



DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**EVIDENCIAS DE LA FLEXIBILIDAD METABÓLICA DE UN CONSORCIO MICROBIANO Y CULTIVOS AXÉNICOS PARA  
DESNITRIFICAR, METANIZAR Y REDUCIR SULFATO**

**Tesis**

Para obtener el grado de

**Maestra en Biotecnología**

Presenta

**I.B.I. Sylvia Karina Téllez Pérez**

**Director de tesis**

Dr. Gregorio Jorge Gómez Hernández

**Asesores de tesis**

Dr. Ricardo Beristain Cardoso  
Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo

**Julio, 2013**

México D.F. a 18 de Julio de 2013

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

**Evidencias de la flexibilidad metabólica de un consorcio microbiano y cultivos axénicos para desnitrificar, metanizar y reducir sulfato**

Que presentó

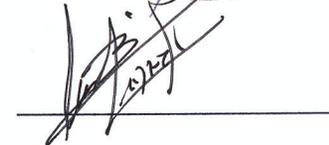
**I.B.I. Sylvia Karina Téllez Pérez**

**Comité Tutorial:**

Director: Dr. Gregorio Jorge Gómez Hernández



Asesor: Dr. Ricardo Beristain Cardoso



Asesor: Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo



**Jurado:**

Presidente: Dra. Florina Ramírez Vives



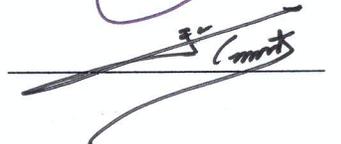
Secretario: Pablo Gustavo Damián Matsumura



Vocal: Sergio Martínez Hernández



Vocal: Francisco Javier Cervantes Carrillo



Este trabajo de tesis se llevó a cabo en el Laboratorio de Fisiología Microbiana (W004) del Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. Con el apoyo otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de posgrados de Calidad (PNPC) del CONCYT, con la referencia 001465

## **Dedicatorias**

*A mis padres, Silvia y Narciso*

Donde origina la inspiración de mi formación que con su amor y apoyo incondicional han guiado mi camino hacia el éxito.

*A mi hermano, Ricardo*

Por ventura, tu cariño ha sido el motivo de mi fortaleza en esta preparación.

*Al amor de mi vida, Armando*

Por tus cielos claros que han iluminado cada uno de mis pasos, por tu amor y complicidad.

## Agradecimientos

Esto ha sido el término de otra etapa, de las infinitas que hay en el camino de la investigación. Y es sólo una parte del aprendizaje que no termina.

Y sin duda esto un hubiera sido posible sin el apoyo y compañía de muchas personas.

Agradezco muy sinceramente al Dr. Jorge Gómez, quien ha participado en mi formación desde mi licenciatura y que ahora me honra con la dirección de mi tesis de maestría. Gracias por compartirme su conocimiento y su experiencia, por guiarme en esta etapa de mi formación académica y por contagiarme su pasión por la ciencia. Pero sobre todo gracias por creer en mí.

Al Dr. Ricardo Beristain, gracias por tus críticas y asesorías durante mi formación académica. Por tu colaboración y disposición durante todo mi trabajo experimental y análisis de resultados. Gracias por compartirme tu experiencia profesional y por todos tus consejos.

A la Dra. Anne-Claire Texier, quien me abrió las puertas de este laboratorio dándome la oportunidad de colaborar y así generar logros y éxitos.

Al Dr. Sergio Huerta, Dra. Florina, Dr. Sepúlveda, quienes en su momento me brindaron su apoyo y espacio para continuar con mi trabajo.

Finalmente agradezco a mis compañeros y amigos del laboratorio W004. A Gehovana gracias por tu amistad y tus consejos, Alejandro mi mejor amigo, Jacqueline, Emmanuel, Miguel, Sergio, Antonio, Diego, Emir, Dr. Felipe, Dra. Flor, gracias por sus críticas y consejos. Gracias a ustedes mi trabajo siempre fue más ameno, con sus risas, consejos, y charlas.

Sin duda agradezco infinitamente a la UAM por brindarme la oportunidad de pertenecer a esta casa de estudios. Y permitirme desarrollar en todos los ámbitos. Hoy por hoy Orgullosamente UAM.

