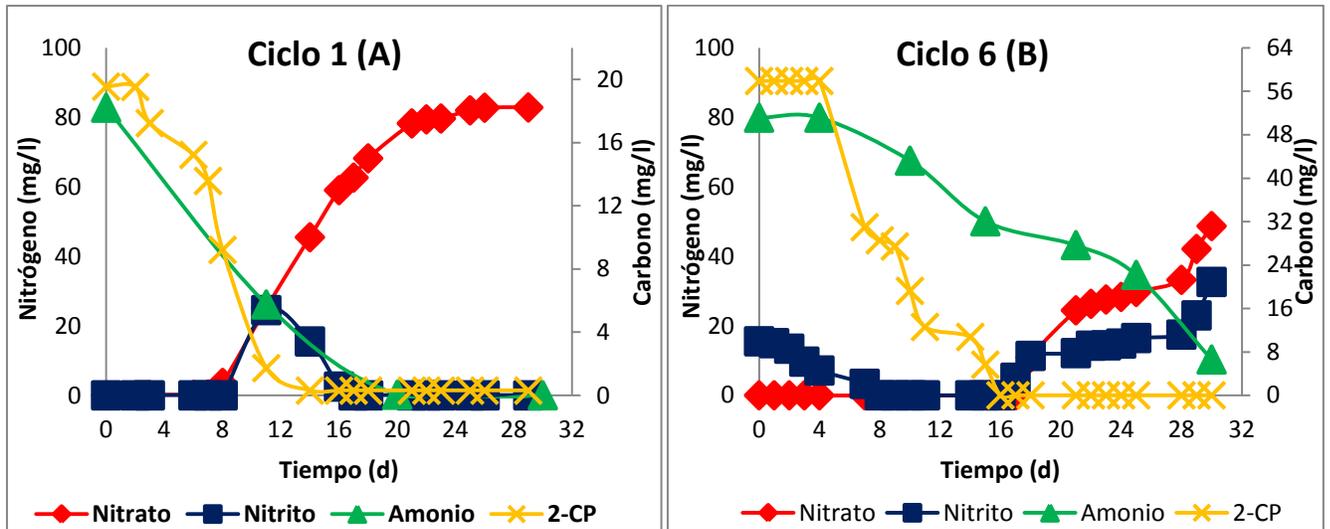


Figura 14. Perfil de la nitrificación en el reactor SBR2 con 20 mg/l de C-2-CP en el ciclo 1 (A) y con 60 mg/l de C-2-CP en el ciclo 6 (B) de operación.

El balance de materia para el reactor SBR2 a lo largo de los ciclos de operación se muestra en la tabla 7. Se puede observar que de forma similar al control sin 2-CP, en los primeros dos ciclos el destino mayoritario del $N-NH_4^+$ alimentado fue a la formación de $N-NO_3^-$ y una mínima producción de N-biomasa. A diferencia de los resultados encontrados en el reactor SBR1, para el ciclo 3 y hasta el 6, la nitrificación no fue completa, pues gran parte del amonio alimentado se oxidó a nitrito, nitrato y se convirtió a una mayor fracción de N-biomasa, de hasta 13.52 mg/l en el ciclo 5. Esto indica que aunque la mayor parte del amonio se utilizó como fuente de energía en el proceso catabólico, al aumentar la concentración de 2-CP, el proceso pudiera estarse desviando a la asimilación. Bajo estas condiciones el rendimiento de biomasa fue de 0.077 ± 0.060 , por lo tanto el reactor SBR1 es 40% menos asimilativo que el reactor SBR2. Texier y Gómez (2004) reportan en un lodo nitrificante operado en un SBR y sin presencia de algún compuesto fenólico, velocidades de crecimiento microbiano de 1.3 mg N-biomasa/l-d, esto nos da una pauta para indicar que, en el lodo nitrificante con exposición previa a *p*-cresol, la disminución en la velocidad de producción de N-biomasa (0.196 mg N-biomasa/l-d) se podría atribuir a la presencia de concentraciones altas de 2-CP.

Tabla 7. Balance de materia registrado en el SBR2, inoculado con lodos con contacto previo al *p*-cresol y alimentados con 2-CP durante 7 ciclos de operación.

Ciclo	Concentración de C-2-CP (mg /l)	Entrada (mg/l)		Salida (mg/l)		
		N-NH ₄ ⁺	N-NH ₄ ⁺	N-NO ₂ ⁻	N-NO ₃ ⁺	N-Biomasa
Control	0	95.01	0.31	0	94.94	0.58
1	20	82.82	0.03	0	82.8	1.05
2	20	82.43	0.11	0	81.15	2.33
3	40	85.39	13.37	43.69	23.55	9.5
4	40	82.02	0.21	32.95	55.07	7.29
5	60	83.33	8.96	47.93	24.98	13.52
6	60	79.9	10.29	32.62	48.69	3.22
7	60	81.28	0.94	3.82	76.17	4.43

En la Figura 15, se muestra el perfil de las concentraciones de los compuestos nitrogenados en el influente y efluente del SBR2 a través de los ciclos de operación sobre un periodo de 210 días. Aunque la cantidad de amonio alimentada fue constante para todos los ciclos, su consumo no fue completo. Como resultado del incremento en la concentración de 2-CP, a partir del ciclo 3 y hasta el ciclo 6 se encontró nitrito en el efluente. Durante este mismo periodo, la concentración de nitrato producido decayó. Al igual que en el reactor SBR1, el lodo del reactor SBR2, expuesto previamente a *p*-cresol, tuvo la capacidad metabólica para recuperar su actividad nitrificante en el ciclo 7 de operación, donde en presencia de una alta concentración de 2-CP, se presenta consumo de amonio, una mínima producción de nitrito y mayoritaria de nitrato.

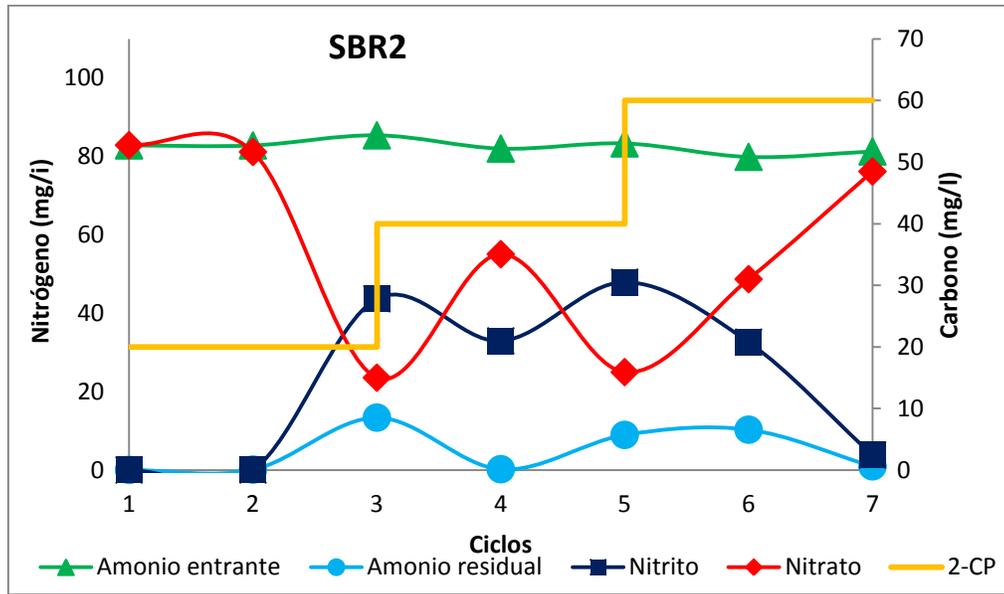


Figura 15. Perfiles del comportamiento nitrificante con respecto al número de ciclos de operación del SBR2 alimentado con 20, 40 y 60 mg/l de C-2-CP.

Los resultados de la tabla 8 demuestran que el proceso nitrificante del lodo expuesto previamente a *p*-cresol en el reactor SBR2, en los primeros dos ciclos de operación con una concentración de 20 mg/l de C-2-CP se mantienen, al igual que el control sin 2-CP, estables y con un proceso nitrificante completo. Se ha reportado que en ensayos en lote y en presencia de 50 mg/l de C-2-CP, 2.9 g SSV/l de este lodo fue capaz de consumir el 16% de amonio alimentado (Silva y col., 2011). En el presente estudio, aunque el reactor SBR se inoculó con una concentración celular mucho menor (350 mg/l de proteína bacteriana) fue posible obtener en presencia de 20, 40 y 60 mg/l de C-2-CP, y en todos los ciclos, eficiencias arriba de $EN-NH_4^+=84\%$. Por otro lado, como resultado del incremento de 2-CP a 40 mg C/l en el ciclo 3, el $Y_{N-NO_3^-}$ decayó hasta 0.32, aunque en el siguiente ciclo con la misma concentración de 2-CP, incrementó hasta 0.67. En el ciclo 5 el $Y_{N-NO_3^-}$ volvió a decaer hasta 0.33. Los valores bajos de rendimiento indican una nitrificación parcial y fue hasta el ciclo 7 que, aun en presencia de 60 mg/l de C-2-CP, el proceso nitrificante se recuperó, puesto que se obtuvieron $EN-NH_4^+=98\%$ y $Y_{N-NO_3^-}=0.94$.

Tabla 8. Variables de respuesta determinadas en el reactor SBR2 en presencia de 2-CP durante los 7 ciclos de operación.

Reactor	SBR2							
	Ciclo	[2-CP]	EN-NH ₄ ⁺	YN-NO ₃ ⁻	Fase lag NH ₄ ⁺	Fase lag NO ₃ ⁻	EC-2-CP	Fase lag 2-CP
Control	----		99.61	0.99	0	0	----	----
1	20		99.95	0.99	8	8	100	3
2	20		99.85	0.98	1	10	100	1
3	40		84.33	0.32	13	27	84.3	18
4	40		99.74	0.67	10	18	100	11
5	60		89.24	0.33	18	20	100	9
6	60		87.11	0.69	9	16	100	4
7	60		98.84	0.94	8	14	100	2

[2-CP]= Concentración de 2-CP (mg C/l)

E N- NH₄⁺ = Porcentaje.

E C-2-CP = Porcentaje.

FL = Fase lag en días.

Y N- NO₃⁻ = mg de N producto/mg de N consumido.

En la figura 16 se puede observar que con cada incremento en la concentración de 2-CP, el proceso amonio oxidante se ve afectado mínimamente, mientras que a partir del ciclo 3 y hasta el ciclo 6, se presenta una disminución en el rendimiento Y_{N-NO₃⁻} indicando que el proceso nitrito oxidante se ve afectado significativamente. El lodo nitrificante en el reactor SBR2 solo fue capaz de llevar a cabo una nitrificación completa en concentraciones altas de 2-CP después de 7 ciclos de operación. Se ha reportado con anterioridad (Pérez-Alfaro y col., 2013) un efecto negativo sobre el proceso nitrito oxidante en lodos sin contacto previo a compuestos aromáticos y con 10 mg C- 2-CP/l.

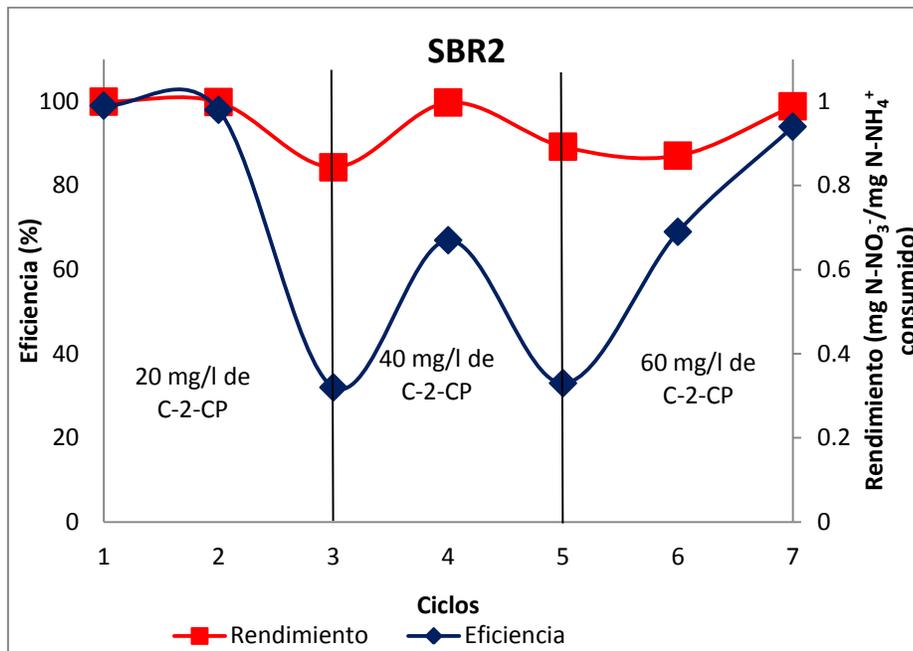


Figura 16. Perfiles de eficiencia de consumo de amonio y rendimientos de producción de nitrato a lo largo de los ciclos de operación en presencia de 2-CP.

El lodo con exposición previa a *p*-cresol presentó la mayor fase de retardo para el consumo de amonio (18 días) cuando en el ciclo 5 se alimentaron 60 mg/l de C-2-CP (Figura 17), sin embargo es interesante notar que dos ciclos de operación después con la misma concentración, dan como resultado fases lag mucho menores, de solo 9 y 8 días respectivamente. Un comportamiento similar se encontró con las fases lag para la formación de nitrato, con la diferencia de que la máxima se presentó en el ciclo 3, cuando la concentración de 2-CP se aumentó a 40 mg C/l. La fase lag tuvo una tendencia al decremento al final del ciclo 7, donde correspondió a 14 días. Es importante mencionar que el incremento en las fases lag para la producción de nitrato coincidió con el periodo en que el $Y_{N-NO_3^-}$ disminuyó, esto es, además de que se requirió de un mayor tiempo para la formación de nitrato, la formación de éste a partir de la oxidación de amonio fue menor. Finalmente, las menores fases lag fueron las registradas para el consumo de 2-CP, ya que se mantuvieron entre 18 y 2 días en el ciclo 3 y 7 respectivamente, lo cual indica que el tiempo necesario para iniciar el consumo de este compuesto fue disminuyendo.

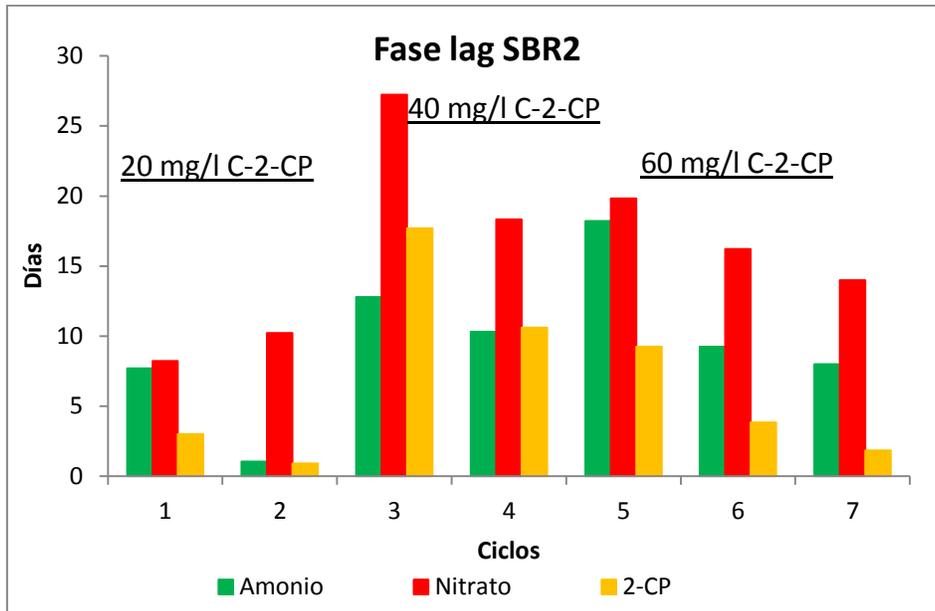


Figura 17. Fases lag del lodo nitrificante en el SBR2 a lo largo de los ciclos de operación en presencia de 2-CP.

El incremento en la concentración de 2-CP tuvo un efecto diferente sobre el comportamiento de cada uno de los lodos nitrificantes. En el lodo con exposición previa a 2-CP, el aumento de 20 a 60 mg C-2-CP/l provocó una disminución en la eficiencia de consumo de amonio, esto es, se presentó una afectación significativa en el proceso amonio oxidante. En contraste, en el lodo expuesto previamente a *p*-cresol, la amonio oxidación se mantuvo sin cambios importantes, puesto que la eficiencia de consumo de amonio permaneció entre 85-99% (Figura 18). Algunos autores sugieren que en presencia de 2-CP (5-10 mg/l de C-2-CP), el proceso que más se afecta en la nitrificación es la amonio oxidación (Martínez-Hernández y col., 2011; Pérez-Alfaro y col., 2013) y que este efecto negativo sobre el proceso amonio oxidante es debido a que ocurre una afectación a nivel de transporte (Pérez-Alfaro, 2015), en la formación de enzimas (Keener and Arp, 1994), por cambios en la estructura de la membrana (Sikkema y col., 1995) o bien por la disminución de bacterias nitrificantes (Wang y col., 2009). Por otro lado, se ha reportado que en presencia de *p*-cresol, en ensayos nitrificantes en lote (Texier y Gómez 2002) y reactores SBR (Texier y Gómez 2007), se alcanzan $EN-NH_4^+$ de hasta 99%, indicando

que el proceso amonio oxidante no se ve afectado. Se podría atribuir que pese al cambio del compuesto fenólico alimentado (*p*-cresol a 2-CP), las E_{NH_4+} altas registradas con el lodo del SBR2 se deben a su previa exposición al *p*-cresol.

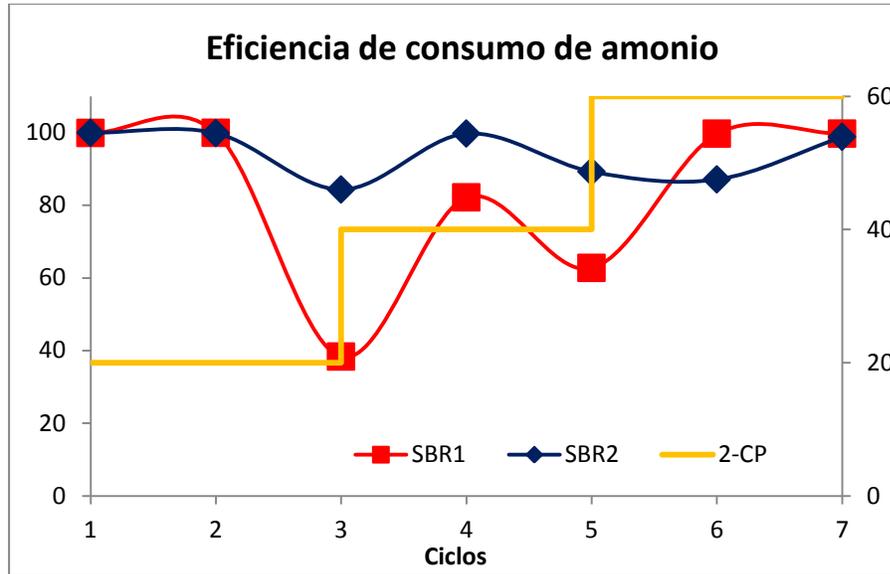


Figura 18. Eficiencias de consumo de amonio de los lodos nitrificantes en los reactores SBR1 y SBR2 a lo largo de los ciclos de operación en presencia de 2-CP.

El proceso nitrito oxidante resultó más afectado en el lodo del reactor SBR2 (expuesto previamente a *p*-cresol), mientras que en el lodo del reactor SBR1 (expuesto previamente a 2-CP), el efecto del incremento de 2-CP sobre la nitrito oxidación fue mínimo (figura 19). Se ha reportado que la presencia de 2-CP (Martínez-Hernández y col., 2011; Pérez-Alfaro y col., 2013) y de *p*-cresol (Silva y col., 2009), no afecta el proceso nitrito oxidante. Sin embargo, se sabe que con la adición de 6.4 y 13.5 mg/l de sulfuro, los rendimientos de producción de nitrato disminuyen a 0.7 y 0.48 respectivamente, con respecto a un control sin adición de sulfuro (Bejarano y col., 2012). Los autores proponen que esto se debe a una afectación a nivel enzimático sobre la nitrito óxido reductasa. El hecho de que el proceso nitrito oxidante haya resultado afectado en los lodos con contacto previo a *p*-cresol, podría estar relacionado con una afectación en el transporte de nitrito, más que en el de amonio, como se ha sugerido recientemente (Pérez-Alfaro y col., 2015),

o bien, como en el caso del sulfuro, a un efecto directo del 2-CP sobre la enzima nitrito óxido reductasa.