*Cuando una persona desea realmente algo,  
el Universo entero conspira para que pueda realizar su sueño.*

*Paulo Coelho.*

Índice de contenido	Pág.
Resumen.....	1
Abstract.....	2
1. Introducción.....	3
1.1 Panorama actual.....	3
1.2 Flexibilidad metabólica.....	4
1.3 Desnitrificación.....	6
1.3.1 Factores que influyen en la desnitrificación.....	7
1.4 Metanogénesis.....	8
1.4.1 Factores que influyen en la metanogénesis.....	9
1.5 Sulfato reducción.....	10
1.5.1 Factores que influyen en la sulfato reducción.....	11
2 Justificación.....	12
3 Hipótesis.....	13
4 Objetivos.....	14
4.1 Objetivo general.....	14
4.2 Objetivos específicos.....	14
5 Material y métodos.....	15
5.1 Reactor continuo de tanque agitado (RCTA) en condiciones desnitrificantes: fuente de inóculo.....	15
5.2 Cultivos axénicos.....	16
5.3 Cultivos en lote.....	16
6 Métodos analíticos.....	18
6.1 Cuantificación de compuestos nitrogenados y azufrados.....	19
6.2 Cuantificación de sulfuro.....	19
6.2.1 Valoración de soluciones.....	20
6.2.1.1 Solución de tiosulfato de sodio 0.025 N .....	20
6.2.1.2 Solución de Yodo.....	20
6.2.1.3 Indicador de almidón.....	20
6.3 Cuantificación de nitrógeno molecular, metano y dióxido de carbono.....	21
6.4 Cuantificación de acetato.....	21

6.5	Cuantificación de sólidos suspendidos volátiles (SSV).....	21
7	Resultados y discusión.....	23
7.1	Reactor continuo de tanque agitado (RCTA) en condiciones desnitrificantes: fuente de inóculo.....	23
7.2	Cultivos axénicos.....	24
7.3	Cultivos en lote.....	25
7.3.1	Cultivo en lote bajo condiciones desnitrificantes.....	25
7.3.2	Cultivo en lote bajo condiciones metanogénicas.....	27
7.3.3	Cultivo en lote bajo condiciones sulfato reductoras.....	29
8	Conclusiones.....	30
9	Referencias.....	31

## Resumen

Existe la idea de que los microorganismos son fisiológicamente monofuncionales. Se asume que los consorcios operan bajo el mismo criterio, de ser monofuncionales, razón por la cual el arranque de los reactores para tratamiento de las aguas residuales toma mucho tiempo, hasta que se haya aclimatado la microflora responsable del proceso de interés. Desde hace décadas se tienen datos de que las condiciones ambientales son de mayor importancia para el control de los procesos microbiológicos que la presencia de las cepas conocidas como específicas. Este trabajo tiene como propósito presentar evidencias que muestran que el metabolismo de cepas aisladas puede cambiar de acuerdo con la composición del medio de cultivo como variable independiente. Esto es, obtener evidencias de la flexibilidad metabólica de los microorganismos, tanto de consorcios (lodos para el tratamiento de aguas residuales) como de cultivos axénicos.

Se puso en régimen estacionario un reactor continuo de tanque agitado (RCTA) bajo condiciones desnitrificantes inoculado con lodo metanogénico de una planta industrial. El lodo producido se utilizó para realizar aislamientos de algunas cepas, con base en la morfología celular y de Gram. Fueron propagadas en un medio de cultivo con características cualitativamente similares al medio desnitrificante en el RCTA, pero cuantitativamente diferentes, con una relación C/N de 7. Al lodo desnitrificante producido en el RCTA se le inoculó en medios de cultivo desnitrificante, metanogénico, y sulfato reductor y se realizaron cinéticas de los cultivos de cada proceso respiratorio. A tres de las cepas aisladas (denominadas J, P, R) se le hicieron los mismos estudios en lote, esto es, a cada cepa se le cultivó en los tres medios antes mencionados. Los cultivos fueron evaluados en términos de eficiencia de consumo [ $E\%$ ,  $(\text{mg de sustrato consumido } (\text{NO}_3^- \text{ o } \text{SO}_4^{2-} \text{ o } \text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2^-) / \text{mg sustrato alimentado}) * 100$ ], rendimientos de producción [ $Y_p$ ,  $\text{mg de producto } (\text{N}_2, \text{HS}^- \text{ o } \text{CH}_4) / \text{mg sustrato consumido}$ ] y velocidades específicas de producción [ $q$ ,  $(\text{mg de producto} / \text{g SSV d})$ ].