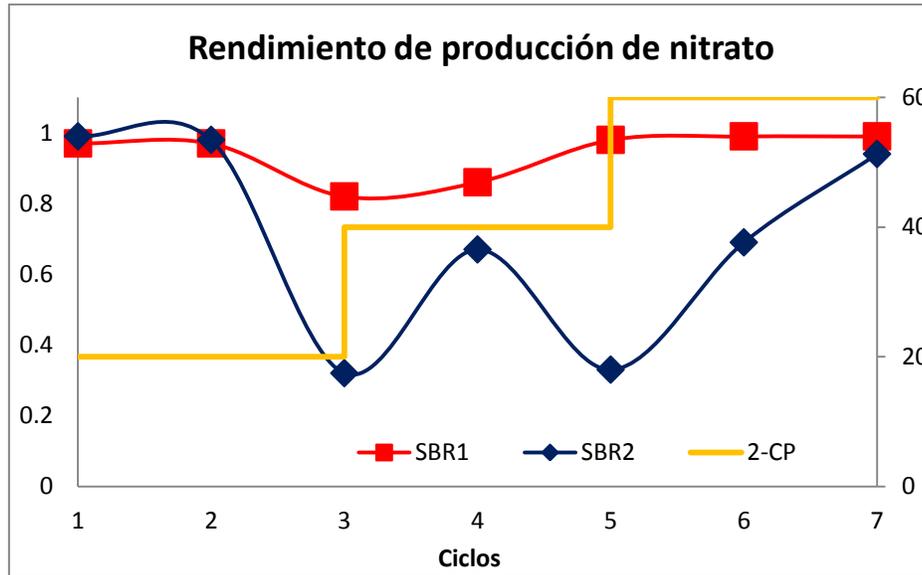


Figura 19. Rendimientos de producción de nitrato de los lodos nitrificantes en los reactores SBR1 y SBR2 a lo largo de los ciclos de operación en presencia de 2-CP.

Todos estos resultados indican que la procedencia del lodo, su historia previa, y el uso de reactores SBR, tienen un papel importante en su respuesta metabólica. Sin embargo hace falta realizar más estudios al respecto a fin de entender cómo es que el 2-CP afecta la capacidad metabólica de los lodos nitrificantes.

6.4. Actividad cinética de los lodos nitrificantes en presencia de diferentes concentraciones 2-CP

En la tabla 9 se muestra las velocidades específicas tanto de consumo como de producción para el lodo nitrificante del reactor SBR1 a lo largo de los ciclos de operación y en presencia de diferentes concentraciones de 2-CP. Es importante destacar que en todos los ciclos con 2-CP la concentración celular en el reactor se

mantuvo constante (350 ± 50 mg proteína microbiana/l). Por lo tanto, los cambios en las velocidades específicas se pueden asociar con cambios cinéticos y no relacionados con la concentración de la biomasa presente. De manera general se puede observar que en los ciclos en los cuales se realiza el incremento de la concentración de 2-CP, se presenta la disminución de las velocidades específicas de consumo de amonio y formación de producto confirmando el efecto inhibitorio sobre los procesos amonio y nitrito oxidantes. Comparando con el control, se presentó una inhibición en el proceso nitrificante debida a la presencia del 2-CP puesto que en el ciclo 1 de operación, las velocidades $q_{N-NH_4^+}$ y $q_{N-NO_3^-}$ disminuyeron un 90 y 14%, respectivamente. Con el incremento a 40 mg C/l de 2-CP en el ciclo 3 de operación y con respecto al ciclo 2, las velocidades específicas vuelven a decaer un 85% para $q_{N-NH_4^+}$ y 75% para $q_{N-NO_3^-}$. En el ciclo 5 y con respecto al ciclo 4, la disminución de las velocidades específicas solamente fue de 38% y 56% para amonio y nitrato respectivamente. En el último ciclo de operación con 60 mg/l de C-2-CP, las $q_{N-NH_4^+}$ y $q_{N-NO_3^-}$ presentaron valores muy similares a los obtenidos en el ciclo operado con 40 mg/l de C-2-CP, lo que indica que a pesar del incremento del 2-CP, el efecto inhibitorio que tiene el compuesto clorado, sobre el proceso nitrificante disminuyó. Como se menciona en el apartado anterior, el lodo del SBR1 presentó una adaptación metabólica que le permitió oxidar el amonio a nitrato cada vez en menor tiempo a pesar de la alimentación con 2-CP, esto resultó también en una adaptación cinética, puesto que aun en presencia de concentraciones altas de 2-CP, las velocidades específicas disminuyeron en menor proporción. Se han reportado resultados similares en reactores SBR nitrificantes adicionados con 2-clorofenol (Martínez-Jardines, 2013) y con otros compuestos inhibitorios, tales como el *p*-hidroxibenzaldehido (Téllez-Pérez y col., 2013), el *p*-cresol y sus intermediarios (Silva y col., 2014) y el *m*-cresol (Zepeda y col., 2012), en los cuales, al igual que en este trabajo, existe una disminución en el efecto inhibitorio de los compuestos aromáticos sobre el proceso nitrificante al transcurrir los ciclos de operación. Con los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede señalar que en los lodos que habían sido expuestos previamente a 2-CP (SBR1), el proceso cinético que más se afectó por la

presencia de 2-CP fue la amonio oxidación. Estos resultados coinciden con los reportados por Pérez Alfaro y col. (2013), quienes señalan que en ensayos en lote con lodos sin exposición previa a 2-CP, se afecta significativamente el proceso amonio oxidante. Finalmente, al transcurso de los ciclos de operación, la velocidad específica de consumo de 2-CP se mantuvo sin cambios significativos en relación a su incremento de concentración. Una tendencia similar se ha reportado anteriormente en ensayos en lote con concentraciones de 2-CP entre 2.5 y 10 mg/l de C-2-CP (Pérez-Alfaro y col 2013). Es importante señalar que a pesar de trabajar con concentraciones de 2-CP entre 20 y 60 mg C/l, el lodo nitrificante mantiene la capacidad cinética para consumirlo.

Tabla 9. Velocidades específicas determinadas en el reactor SBR1 en presencia de 2-CP hasta el ciclo 7 de operación.

Reactor		SBR1		
Ciclo	[2-CP]	qN-NH ₄ ⁺	qN-NO ₃ ⁻	qC-2-CP
Control	----	980.56	131.89	-----
1	20	96.33	113.80	19.75
2	20	104.74	40.75	20.14
3	40	15.21	10.10	7.28
4	40	15.15	32.27	16.06
5	60	9.39	14.12	17.54
6	60	25.57	19.23	17.22
7	60	18.06	27.85	23.27

[2-CP]= Concentración de 2-CP (mg C/l)

q N- NO₃⁻= mg de producto formado/g proteína d.

q N- NH₄⁺, q2-CP= mg sustrato consumido/g proteína d.

Las diferentes específicas tanto de consumo como de producción, para el lodo nitrificante del reactor SBR2, con exposición previa a *p*-cresol, a lo largo de los ciclos de operación y en presencia de 2-CP, se muestra en la tabla 10. Al igual que el reactor SBR1, en el reactor SBR2, la concentración celular se mantuvo en 350±60 mg proteína microbiana/l durante todo el estudio en presencia de 2-CP. De forma

similar al comportamiento encontrado en el SBR1, se determinó una disminución de las velocidades específicas con el primer incremento de 2-CP, indicando que también el lodo nitrificante expuesto previamente a *p*-cresol sufrió una inhibición por el 2-CP. De acuerdo al control en ausencia de 2-CP, las $q_{N-NH_4^+}$ y $q_{N-NO_3^-}$ disminuyen 96 y 90% respectivamente, esto es, la inhibición en el proceso nitrificante fue mayor en los lodos del reactor SBR2. Con el incremento de 2-CP en el ciclo 3 y con respecto al ciclo 2, las velocidades específicas volvieron a disminuir 86% para el caso de amonio y 30% para el caso de nitrato. Aunque con el incremento a 60 se encontró un decremento en la $q_{N-NH_4^+}$, al final del ciclo 7 ésta aumentó a 19.03 mg N-NH₄⁺/g proteína d, indicando una disminución del efecto inhibitorio del 2-CP sobre el proceso amonio oxidante. Bajo estas condiciones y con respecto a la $q_{N-NO_3^-}$, ésta no se vio afectada significativamente. Al igual que con el SBR1, en los lodos del reactor SBR2, la amonio oxidación fue el proceso nitrificante con mayor afectación cinética. El efecto negativo del 2-CP en el comportamiento cinético amonio oxidante podría estar relacionado con una inhibición competitiva sobre la actividad de la enzima amonio monooxigenasa (AMO), ya que se ha observado que esta enzima es capaz de oxidar diversos compuestos aromáticos (Juliette y col., 1993; Keener y Arp 1994; McCarty 1999). Se sugiere que, independientemente de la previa exposición de los lodos a compuestos fenólicos, la forma de operación de los reactores SBR tuvo una influencia importante en el comportamiento cinético de ambos lodos. Texier y Gómez (2007), reportan en un reactor SBR resultados similares en el comportamiento de las velocidades específicas de consumo y producción, donde observan un efecto inhibitorio por la presencia de *p*-cresol en un lodo nitrificante sin exposición previa a algún compuesto orgánico, y posteriormente observan una tendencia a la recuperación de las velocidades específicas aun con el incremento en la concentración de *p*-cresol. Por último, la velocidad específica de consumo de 2-CP, al igual que en el reactor SBR1, se mantuvo sin cambios significativos a lo largo de la experimentación.

A pesar de la afectación cinética en el proceso amonio oxidante, el lodo mantuvo una velocidad específica de consumo de 2-CP similar entre el ciclo 1 y el ciclo 7 de operación ($q_{C-2-CP}=12.78\pm 77$ mg C-2-CP/g proteína d). Estos resultados podrían estar relacionados con la participación de la AMO en el consumo de 2-CP, como ha sido recientemente mostrado por Pérez-Alfaro (2015), quien sugiere que esta enzima podría estar involucrada en la primera oxidación del 2-CP a clorocatecol.

Tabla 10. Velocidades específicas determinadas en el reactor SBR2 en presencia de 2-CP hasta el ciclo 7 de operación.

Reactor		SBR2		
Ciclo	[2-CP]	$q_{N-NH_4^+}$	$q_{N-NO_3^-}$	q_{C-2-CP}
Control	----	1515.47	258.48	----
1	20	57.93	25.81	12.01
2	20	83.68	53.42	15.09
3	40	11.55	36.99	8.14
4	40	9.80	10.93	7.88
5	60	19.30	10.40	16.77
6	60	8.13	10.50	17.22
7	60	19.03	24.78	13.54

[2-CP]= Concentración de 2-CP (mg C/l)

$q_{N-NO_3^-}$ = mg de producto formado/g proteína d.

$q_{N-NH_4^+}$, q_{C-2-CP} = mg sustrato consumido/g proteína d.

En la Figura 20 se muestran las velocidades específicas de los lodos nitrificantes en los reactores SBR1 y SBR2. Se encontró que con ambos lodos nitrificantes, y a pesar del incremento en la concentración a 40 y 60 mg de C-2-CP/l, el efecto inhibitorio sobre las $q_{N-NH_4^+}$ y $q_{N-NO_3^-}$ en ambos reactores, no fue mayor que el observado cuando por primera vez la adición de 2-CP fue de 20 mg de C-2-CP/l. De hecho, con ambos lodos, se encontró una ligera tendencia al incremento en ambas velocidades (Figura 22.A y 22.B). Por otro lado, en ambos reactores, independientemente de los ciclos transcurridos, la q_{C-2-CP} presentó valores similares entre el ciclo 1 y al final del ciclo 7, indicando que no hubo un efecto significativo del aumento de la concentración del 2-CP sobre ésta (Figura 22.C).

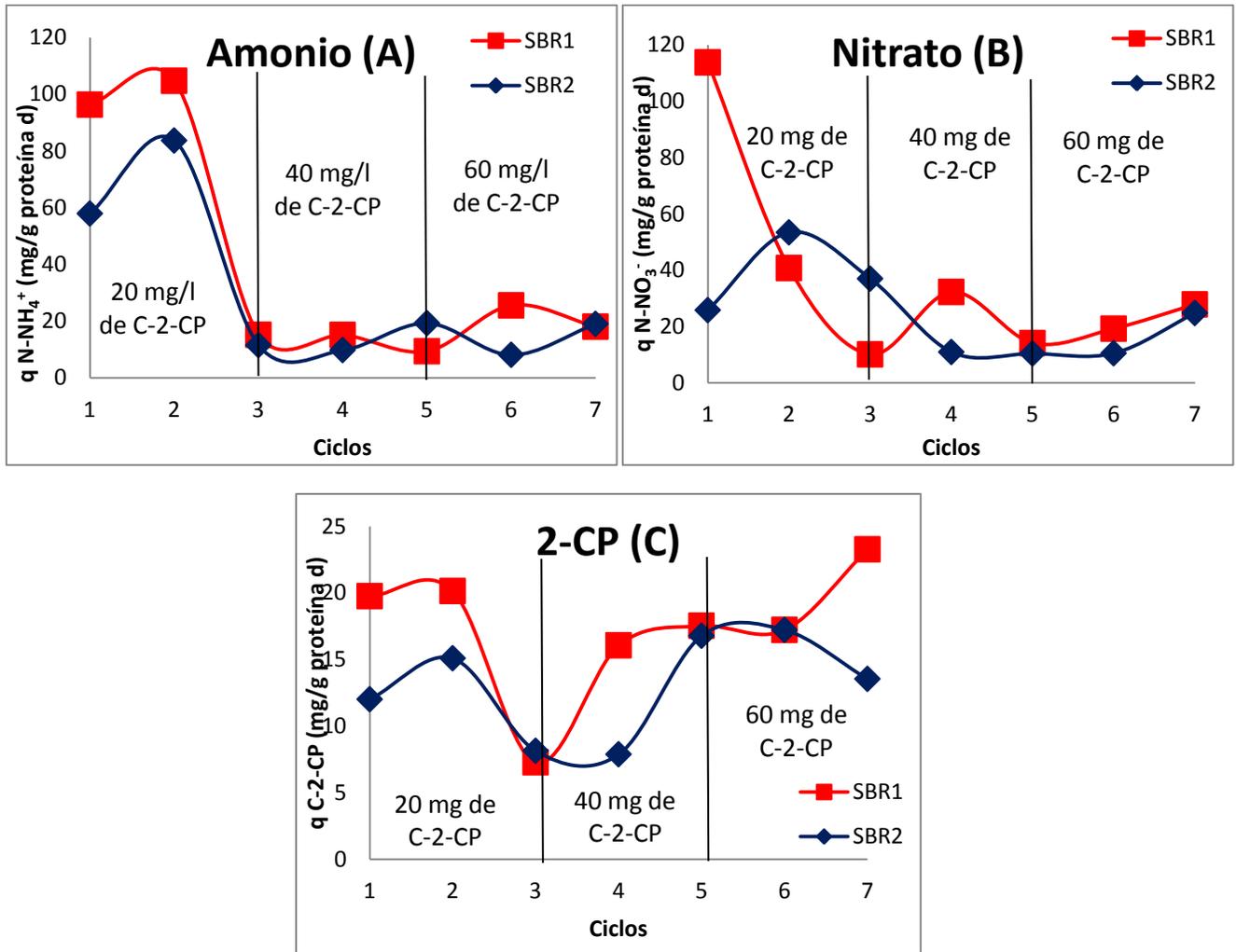


Figura 20. Velocidades específicas de amonio (A), nitrato (B) y 2-CP (C) a lo largo de los ciclos de operación en los reactores SBR1 y SBR2.

El incremento de 2-CP en ambos reactores, dio como resultado un efecto negativo en la actividad metabólica de los lodos nitrificantes, para el SBR1 (expuesto previamente a 2-CP) la amonio oxidación y para el SBR2 (expuesto previamente al *p*-cresol) la nitrito oxidación, sin embargo, independientemente de la previa exposición a compuestos fenólicos la actividad cinética fue similar en ambos lodos, en este caso la disminución de la inhibición se puede atribuir al uso de sistemas SBR, además que al final de los ciclos de operación se obtuvieron comportamientos metabólicos estables.

6.5. Dinámica poblacional de los lodos nitrificantes en presencia de 2-CP

Con el fin de determinar la dinámica poblacional de los consorcios microbianos nitrificantes alimentados con 2-CP, se tomaron muestras de lodos de cada uno de los reactores a lo largo de los ciclos de operación. De cada una de ellas se realizó la extracción de ADN, amplificación de fragmentos del gen 16S ADNr usando cebadores bacterianos universales y posteriormente, se realizó la técnica de Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (DGGE). Con esta técnica es posible detectar las poblaciones bacterianas presentes, puesto que permite diferenciar cambios hasta en un par de bases nucleotídicas en los fragmentos de ADN. Los resultados obtenidos se presentan a continuación.

6.5.1. Extracción y amplificación de ADN de los lodos nitrificantes en presencia de 2-CP

Para la amplificación de los fragmentos de ADN se usó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa. Se utilizaron pcebadores específicos para bacterias amplificando la región V6-V8 de genes bacterianos del DNAr 16S. La amplificación se realizó usando los cebadores 968-f con grapa GC y 1401-r, que han sido usados previamente en estudios de comunidades microbianas (Hirooka y col., 2009; Silva y col., 2014; Pérez-Alfaro y col., 2015).

La extracción de ADN se realizó de una muestra de 0.298 ± 0.023 g tomada al final de cada ciclo de acuerdo a lo mencionado en la sección de materiales y métodos (métodos moleculares). Se obtuvo una concentración de ADN de 24.37 ± 18.5 ng/ μ l. La extracción se evaluó mediante electroforesis (85 V, 50 min) en geles de agarosa al 1.5%. La cuantificación del ADN extraído y la pureza del mismo se determinaron en un espectrofotómetro para micromuestras (NanoDrop 2000, Thermo Scientific) midiendo la absorbancia a 260 nm y la relación entre la absorbancia a 260 y a 280 nm, respectivamente. La relación 260/280 encontrada fue de 1.81 ± 0.03 , indicando que las muestras obtenidas tuvieron una pureza adecuada.

Posteriormente a la extracción de ADN se realizaron dos PCR, obteniendo una concentración de ADN de 518.23 ± 39.26 ng/ μ l. La tabla 11 indica las muestras de lodos que fueron analizadas, así como las condiciones operacionales a la que estuvieron expuestas. Los resultados obtenidos de la electroforesis (85 V, 50 min) en geles de agarosa al 1.5%, se observan en la figura 21. De acuerdo con los cebadores utilizados, la amplificación debería estar por arriba de las 400 pb. Los resultados indican que todas las muestras se amplificaron correctamente y con respecto a un marcador (M), se encontraron en un rango entre 400 y 500 pb.

Tabla 11. Muestras sometidas a extracción, PCR y DGGE.

Muestra	Ciclo	Concentración de 2-CP (mg C/l)
C	Control	----
C1	Ciclo 1	20
C2	Ciclo 2	20
C3	Ciclo 3	40
C4	Ciclo 4	40
C5	Ciclo 5	60
C6	Ciclo 6	60
C7	Ciclo 7	60

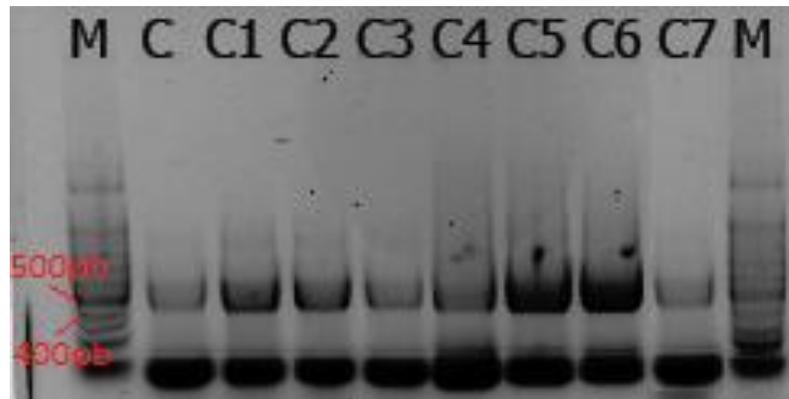


Figura 21. Amplificación de ADN de uno de los lodos nitrificantes por PCR.

6.5.2. Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE)

Los patrones de bandas obtenidas del lodo nitrificante expuesto previamente a 2-CP en el SBR1 a lo largo de los ciclos de operación se muestran en la figura 22. Cabe recordar que, de acuerdo con la técnica de DGGE, cada una de las bandas encontradas en el gel se puede asociar a una especie bacteriana diferente entre sí. Se observan varias especies indicando la diversidad microbiana en el lodo nitrificante. Para el cultivo control, donde el proceso nitrificante se llevó a cabo sin presencia de algún compuesto fenólico y el proceso nitrificante fue completo y estable, se pueden apreciar 7 especies diferentes (1a, 1b, 1c, 1d, 1e, 1f, y 1g). A lo largo de los ciclos de operación se observó una evolución de la población microbiana, algunas especies no se alcanzan a detectar y otras empiezan a ser detectadas con las diferentes condiciones operativas del reactor, esto es, con la adición de 2-CP.

Cuando el proceso se llevó a cabo en presencia de 20 mg/l de C de 2-CP (C1 y C2), se encontró que se mantienen las especies 1a, 1c, 1d, y 1e, mientras que las especies 1b, 1f y 1g desaparecieron. Considerando que en el ciclo 1, tanto la $q_N\text{-NH}_4^+$ como la $q_N\text{-NO}_3^-$ disminuyeron un 90% y un 14%, respectivamente, esta inhibición en el proceso nitrificante podría estar relacionada con la desaparición de estas especies. Se ha propuesto que la diversidad microbiana se puede modificar por exponer un lodo a un compuesto tóxico (Pérez-Alfaro y col., 2015). Sin embargo, cabe recordar que al final del ciclo 2, el proceso nitrificante se llevó a cabo de manera completa, estable y con $EN\text{-NH}_4^+$ cercanas al 100%, de forma que en este punto, la pérdida de las especies 1b, 1f y 1g no fue determinante.