Los resultados mostraron que el lodo fue metabólicamente capaz de realizar los tres procesos respiratorios con rendimientos en la producción de  $\text{N}_2$ ,  $\text{CH}_4$  y  $\text{SH}^-$  de  $0.9 \pm 0.1$ ,  $0.1 \pm 0.01$ ,  $0.4 \pm 0.1$  respectivamente. En los cultivos axénicos se observó la capacidad de desnitrificar y sulfato reducir con rendimientos cercanos a  $0.1 \text{ mg N}_2 / \text{mg NO}_3^-$  y  $0.4\text{-}1.0 \text{ mg SH}^- / \text{mg SO}_4^{2-}$ , sin embargo bajo las condiciones de ensayo o se detectó capacidad metabólica para metanizar. Los resultados del trabajo mostraron que ni las cepas aisladas, ni el consorcio microbiano fueron monofuncionales y que el metabolismo observado fue consecuencia de las condiciones de cultivo. La investigación realizada evidenció que la flexibilidad metabólica está presente en muchos microorganismos.

## Abstract

It is believed that microorganisms are monofunctionals, physiologically speaking. It is assumed that the consortia operate with the same criteria, and this may be the reason which the wastewater treatment takes long time to start-up. Namely, when the microbial sludge is acclimated. Nevertheless, from several decades ago is known that the environmental conditions are the more important aspects to control the microbial process, rather than the presence of strains known as specific microorganisms. The main purpose of this paper is to provide evidences that the metabolism of strains isolated from microbial sludge is able to change according to the culture medium composition, as independent variable. In other words, to obtain new experimental evidences about the metabolic flexibility of the microorganisms, as in consortia (sludge used in wastewater treatment) as with axenic culture.

A continuous stirred tank reactor (CSTR) was operated at steady state under denitrifying conditions, which was inoculated with a methanogenic microbial sludge taken from an industrial wastewater plant. The microbial sludge produced was used in order to isolate some strains, based on cellular morphology and Gram stain as criteria. These were propagated in a culture medium with characteristics qualitatively similar to the denitrifying culture medium in the CSTR, but quantitatively different, with a C/N ratio of 7. The microbial sludge previously stabilized was inoculated in a denitrifying, methanogenic and sulfate reducing culture medium. Batch cultures were evaluated in terms of consumption efficiency [E%, (mg of substrate consumed ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  or  $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2^-$ )/mg substrate fed)\*100)], production yield [Y<sub>p</sub>, mg of product ( $\text{N}_2$ ,  $\text{HS}^-$  or  $\text{CH}_4$ ) /mg substrate consumed] and specific production rates [q, (mg of product/mg VSS d)]

Experimental results showed that the microbial sludge had the metabolically capability to carry out the three respiratory processes, with production yields of  $\text{N}_2$ ,  $\text{CH}_4$  and  $\text{SH}^-$  of  $0.9 \pm 0.1$ ,  $0.1 \pm 0.01$ , and  $0.4 \pm 0.1$ , respectively. Moreover, all axenic cultures only showed denitrifying and sulfate reducing capability, with yields of  $0.1 \text{ mg N}_2/\text{mg NO}_3^-$  y  $0.4\text{-}1.0 \text{ mg SH}^-/\text{mg SO}_4^{2-}$ . The isolated strains were not able to carry out the methanogenesis under the environmental conditions tested. The results this work shown that, nor the axenic culture, neither the microbial consortium were monofunctionals. Likewise, the changes in the metabolic profiles were relate to the existing environmental conditions. This research provides evidences about metabolic flexibility of a microbial sludge and an axenic culture as a result of the culture conditions established.

## 1. Introducción

### 1.1 Panorama actual

Actualmente la contaminación del agua representa una problemática al ambiente que ha sido proporcional al incremento en la población, así como a las actividades antropogénicas de tipo agrícola, pesquera, comercio e industrial (Vitousek, 1997). Comúnmente el origen de la contaminación del agua se atribuye a la descarga de aguas residuales (efluentes industriales) directamente a mantos acuíferos y aguas superficiales (Semarnat, 2009), causando cambios ecológicos y ambientales. El resultado ha sido los daños a la flora y fauna de lagos, ríos y mares, además de causar cambios en los ciclos biogeoquímicos (Chapin y col., 2000).