Con el incremento de 2-CP hasta 40 mg C/l en el ciclo 3, en donde el proceso nitrificante se vio más afectado, en la muestra C3 se encontró que las especies 1a, 1c y 1e se mantienen, mientras que la especie 1d desaparece. Rosenkranz y col. (2013), observaron que en un reactor anaerobio de lotes secuenciados (ASBR por sus siglas en inglés), donde se eliminaba fenol, el incremento de este compuesto de 800 a 1200 mg/l causa efectos drásticos en la estructura de las poblaciones

microbianas expuestas. Los resultados del presente trabajo sugieren que independientemente del tipo de reactor y origen del lodo, la adición de compuestos fenólicos afecta la diversidad microbiana. En la muestra C4, donde la concentración de 2-CP se mantuvo en 40 mg C/l se aprecian 11 especies diferentes. En este ciclo el proceso nitrificante se llevó a cabo de manera estable, eficiente y completa (Figuras 12 y 24), de forma que la recuperación y mejora metabólica del lodo nitrificante podría atribuirse a la reaparición de algunas especies o a que el lodo se aclimató al compuesto fenólico. Esta respuesta también puede estar dada por la forma de operación del SBR, puesto que se ha indicado que en este tipo de reactores es posible seleccionar algunos tipos de microorganismos y promover una mejora en su actividad metabólica (Bassin y col., 2012; Fernandes y col., 2013). En la muestra C5 y a pesar del incremento en la concentración de 2-CP, se mantuvieron las mismas especies microbianas. En los últimos dos ciclos de operación (muestra C6 y C7) y con respecto al control, se mantuvieron 5 especies (1a, 1b, 1c, 1d y 1e) y aparecieron otras dos (1h y 1i), que se puede decir, fueron tolerantes a la concentración de 2-CP elevada (60 mg C-2-CP/L). Se ha reportado que al incrementar la concentración de compuestos tóxicos se afecta tanto el proceso respiratorio como la diversidad microbiana, por ejemplo esto ha sucedido en reactores SBR metanogénicos, al aumentar la concentración de 2-CP (Beristain-Montiel y col., 2015), en un proceso nitrificante cuando se incrementa 2-6-diclorofenol (Zhang y col., 2013), o bien al incrementar fenol (Duarte-Pereira y col., 2014). En el presente trabajo, aun con el aumento de 2-CP a lo largo de los ciclos de operación, se obtuvo en el último ciclo, un proceso nitrificante estable metabólicamente y adaptado cinéticamente. Parece ser que la diversidad microbiana presente bajo estas condiciones, junto con la mejora metabólica de las especies participantes, puede estar asociada con este comportamiento. Estos resultados coinciden con los que sugieren que la aclimatación de lodos es una parte crucial para el consumo de compuestos recalcitrantes sin perjudicar el proceso respiratorio deseado (Moreno y Buitrón, 2004; Sahinkaya y Dilek, 2005).

Asimismo, es importante recordar que en todos los ciclos de operación, el 2-CP fue consumido completamente. El consumo del 2-CP podría estar asociado con la presencia de bacterias heterótrofas dentro del consorcio, sin embargo, cabe considerar que también podría estar relacionado con bacterias nitrificantes. Al respecto, se ha reportado que la enzima AMO, presente en microorganismos nitrificantes, tiene la capacidad de oxidar materia orgánica de tipo alifática y aromática (Nevalainen y col., 1993). Recientemente, se ha mostrado que en un consorcio nitrificante sin contacto previo a materia orgánica, la AMO tiene participación en el consumo de 2-CP (Pérez-Alfaro, 2015). Es posible que entre las bandas observadas en este trabajo, se encuentren tanto organismos amonio y nitrito oxidantes, así como bacterias heterótrofas, que estén asociadas respectivamente, tanto con la actividad nitrificante como con el consumo del 2-CP. Es probable que alguna de las especies 1a, 1b, 1c, 1d, o 1e, pueda estar relacionadas con algunas cepas de *Nitrosomonas europaea*, *Nitrosomonas halophila* y *Nitrosomonas oligotropha* o cepas *Nitrospira* o *Nitrobacter*, que son respectivamente, de los microorganismos amonio y nitrito oxidantes, más ampliamente encontrados en consorcios nitrificantes (Silva y col., 2014), y que con su presencia sea posible, llevar a cabo el proceso nitrificante de manera estable. Sin embargo es necesario realizar más estudios que permitan corroborar estos supuestos.

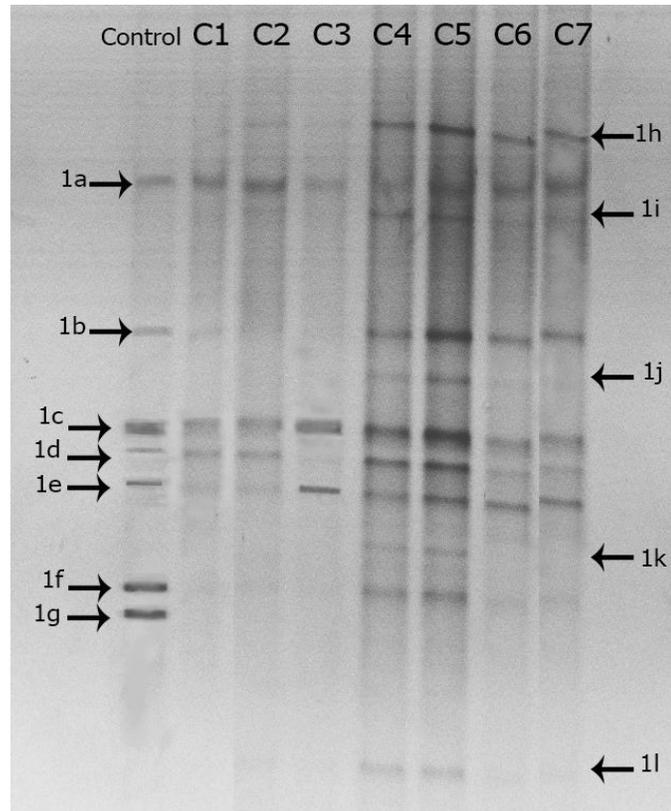


Figura 22. DGGE del lodo expuesto previamente a 2-CP en presencia de 2-CP en los ciclos de operación: Control, 1 (C1), 2 (C2), 3 (C3), 4 (C4), 5 (C5), 6 (C6) y 7 (C7).

En la figura 23 se observan los patrones de bandas encontrados en el lodo nitrificante expuesto previamente a *p*-cresol. El perfil poblacional antes de la adición de 2-CP (muestra control), etapa donde el proceso nitrificante fue estable y completo, presenta 8 especies visibles y diferentes entre sí (2a, 2b, 2c, 2d, 2e, 2f, 2g y 2h). Cuando el lodo del reactor SBR2 se alimentó con 20 mg C-2-CP/l, algunas especies desaparecieron (2c, 2d, 2g, y 2h), cuatro bandas se mantuvieron (2a, 2b, 2e y 2f) y otras cuatro aparecieron (2i, 2j, 2k y 2l). Entonces, la adición de 2-CP a 20 mg C/l modificó la diversidad microbiana en los primeros ciclos. Posteriormente, independientemente del incremento en la concentración de 2-CP, el perfil de especies encontrado prácticamente fue similar entre los carriles, puesto que se mantuvieron las mismas especies. Este comportamiento se mantuvo a lo largo de los ciclos de operación y hasta el final del estudio. Estos resultados coinciden con los

estudios realizados por Silva y col. (2014) en un reactor SBR nitrificante alimentado con diferentes concentraciones de *p*-cresol, donde reportan que la diversidad microbiana no cambió a pesar del incremento en la concentración de *p*-cresol a lo largo de los ciclos, puesto que se presentan las mismas especies al inicio y al final del estudio. Estos autores atribuyeron las diferencias encontradas en las eficiencias de consumo de amonio y sus velocidades específicas de consumo y producción, a factores metabólicos y cinéticos más que a cambios en la diversidad de las poblaciones microbianas observadas. Un comportamiento similar puede estar sucediendo en el presente trabajo y además podría estar asociado con la exposición previa de los lodos al *p*-cresol.

Es importante recordar que en los ciclos 3, 4, 5 y 6 el lodo no fue capaz de llevar a cabo la nitrificación de manera completa, ya que una fracción significativa de nitrito permaneció al final de los cultivos. Estos resultados podrían estar asociados con la pérdida de alguna de las poblaciones bacterianas nitrito oxidantes del consorcio nitrificante, que podrían corresponder a las bandas 2c, 2d, 2g y 2h. Sin embargo, el hecho de que al final de la experimentación en el ciclo 7, el lodo fue capaz de consumir totalmente al 2-CP, oxidar al amonio y oxidarlo a nitrato, aun sin la presencia de estas especies, sugiere que aunque la diversidad poblacional haya sido menor y diferente a la del inicio de la experimentación, las especies que permanecieron al final de la experimentación son bacterias nitrificantes que tuvieron la capacidad metabólica para llevar a cabo la nitrificación y el consumo del compuesto orgánico aun en concentraciones altas de éste. Sin embargo, es necesario continuar haciendo investigación al respecto.

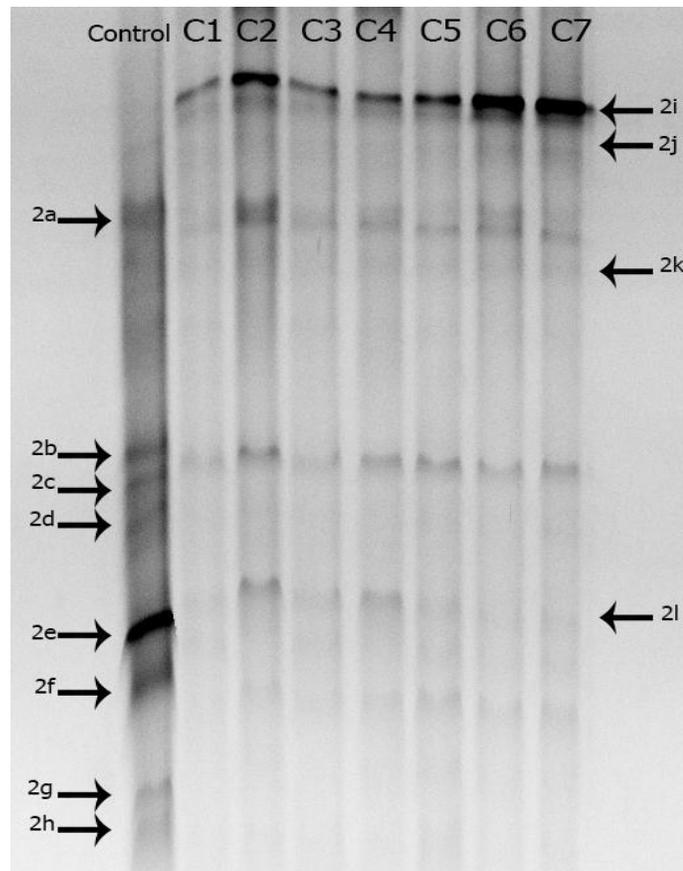


Figura 23. DGGE del lodo expuesto previamente a *p*-cresol en presencia de 2-CP en los ciclos de operación: Control, 1 (C1), 2 (C2), 3 (C3), 4 (C4), 5 (C5), 6 (C6) y 7 (C7).

La adición de diferentes concentraciones de 2-CP a los lodos nitrificantes provocó respuestas diferentes en la dinámica poblacional de cada lodo. En los lodos del SBR1, con exposición previa al 2-CP, el cambio en la dinámica poblacional fue más notorio que en el lodo del SBR2. En el lodo del SBR1 hay una mayor diversidad microbiana, que podría estar asociada con el mejor desempeño del proceso nitrificante encontrado en este reactor. En el SBR2 desaparecieron más especies que en el SBR1, sin embargo, al final del ciclo 7 los lodos de ambos reactores presentaron un proceso nitrificante completo con un consumo total de 2-CP.

La permanencia de las especies 1a, 1b, 1c, 1d y 1e en los lodos del SBR1 (figura 22) y de las especies 2a, 2b, 2e y 2f del lodo del SBR2 (figura 23), a lo largo de los ciclos

de operación y al final de los ensayos en ambos reactores, podría estar relacionada con el comportamiento nitrificante y/o con el consumo de 2-CP encontrado al final de la experimentación. Cabe señalar que se deben realizar más estudios para secuenciar e identificar los microorganismos involucrados en ambos lodos, a fin de determinar su posible participación en los procesos nitrificantes y su relación con el comportamiento metabólico y cinético encontrado con cada consorcio.

7. CONCLUSIONES

La adición de 2-CP provocó efectos metabólicos, cinéticos y en la dinámica poblacional de los lodos nitrificantes dependiendo de su historia previa, como se indica a continuación.

- A nivel metabólico, en el SBR1 inoculado con lodos con exposición previa al 2-CP, se afectó la amonio oxidación, mientras que en el SBR2, inoculado con lodos con contacto previo al *p*-cresol, se afectó la nitrito oxidación. Sin embargo, a lo largo de los ciclos de operación ambos procesos se recuperaron, puesto que al final del ciclo 7 y en presencia de 60 mg/l de C-2-CP, se obtuvieron ENH_4^+ cercanas al 100% y YNO_3^- mayores que 0.94.
- La adición de 20 mg C-2-CP/l a los lodos nitrificantes provocó una inhibición en el proceso respiratorio, independientemente del origen de los mismos. Aunque esta inhibición se siguió presentando por el incremento en la concentración de 2-CP, ésta disminuyó a lo largo de los ciclos de operación. Asimismo, independientemente de su historia previa, los lodos nitrificantes presentaron una tendencia al aumento en las velocidades de consumo de amonio y producción de nitrato a lo largo de los ciclos de operación. Finalmente, el uso de lodos expuestos previamente a compuestos aromáticos permitió disminuir los efectos inhibitorios del 2-CP sobre el proceso nitrificante.
- La adición de 2-CP afectó durante toda la experimentación, la evolución de la dinámica poblacional del lodo inoculado en el SBR1, mientras que en el lodo del SBR2, sólo se presentaron cambios en la estructura poblacional durante los dos primeros ciclos de operación con 20 mg C-2-CP/l. En este reactor, independientemente del incremento en la concentración a 40 y 60 mg C- 2-CP/l, la estructura poblacional se mantuvo estable.
- La nitrificación completa y estable en presencia de diferentes concentraciones de 2-CP de los lodos en el SBR1, podría atribuirse a la aparición de cepas tolerantes al 2-CP, a una mejora metabólica de las cepas participantes y a la diversidad poblacional encontrada. Por otro lado, dado que la diversidad microbiana del lodo

del SBR2 fue constante, los cambios de la nitrificación se podría atribuir a una mejora metabólica y cinética de los microorganismos presentes, más que a los cambios observados en su población microbiana.

- La utilización de sistemas SBR y el uso de lodos con exposición previa al 2-CP, permitieron obtener procesos nitrificantes metabólicamente estables y cinéticamente adaptados, así como una eliminación simultánea de amonio y de hasta 60 mg C-2-CP/l.

8. RECOMENDACIONES

La utilización de lodos expuestos previamente a compuestos fenólicos y el uso de reactores SBR, es recomendable para obtener una mejora en el proceso nitrificante aun en presencia de entre 20 y 60 mg C-2-CP/l.

Las técnicas de biología molecular dieron indicios de la evolución en la dinámica poblacional de los lodos nitrificantes, sin embargo es recomendable realizar la secuenciación de alguna(s) banda(s) de interés, para reconocer el tipo de microorganismo que está presente. Esto permitiría conocer si los microorganismos encontrados tienen participación en la oxidación de amonio hasta nitrato y en dado caso, en el consumo de 2-CP. De igual manera, se podrían realizar otras técnicas de biología molecular como PCR-tiempo real o secuenciación masiva, para el seguimiento de una especie nitrificante específica y evaluar su comportamiento cuando es expuesta a compuestos recalcitrantes.

El efecto inhibitorio que ejerce el 2-CP sobre el proceso respiratorio se vio reflejado sobre las velocidades específicas tanto de consumo como de producción, sin embargo sería de gran interés realizar ensayos para conocer las diferentes constantes cinéticas como k_s , k_m , v_{max} , o bien conocer el tipo de inhibición que ejerce el 2-CP sobre el proceso nitrificante. Además la implementación de un modelo matemático, ayudaría a simular y predecir los posibles efectos del 2-CP sobre el proceso nitrificante y posteriormente, ayudar a tomar decisiones sobre la experimentación.

También sería de gran interés realizar ensayos en las mismas condiciones de este estudio (lodos expuestos previamente y la utilización de reactores SBR), pero ahora incrementando la concentración de amonio y evaluar si se favorece tanto el proceso nitrificante como el consumo de 2-CP.

9. REFERENCIAS

- 1 Aleem M.I.H., Hoch G.E. and 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.
- 2 Aleem M.I.H. and Sewell D.L. (1981). Mechanism of nitrite oxidation and oxidoreductase systems in *Nitrobacter agilis*. *Current Microbiology*. 5: 267-272.
- 3 Alemayehu M., Kumar P. and Kumar A. (2001). Use of sequencing batch reactor for biological denitrification of high nitrate-containing water. *Journal of Environmental Engineering*. 127(3): 273-278.
- 4 Andersson, R.K., Rent, T.A., Lipscomb, J.D., Hooper, A.B. and Münck, E. (1984) "Mössbauer EPR and Optical Studies of the P460 Center of Hydroxylamine Oxidoreductase from *Nitrosomonas*", *Journal of Biological Chemistry*. 259: 6833-6840..
- 5 Anthonisen A. C., Loehr R. C., Prakasom T. B. S. and y Srinath E. G. (1976). Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *Journal of Water Pollution Control Federation*. 48(5): 835-851.
- 6 Armenante P. M., Kafkewitz D., Lewandowski G. A. and Jou C. J. (1999). Anaerobic-aerobic treatment of halogenated phenolic compounds. *Water Research*. 33: 681-692.
- 7 Bassin J., Kleerebensem R., Muyzer G., Soares R., Loosdrecht M. and Dezotti M. (2012). Effect of different salt adaptation strategies on the microbial diversity, activity, and settling of nitrifying sludge in sequencing batch reactors. *Environmental Biotechnology*. 93: 1281-1294.
- 8 Basu S. K., Oleszkiewicz J. A. and Sparling R. (1996). Dehalogenation of 2-Chlorophenol in anaerobic batch cultures. *Elsevier Science*. 30: 315-322.
- 9 Bejarano-Oertiz D., Thalasso F., Cuervo-López F. and Texier A-C. (2012). Inhibitory effect of sulfide on the nitrifying respiratory process. *Chemical Technology and Biotechnology*. 88(7): 1344-1349.
- 10 Beristain-Montiel L., Gómez-Hernández J., Monroy-Hermosillo O., Cuervo-López F. and Ramírez-Vives F. (2010). Methanization and mineralization of 2-chlorophenol by anaerobic digestion. *Water Science and technology*. 62(8): 1791-1798.

- 11 Beristain-Montiel L., Gómez J., Monroy O., Cuervo-López F. and Ramírez-Vives F. (2011). Biodegradation of 2-chlorophenol (2CP) in an anaerobic sequencing batch reactor (ASBR). *Water Science and technology*. 65(10): 1721–1728.
- 12 Beristain-Montiel L., Martínez-Hernández S., Cuervo-López F. and Ramírez-Vives F. (2015). *Environmental Technology*. 36(14): 1776-1784.
- 13 Bernal P., Segura A. and Ramos J. (2007). Compensatory role of the *cis-trans*-isomerase and cardiolipin synthase in the membrane fluidity of *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *Environmental Microbiology*. 9(7): 1658-1664.
- 14 Bernet N. and Spérandio M. (2006). Application of biological treatment systems for nitrogen-rich wastewaters. In *Advanced Biological Treatment Processes for Industrial Wastewaters*, F. Cervantes, S. Pavlostathis, and A. van Haandel (ed.), IWA Publishing, London. 186–208.
- 15 Bernet N. and Spérandio M. (2009). Principles of nitrifying processes. En: *Environmental technologies to treat nitrogen pollution*. 1ra edición. Editorial: IWA Publishing, London. pp. 23-39.
- 16 Bock E., Koops H.P., Harms H. and Ahlers B. (1991). The biochemistry of nitrifying microorganism, in variations in Autotrophic life, Bock E (Ed) (*academic Press London*). 171-200.
- 17 Bock E; Koops HP, Harms H and Ahlers B, (1986) In nitrification. (L.I: Prosser ed.). *Especial publications of the society for general microbiology*. 20: 17-38
- 18 Breemen N.V. (2002). Nitrogen cycle: Natural organic tendency. *Nature*. 415: 381-382
- 19 Buitron G., Gonzalez, A. and Lopen-Marin, L.M. (1998). Biodegradation of phenolic compounds by an acclimated activated sludge and isolated bacteria. *Water Science Technology*. 37:371–378.
- 20 Camargo J.A and Alonso A. (2007). Contaminación por nitrógeno inorgánico en los ecosistemas acuáticos: problemas medio ambientales, criterios de calidad del agua, e implicaciones del cambio climático. *Ecosistemas* 16 (2): 98-110.
- 21 Camargo J.A. and Alonso A. (2006). Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. *Environment international*. 32: 831-849.