Los compuestos que habitualmente se han considerado contaminantes del agua, son los compuestos carbonados (materia orgánica), nitrogenados ( $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ) y azufrados ( $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{SO}_3^{2-}$ ,  $\text{SO}_2$ ), como lo señalan Camargo y Alonso (2007). Este tipo de compuestos tienen un efecto negativo sobre los ecosistemas acuáticos. Se ha visto que la acumulación de compuestos nitrogenados es la causa de problemas de toxicidad en los organismos acuáticos, eutrofización de lagos, proliferación de algas tóxicas (dinoflagelados, algas verde azules, diatomeas, etc.), así como también podrían ser la causa de inducción de efectos perjudiciales en la salud humana (Cervantes y col., 2000; Camargo y Alonso, 2007; Montes y col., 2000).

La composición orgánica de las aguas residuales está conformada aproximadamente por proteínas, carbohidratos, grasas y aceites, surfactantes, contaminantes emergentes, y compuestos orgánicos como los fenólicos, bencénicos, plaguicidas, hidrocarburos, entre otros (Ellis, 2004). Cuando en mantos acuáticos se descargan aguas residuales con materia orgánica disuelta, se propicia un ambiente para el crecimiento indeseable de microorganismos (Shon y col., 2006). Por su parte, compuestos azufrados como el dióxido de azufre ( $\text{SO}_2$ ) emitidos a la atmósfera pueden reaccionar con otras moléculas, llegando a formar ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), la deposición de éste sobre las aguas superficiales disminuye el valor del pH, por lo cual se ha reconocido como uno de los contaminantes que participan en el proceso de acidificación de lagos y ríos (Shindler, 1988; Baker y col., 1991). Actualmente se utilizan procesos biológicos como alternativas de descontaminación de las aguas residuales con la finalidad de generar compuestos inocuos al ambiente, a través de los ciclos biogeoquímicos, donde los microorganismos realizan una función importante en la reutilización de los elementos, como el carbono, nitrógeno y azufre (Madigan y col., 2005) a través de la metanogénesis, desnitrificación y sulfato reducción, por mencionar algunos.

Algunos autores sugieren la participación de algunos microorganismos específicos para llevar a cabo cada uno de estos procesos respiratorios. Sin embargo, los procesos respiratorios se han evaluado a partir de consorcios microbianos, en los cuales se presentan distintas comunidades microbianas. Se ha mostrado la capacidad de los consorcios para la eliminación de más de un compuesto contaminante, e incluso llevar a cabo más de un proceso respiratorio (Reyes y col., 2004; Martínez, 2004). Cabe mencionar que hacen falta evidencias cuantitativas que muestren la capacidad metabólica que pueden expresar estas comunidades microbianas a partir de un lodo microbiano, y llevar a cabo más de un proceso respiratorio, y de esta manera poner en evidencia la flexibilidad metabólica intrínseca o extrínseca que éstas presenten.

## 1.2 Flexibilidad metabólica

El concepto de flexibilidad metabólica ha surgido a partir de la posibilidad de poder atribuir mayor capacidad metabólica a los microorganismos que usualmente han sido estereotipados de llevar a cabo una sola función metabólica en específico, es decir, a la asociación de un sólo proceso metabólico en un género microbiano en particular. Tal es el caso de las bacterias metanogénicas, a las cuales se les ha atribuido la única función de producir metano y no otro producto final. Desde el punto de vista ecológico, es difícil pensar que dichas bacterias no tuvieran alguna otra alternativa metabólica, ya que sin éstas los microorganismos metanogénicos tendrían serias limitaciones de adaptación a las variaciones ambientales en las que se pudieran encontrar. Un ejemplo de flexibilidad metabólica es el que se puede observar con las levaduras, en las cuales se ha mostrado su capacidad metabólica, en respuesta a condiciones anaeróbicas o aeróbicas, teniendo como productos principales etanol y  $\text{CO}_2$  ó altos niveles de ATP y producción de biomasa respectivamente. Otro claro ejemplo es el de las bacterias ácido lácticas las cuales, en distintas condiciones de cultivo pueden formar lactato, acetato, etanol, entre otros productos de fermentación. Ambos ejemplos son muy conocidos desde hace décadas y la literatura está llena de información sobre el tema. Finalmente también podemos citar el ejemplo de algunas arqueas metanógenas, como *M. Barkeri*, la cual ha mostrado la capacidad metabólica de metanizar y reducir óxido de hierro de manera simultánea (Bond y Lovley, 2002). Es difícil pensar que sólo estos microorganismos tengan esa capacidad metabólica extendida. Vollbrecht y Schlegel (1978) sugirieron que los productos finales estarán en función de las condiciones de cultivo. En todos los casos, los productos finales dependerán de las condiciones de cultivo, como concentración de oxígeno, pH,