- 22 Castingnetti D. and Hollocher T.C. (1985). Heterotrophic nitrification among Denitrifiers. *Applied and Environmental Microbiology*. 6: 229-231.
- 23 Digger G.T., Robbins M.H. and Marshall B.R. (1985). The design of selector to control low F/M filamentous bulking. *Journal. Pollution Control Federation*. 57: 2220-2226.
- 24 Duarte-Pereira A., Dutra C., Dias M., Etchebehere C., Chernicharo C. and Araujo J. (2014). Effect of phenol on the nitrogen removal performance and microbial community structure and composition of an anammox reactor. *Bioresource Technology*. 166: 103-11.
- 25 Ehrich S., Behrens D., Lebedeva E., Ludwig W. and Bock E. (1995). A new obligately chemolithoautotrophic, nitrite-oxidizing bacterium, *Nitrospira moscoviensis* sp nov and its phylogenetic relationship. *Archives of Microbiology*. 164: 16-23.
- 26 EPA (Environmental Protection Agency). (1987). Design manual: phosphorus removal. EPA/625/1-87/001.Cincinnati, OH.U.S.A.
- 27 Farrell A. and Quilty B. (1999). Degradation of mono-chlorophenols by mixed microbial community via a *meta*-cleavage pathway. *Biodegradation*. 10:353-362.
- 28 Felske, A., Rheims, H., Woltering, A., Stackebrandt, E. and Akkermans, A.D.L. (1997). Ribosome analysis reveals prominent activity of an uncultured member of the class Actinobacteria in glasslands soils. *Microbiology*. 143: 2983-2989.
- 29 Feng W., Si-qing., Yi L., Xue-song C. and Zhang J. (2007). Community analysis of ammonia and nitrite oxidizers in start-up of aerobic granular sludge reactor. *Journal of Environmental Sciences* 19(2007) 996–1002.
- 30 Feng W., Yi L., Jinghan W., Yalei Z. and Haizhen Y. (2012). Influence of growth manner on nitrifying bacterial communities and nitrification kinetics in three lab-scale bioreactors. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 39:595–604.
- 31 Fernandes H., Jungles M., Hoffmann H., Antonio R. and Costa R. (2013). Full-scale sequencing batch reactor (SBR) for domestic wastewater: Performance and diversity of microbial communities. *Bioresource Technology*. 132: 262-268.
- 32 Fernández, A., Huang, S., Seston, S., Xing, J., Hickey, R., Criddle, C. and Tiedje, J. (1999). How stable is stable? Function versus community composition. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 3697-3704.

- 33 Fernández-Polanco, F., García, P.A., Rodríguez, P., Bueno, J.M., Real, J.F. and Acitores, M. (1993). "Sistemas combinados aerobios anaerobios: aplicación a aguas urbanas", en *Depuración Anaerobia de Aguas Residuales*, Valladolid, 26-28 de mayo.
- 34 Ferris, M.J., Muyzer, G. and Ward, D.M., (1996). Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. *Applied and Environmental Microbiology*. 62: 340-346.
- 35 García-Saucedo C., Fernández F., Buitrón G., Cuervo-López F and Gómez J. (2008). Effect of loading rate on TOC consumption efficiency in a sulfate reducing process: sulfide effect in batch culture. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 83:1648–1657.
- 36 Gerardi M.H. (2002). *Nitrification and Denitrification in the Activated Sludge Process*. Editorial: Wiley-Interscience, John Wiley & Sons, Inc., New York.
- 37 Gieseke A., Tarre S., Green M., and 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.
- 38 Gijs J. and Robertson L. (1994). Combined nitrification-denitrification processes. *FEMS Microbiology Reviews*. 15(2-3): 109-117.
- 39 Godon J.J., Zumstein E., Dabert P., Habouzit F. and Moletta R. (1997). Microbial 16S rDNA diversity in an anaerobic digester. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 2802-2813.
- 40 Gómez J., Mendez J.R. and Lema J.M. (2000). Kinetic study of addition of volatile organic compounds to a nitrifying sludge. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 88: 1-12.
- 41 Grosskopf, R., Janssen, P.H., Liesack, W. (1998). Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval. *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 960-969.
- 42 Guckert J., Hood M. and White D. (1986). Phospholipid ester-linked fatty acid profile changes during nutrient deprivation of *Vibrio cholerae*: increases in the trans/cis ratio and proportions of cyclopropyl fatty acids. *Applied and Environmental Microbiology*. 52(4): 794-801.
- 43 Harris D.C. (2003). *Análisis Químico Cuantitativo*. 3ra edición. Editorial:Reverté. Apéndice G pp. AP-13.

- 44 Head I.A., Hoirns W.D., Embley T.M., McCarthy A.J. and 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.
- 45 Hernández L. (2005). Estudio del proceso respiratorio y estructura de un lodo desnitrificante en presencia de acetato y tolueno en un SBR. Tesis de maestría UAM-Iztapalapa.
- 46 Hernández L., Buitron G., Gomez J. and Cuervo-Lopez F.M. (2008). Denitrification of toluen and slugde settleability. Proceedings of 4th IWA Specialized Conference on Sequencing Batch Reactor Technology SBR. S. Michele a Ripa, Rome, Italy. 69-72.
- 47 Hirooka K., Asano R. and Nakai Y. (2009). Change in the community structure of ammonia-oxidizing bacteria in activated sludge during selective incubation for MPN determination. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 36:679–685
- 48 Hollocher T.C., Tate M.E. and Nicholas D.J.D. (1981). Oxidation of ammonia by *Nitrosomonas europaea*: definitive ¹⁸O-tracer evidence that hydroxylamine formation involves a monooxygenase. *Journal of Biological chemistry*, 256(21): 10834-10836.
- 49 Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.A., Stanley J.T. and Williams S.T. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9na Edición. Editorial: Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia. pp 447-450.
- 50 Inui T., Tanaka Y., Okayasu Y. and Tanaka H. (2002). Application of toxicity monitor using nitrifying bacteria biosensor to sewerage systems. *Water Science and technology*. 45: 271-278.
- 51 Irvine, R., Wilderer, P. and Flemming, H. (1997). Controlled unsteady state processes and technologies – an overview. *Water Science and technology*. 35(1): pp 1-10.
- 52 Juliette L.Y., Hyman M.R. and Arp D.J. (1993). Inhibition of ammonia oxidation in *Nitrosomonas europaea* by sulfur compounds: thioethers are oxidized to sulfoxides by ammonia monooxygenase. *Applied and Environmental Microbiology*. 59(11): 3718-3727.
- 53 Keener W.K. and Arp D.J. (1993). Kinetic studies of ammonia monooxygenase inhibition in *Nitrosomonas europaea* by hydrocarbons and halogenated hydrocarbons in a optimizer whole-cell assay. *Applied and Environmental Microbiology*. 59(68): 2501-2510.

- 54 Keener W. and Arp D. J. (1994) Transformation of aromatics compounds by *Nitrosomonas europaea*. *Applied and Environmental Microbiology*. 60: 1914-1920.
- 55 Ketchum J. (1997). Design and Physical Features of Sequencing Batch Reactors. *Water Science and technology*. 35(1): 11-18.
- 56 Kostyal E., Nurmiäho-Lassila L. E., Puhakka J. A., Salkinoja-Salonen M. Nitrification, denitrification, and dechlorination in bleached kraft pulp mill wastewater, *Applied Microbiology and Biotechnology*. 47 (1997): 734–741.
- 57 Kowalchuk G.A. and Stephen J.R. (2001). Ammonia-oxidizing bacteria: A model for molecular microbial ecology. *Annual Review of Microbiology*. 55: 485–529
- 58 Laanbroek H.J. and 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.
- 59 Lee D. and Jong M.P.(1999) Neural network modeling for on-line estimation of nutrient dynamics in a sequentially-operated batch reactor. *Journal of Biotechnology*. 75: 29-239.
- 60 Lens, P. and Kuenen, J. (2001). The biological sulfur cycle: novel opportunities for environmental biotechnology. *Water Science and technology*. 44(8): 57-66.
- 61 Lin Y.M., Tay J-H., Liu Y. and Hung Y-T. (2009). Biological nitrification and denitrification processes. En: *Biological treatment processes*, volumen 8. Editorial: Humana Press. pp 539-580.
- 62 Lloyd H. and Ketchum Jr. (1997). Design and physical features of sequencing batch reactors. *Water Science and technology*. 35(1): pp11-18.
- 63 Loehr R.C. and Krishnamoorthy R. (1998). Terrestrial bioaccumulation potential of phenolic compounds. *Hazardous Waste and Hazardous Materials*. 5:2-9.
- 64 Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. 193: 265–275.
- 65 Lydmark P., Almstrand R., Samuelsson K., Mattsson A., Sörensson F., Lindgren P. and Hermansson M. (2007) .Effects of environmental conditions on the nitrifying population dynamics in a pilot wastewater treatment plant . *Environmental Microbiology*. 9(9):2220–2233.

- 66 Madigan M., Martinko J. and Parker J. (2003). Brock Biología de los Microorganismos. 10ma edición. Editorial Pearson Prentice Hall. Madrid. pp 359-360.
- 67 Magdalena A., Dytczaka, Kathleen L., Londryb, Jan A. and Oleszkiewicza, (2008), Activated sludge operational regime has significant impact on the type of nitrifying community and its nitrification rates. *Water Research*. 42: 2320–2328
- 68 Majumder P.S. and Gupta S. K. (2007). Removal of chlorophenols in sequential anaerobic–aerobic reactors, *Bioresource Technology*. 98:118–129.
- 69 Martínez F. (2003). Sedimentabilidad de un lodo nitrificante en dos tipos de reactores y en presencia de material orgánica. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.
- 70 Martínez-Hernández S., Olguín E., Gómez J. and Cuervo-López F. (2009). Acetate Enhances the Specific Consumption Rate of Toluene Under Denitrifying Conditions. *Archives Environmental Contamination and Toxicology*. 57:679–687
- 71 Martínez-Hernández S., Texier A-C., Cuervo-López F. and Gomez J. (2011). 2-Chlorophenol and its effect on the nitrifying sludge. *Journal Hazardous Materials*. 185: 1592–1595.
- 72 Martínez-Jardines M. (2013). Evaluación del efecto del 2-clorofenol en la nitrificación utilizando un reactor de lote secuenciado (SBR). Tesis de especialidad. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.
- 73 McCarty G.W. (1999). Modes of action of nitrification inhibitors. *Biology and Fertility of Soils*. 29(1): 1–9
- 74 McClelland J. W. and Valiela I. (1998). Linking nitrogen in estuarine producers to land-derived sources. *American Society of Limnology and Oceanography*. 43(4):577-585.
- 75 Michael G.R., Shimitzu G.P. and Jenkins, D. (1985) The growth physiology of the filamentous organism type 021 N and its significance activated sludge bulking. *Journal. Water Pollution Control Federation*. 57: 1152-1162
- 76 Monroy O.; Fama G.; Meraz M.; Montoya L. and Macarie H. (2000). Anaerobic digestion for wastewater treatment in México: State of the technology. *Water Research*. 36(4):1803-1816.