composición química del medio de cultivo, entre otros. Podrían citarse varios casos más, pero estos pueden ser ejemplos de flexibilidad metabólica, de una alternativa metabólica de adaptación, a través de rutas metabólicas alternas. Asimismo, la flexibilidad metabólica podría estar asociada a la posibilidad de que cultivos axénicos produzcan energía por distintas rutas metabólicas, utilizando distintos sustratos, o un mismo sustrato por distintas vías metabólicas.

Por otra parte, se ha dicho que la eliminación de contaminantes se realiza por los microorganismos, a través de las cadenas tróficas. Existen algunas evidencias que esto parece posible, o por lo menos así se piensa. Reyes-Ávila y col. (2004), Beristain-Cardoso y col. (2011) y Téllez-Pérez y col. (2013) han publicado sobre la eliminación simultánea de varios contaminantes. La explicación de estos fenómenos, desde el punto de vista microbiológico (cadena trófica), no es suficiente. Algunos autores sugieren que las capacidades metabólicas de un proceso fisiológico pueden dirigirse en función de las condiciones iniciales de cultivo. No obstante, Robertson y Kuenen (1990) asumen que estas propiedades pudieran incluso ser inherentes a los microorganismos.

En la Tabla 1 se resumen algunas evidencias de flexibilidad metabólica en consorcios microbianos y cultivos axénicos.

Tabla. 1 Flexibilidad metabólica en consorcios microbianos y cultivos axénicos

Cultivo	Flexibilidad metabólica	Procesos	Referencia
Consorcio microbiano	Eliminación simultánea de sulfuro, <i>p</i> -cresol y amonio	Nitrificación Desnitrificación	De la Torre-Velasco y col. (2013)
Consorcio microbiano	Eliminación simultánea de amonio y <i>p</i> -hidroxibenzaldehído	Nitrificación	Téllez-Pérez y col. (2013)
Consorcio microbiano	Eliminación simultánea de nitrógeno, carbono y azufre	Desnitrificación	Reyes y col. (2004)
Consorcio microbiano	Eliminación de acetato y nitrato	Desnitrificación Metanogénesis	Martínez (2004)
Consorcio microbiano		Desnitrificación Metanogénesis Sulfato reducción	Takii y Fukui (1991)
Cultivos axénicos: Cepas bacilares	Desnitrificación y nitrificación secuencial en condiciones aeróbicas	Desnitrificación Nitrificación	Kim y col. (2005)
Cultivos axénicos <i>Sulfurspirillum</i>	Desnitrificación y nitrificación con distintos donadores de electrones	Desnitrificación Sulfato reducción	Hubert y Voordouw (2007)
Cultivo axénico <i>Diaphorobacter sp.</i>	Simultánea Nitrificación y desnitrificación aeróbica	Nitrificación Desnitrificación	Anshuman y col. (2007)

Cultivos axénicos <i>N. europea</i>	Producción de nitrógeno molecular desde amonio	Nitrificación Desnitrificación	Shrestha y col. (2002)
<i>M. Barkeri</i>	Reducción de Fe (III) en presencia y ausencia de quinonas extracelulares	Metanogénesis	Bond y Lovley (2002)

### 1.3 Desnitrificación

La desnitrificación se ha descrito como un proceso respiratorio anóxico donde el nitrato es reducido a nitrógeno molecular utilizando una fuente reductora, que puede ser del tipo orgánico o inorgánico. *Alcaligenes*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Thiobacillus* y *Thiosphaera* son algunos microorganismos con los cuales se han realizado muchos estudios sobre la desnitrificación (Cervantes y col., 2000). La desnitrificación sigue una ruta metabólica que consiste en una serie de etapas en la cual se involucran la actividad de ciertas enzimas (Figura 1). La ruta de reducción del nitrato comienza a partir de la reducción de  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NO}_2^-$ , en la cual interviene la actividad de la enzima nitrato reductasa. En una segunda etapa se realiza la reducción de  $\text{NO}_2^-$  a  $\text{NO}$  por la acción de la nitrito reductasa, que es reducido a  $\text{N}_2\text{O}$  por la óxido nítrico reductasa, finalmente en una última etapa la reducción de  $\text{N}_2\text{O}$  a  $\text{N}_2$  es catalizada por la óxido nitroso reductasa (Cervantes y col., 2000).

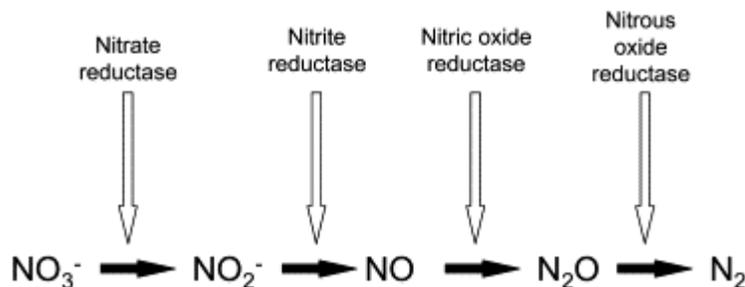


Figura. 1 Rutas metabólicas del proceso desnitrificante (Wrage y col., 2001)

La desnitrificación heterotrófica es el proceso reductor de nitrato en presencia de un donador de electrones orgánico, de los cuales se han utilizado metanol, acetato, lactato y compuestos aromáticos (Cuervo-López y col., 1999; Third y col., 2003). El acetato ha sido comúnmente utilizado para llevar a cabo la reducción de nitrato de manera satisfactoria (Reyes-Ávila y col., 2004). La reducción del nitrato acoplada a la oxidación de acetato presenta

un cambio en la energía libre estándar de  $-1054.8$  kJ/reacción (Beristain-Cardoso y col., 2008), valor con el cual se observa una reacción espontánea y termodinámicamente favorable (Reacción 1).



La desnitrificación mediante un consorcio microbiano ha mostrado ser un proceso factible e incluso metabólicamente flexible para la eliminación simultánea de distintos compuestos orgánicos e inorgánicos, como sulfuro y/o fenol (Sierra-Álvarez y col., 2007; Beristain-Cardoso y col., 2009).

### 1.3.1 Factores que influyen en la desnitrificación

Algunos autores sugieren que el proceso desnitrificante puede verse afectado o favorecido en función de las condiciones de cultivo a las que el consorcio o el cultivo axénico se encuentre expuesto. Tal es el caso de la presencia de oxígeno, el cual se ha reportado como uno de los principales factores que regulan la reducción de nitrato a nitrógeno molecular a nivel enzimático (Knowles, 1982). Temperatura y pH han sido de los factores que se ha observado pueden influir durante un proceso desnitrificante. Bremmer y Shaw (1958) observaron que por debajo de un pH de 4.8 el proceso desnitrificante disminuye su velocidad. Sin embargo cuando el valor de pH se incrementa en un valor entre 8.0 y 8.6, la velocidad desnitrificante se incrementa. Asimismo, mostraron que se observa el incremento de la velocidad desnitrificante con una temperatura cercana a los 25 °C.

En el proceso de desnitrificación heterotrófica algunos autores sugieren que el proceso se lleva adecuadamente a valores de relación carbono/nitrógeno (C/N) cercanos a su valor estequiométrico. De esta manera, el metabolismo puede ser controlado de manera satisfactoria (Beristain-Cardoso y col., 2009). Se ha reportado que a valores altos en la relación C/N, el proceso desnitrificante se ve favorecido alcanzando eficiencias de consumo de nitrato del 100% y rendimientos de producción de nitrógeno molecular cercanos a 1 (Cuervo-López y col., 1999). Otros factores que deben ser considerados durante el proceso, son la composición del medio de cultivo, incluyendo los cofactores enzimáticos necesarios para el proceso. Se ha visto que la presencia de  $\text{Cu}^{2+}$  y sales de molibdeno son necesarios en el proceso desnitrificante (Richardson y col., 2009).

## 1.4 Metanogénesis

El proceso de la metanogénesis es conocido como un proceso respiratorio donde compuestos orgánicos son utilizados para la producción de metano. El metano es producido por las arqueas, que incluyen a las clases Methanobacteriales, Methanopyrales, Methanococcales, Methanomicrobiales y Methanosarcinales (Garrity, 2001). La metanogénesis se puede producir en distintas condiciones de cultivo. Las clases microbianas mencionadas, bajo condiciones de anaerobiosis, se ha visto que son capaces de producir metano a partir de diferentes sustratos como acetato, metanol, metilamina, entre otros (Castillo y col., 2005).