- 77 Monroy O.; Galván A., Gómez E. and González A. (2006) Manejo sustentable del agua en el Distrito Federal, México En el SXXI, Editorial UAM-I.
- 78 Moreno G. and Buitron G. (2004). Influence of the origin of the inoculum and the acclimation strategy on the degradation of 4-chlorophenol. *Bioresource Technology*. 94: 215–218.
- 79 Moreno-Andrade I. and Buitrón G. (2004). Evolución de la actividad de los microorganismos en los procesos de aclimatación y des aclimatación al 4-clorofenol. XIV Congreso Nacional de la Federacion Mexicana de Ingenieria Sanitaria y Ciencias Ambientales AC, Mazatlán, Sinaloa.
- 80 Muyzer G., De Waal E.C. and Uitterlinden A.G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 59: 695-700.
- 81 Nevalainen I., Kostyal E., Nurmiaho-Lassila E.L., Puhakka J.A. and Salkinoja-Salonen M.S. (1993). Dechlorination of 2,4,6-Trichlorophenol by a nitrifying biofilm, *Water Research*. 27: 757–767.
- 82 Olmos A., Olguin P., Fajardo C., Razo E. and Monroy O. (2004). Physicochemical characterization of spent caustic from the OXIMER process and sour waters from mexican oil refineries. *Energy and Fuels*. 18: 302-304.
- 83 Peng Y. and Zhu G. (2006). Biological nitrogen removal with nitrification and denitrification via nitrite pathway. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 75: 15-26.
- 84 Pérez-Alfaro. (2007). Evaluación del efecto del fenol en la nitrificación y sedimentabilidad de un lodo utilizando un reactor de lote secuenciado (SBR). Tesis de especialidad. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.
- 85 Pérez-Alfaro. (2010). Efecto del 2-clorofenol sobre la nitrificación. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.
- 86 Pérez-Alfaro J. E., Buitrón G., Gomez J., Texier A-C. and 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(3):990-1000.
- 87 Pérez-Alfaro J. E., González-Blanco G., Sierra-Palacios E., Marcial-Quino J. and Beristain-Cardoso R. (2015). Acclimation of nitrifying biomass and its effect on 2-chlorophenol removal. *Water Science and Technology*. 71.2: 277-282.

- 88 Pérez-Alfaro. (2015). Efecto del 2-clorofenol sobre la nitrificación. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.
- 89 Prosser, J.I. (1989). Autrophic nitrification in bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* 30.pp 125-18.1
- 90 Puhakka JA, Melin ES, Jarvinen KT (1995) Fluidized-bed biofilms for chlorophenol mineralization. *Water Science and technology.* 31:227–235.
- 91 Purkhold U., Pommerening-Röser A., Juretschko S., Schmid M.C., Koops H.P. and 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.
- 92 Robinson, K.G., Saylor G.S. and Janalyn, J.R. (2004). Used of Novel Techniques to Quantify Phenotypes in Biological Treatment Process, IWA Publishing, Orlando, USA 2.11- 2.12.
- 93 Rosenkranz F., Cabrol L., Carballa M., Donoso-Bravo A., Cruz L., Ruiz-Filippi G., Chamy R. and Lema J.M. (2013). Relationship between phenol degradation efficiency and microbial community structure in an anaerobic SBR. *Water Research.* 47: 6739-6749.
- 94 Salas J. (2014). Oxidación de cresoles por un lodo nitrificante en un reactor de lotes secuenciados. Tesis de especialidad. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.
- 95 Sahinkaya E. and Dilek F. (2005). Biodegradation of 4-chlorophenol by acclimated and unacclimated activated sludge-Evaluation of biokinetic coefficients. *Environmental Research.* 99: 243-252.
- 96 Satoh H., Sasaki, Y., Nakamura Y., Okabe S. and Suzuki T. (2005). Use of microelectrodes to investigate the effects of 2-chlorophenol on microbial activities in biofilms. *Wiley Interscience.* 91: 133-137.
- 97 Segura A., Duque E., Rojas A., Godoy P., Delgado A., Hurtado A., Cronan J. and Ramos J. (2004). Fatty acid biosynthesis is involved in solvent tolerance in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *Environmental Microbiology.* 6(4): 416-423
- 98 Schramm A. (2003). In situ analysis of structure and activity of the nitrifying community in biofilms, aggregates, and sediments. *Geomicrobiology Journal.* 20: 313-333.

- 99 Schweighofer P., Nowak O., Svardal K. and 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.
- 100 Sekiguchi Y., Kamagata Y., Syutsubo K., Ohashi A., Harada H. and Nakamura K. (1998). Phylogenetic diversity of mesophilic and thermophilic granular sludges determined by 16S rRNA gene analysis. *Microbiology*. 144: 2655-2665.
- 101 Shammam N.K. (1986). Interactions of temperature, pH and biomass on the nitrification process. *Journal. Water Pollution Control Federation*. 58(1): 52-59.
- 102 Sikkema J., Bont J. and Poolman B. (1995), Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 59(2): 201-222.
- 103 Silva C.D., Gómez J, Beristain-Cardoso R. Cuervo-López F. and Texier A-C. (2009). *p*-cresol biotransformation by a nitrifying consortium. *Chemosphere*. 75: 1387-1391
- 104 Silva C.D., Gómez J. and Beristain-Cardoso R. (2011). Simultaneous removal of 2-chlorophenol, phenol, *p*-cresol and *p*-hydroxybenzaldehyde under nitrifying conditions: Kinetic study. *Bioresource Technology*. 102: 6464–6468.
- 105 Silva C. D., Beristain-Montiel L., Cuervo-López F. and Texier A-C. (2014). *p*-cresol mineralization and bacterial population dynamics in a nitrifying sequential batch reactor. *Journal of Environmental Sciences*. 26: 1885-1893.
- 106 Smith A.J. and Hoare D.S. (1968). Acetate assimilation by *Nitrobacter agilis* in relation to its "Obligate Autotrophy". *Journal of Bacteriology*. 95(3), 844-855.
- 107 Solomons T. W. Graham. (2000). Química orgánica. Ed. Limusa-Wiley, México, pp.1124.
- 108 Stein L.Y., Arp D.J. and 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.
- 109 Steinmüller W. and 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.

- 110 Téllez-Pérez S., Silva D. and Texier A-C. (2013). Simultaneous ammonium and *p*-hydroxybenzaldehyde oxidation in a sequencing batch reactor. *Revista Mexicana de Ingeniería*. 12(1): 97-104
- 111 Teske A., Alm E., Reagan J.M., Toze S., Rittmann B.E. and Stahl D.A. (1994). Evolutionary relationships among ammonia and nitrite oxidizing bacteria. *Journal of Bacteriology*. 176(21): 6623-6630.
- 112 Texier A-C. and Gomez J. (2002) Tolerante of nitrifying sludge to *p*-cresol. *Biotechnology Letters*. 24: 321-324.
- 113 Texier A-C. and Gómez J. (2004). Settleability and kinetics of a nitrifying sludge in a sequencing batch reactor. *Canadian Journal of Microbiology*. 50: 943–949.
- 114 Texier A-C. and Gomez J. (2007). Simultaneous nitrification and *p*-cresol oxidation in anitrifying sequencing batch reactor. *Water research*. 41: 315-322.
- 115 Texier A-C, Zepeda Alejandro, Gómez Jorge and Cuervo-López Flor (2012). Simultaneous Elimination of Carbon and Nitrogen Compounds of Petrochemical Effluents by Nitrification and Denitrification, Petrochemicals, DrVivek Patel (Ed.)
- 116 Torrijos M. and Moletta R.; (1997). Winery Wastewater Depollution by Sequencing Batch Reactor. *Water Science and technology*. 35(1):249-250.
- 117 Vázquez-Padín J., Figueroa A., Mosquera-Corral, Campos J. and R. Menezes. (2009). Population dynamics of nitrite oxidizers in nitrifying granules. *Water Science & Technology*. 60(10): 2529-2536.
- 118 Wang X., Zhang K., Ren N. and Ren L. (2009). Monitoring microbial community structure and succession of an A/O SBR during start-up period using PCR-DGGE. *Journal of Environmental Sciences*. 21: 223-228.
- 119 Watanabe K., Kodama Y., Syutsubo K. and Harayama S. (2000). Molecular characterization of bacterial populations in petroleum-contaminated groundwater discharged from under-ground crude oil storage cavities. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 4803-4809.
- 120 Watson S.W., Bock E., Koops H.P. and Hooper A. (1989). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volumen 3. Editorial: The Williams and Wilkins, Baltimore. pp 1808-1834.

- 121 Weinberger R. (1993). Practical capillary electrophoresis. Academic Press, San Diego CA. pp 6-7.
- 122 Whittaker, M.; Bergmann, D.; Arciero, M. and Hooper, A.B. (2000). Electron transfer during the oxidation of ammonia by the chemolithotrophic bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1459(2-3): 346-355.
- 123 Wiesmann U. (1994). Biological nitrogen removal from wastewater. In: Advances in biochemical engineering/biotechnology, A. Fiechter, (Ed.), 113-154, Springer, Verlag, Berlin
- 124 Winogradsky S. (1890). Recherches sur les organismes de la nitrification. *Annales de l'Institut Pasteur*. 5: 257-275.
- 125 Zepeda A., Ben-Youssef C., Rincon S., Cuervo-López F. and Gómez J. (2012). Complete and simultaneous removal of ammonium and *m*-cresol in a nitrifying sequencing batch reactor. *Biodegradation*. 24(3): 377-385.
- 126 Zepeda A., Texier A-C., Razo-Flores E. and Gómez J. (2003). Benzene Transformation in Nitrifying Batch Cultures. *Biotechnologia Progress*, 19, 789–793
- 127 Zepeda A., Texier A-C., Razo-Flores E. and Gómez J. (2006). Kinetic and metabolic study of benzene, toluene and *m*-xylene in nitrifying batch cultures. *Water Research*. 40: 1643-1649.
- 128 Zhang J., Tian Y., Zuo W., Chen L. and Yin L. (2013). Inhibition of nitrification by the metabolic uncoupler, 2,6-dichlorophenol (2,6-DCP) in a sequencing batch reactor. *Chemical Engineering Journal*. 233:132-137.