El metano se puede producir a partir de 3 rutas metabólicas, en función del tipo de fuente de carbono utilizada como sustrato (Figura 2). La ruta hidrogenotrófica donde se involucra la reducción de  $\text{CO}_2$  con  $\text{H}_2$  como fuente reductora. La ruta acetoclástica donde el acetato es oxidado a metano y  $\text{CO}_2$  (Meurer y col., 2002). Finalmente en la ruta metalotrófica compuestos metilados pueden llevar a cabo la función de donadores de electrones, así como ser la fuente metilada para la reducción a metano, o bien los compuestos metilados se pueden reducir a partir del acoplamiento con  $\text{H}_2$  (Galagan y col., 2002).

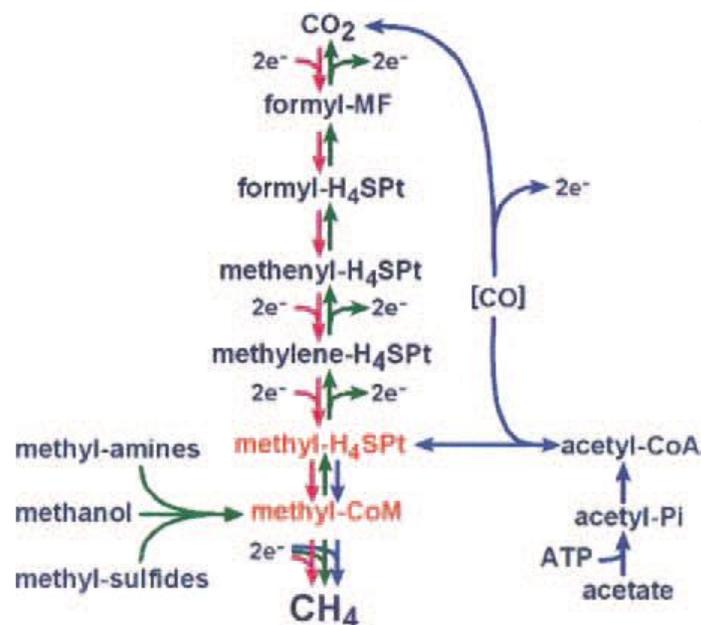


Figura. 2 Rutas metabólicas en la metanogénesis: Hidrogenotrófica (flechas rojas), metalotrófica (flechas verdes) y acetoclástica (flechas azules) (Galagan y col., 2002)

Se ha descrito, de manera general, que la metanogénesis *per se* suele ser un proceso termodinámicamente poco espontáneo, con valores de energía libre de Gibbs estándar de  $-31.0$  kJ/reacción, partiendo de sustrato como acetato (Thauer y col., 1977).

#### 1.4.1 Factores que influyen en la metanogénesis

Para que el proceso de producción de metano se lleve a cabo de manera satisfactoria se ha mencionado la influencia que puede tener la presencia de cofactores enzimáticos, así como las condiciones de cultivo. Kida y col. (2001) observaron que la adición de  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Co}^{2+}$  favorecen la producción de metano y sugieren, por lo tanto, la adición de ellos para que se lleven a cabo las reacciones de producción de metano.

Dentro del proceso metanogénico se han mencionado posibles inhibidores. Witthmann y col. (1995) han sugerido que algunos procesos de inhibición por amonio pueden darse por un cambio en el pH intracelular, inhibiendo reacciones enzimáticas específicas. Sin embargo, concentraciones por debajo de los 200 mg/L de amonio se considera benéfico para los microorganismos anaerobios como parte esencial nutricional (Liu y Sung, 2002). Por otra parte, Kroeker y col. (1979) reportaron que la presencia de amonio a concentración entre 1.7 y 14 g/L causan alrededor del 50% de reducción de la producción de metano. No obstante, el amonio debe ser considerado como un compuesto necesario en la formulación del medio de cultivo, dado los efectos positivos y negativos que puedan causar al proceso metanogénico, en particular sobre el crecimiento microbiano, aunque sea escaso.

Dentro de los procesos anaerobios pueden encontrarse ciertas similitudes dentro de ellos. Tal es el caso de la sulfato reducción (SR) y la metanogénesis, en los cuales se utilizan sustratos orgánicos comunes, como acetato. En el caso de la metanogénesis los sustratos anteriores se utilizan para la formación de metano, mientras que para el proceso SR suelen utilizarse en el proceso de reducción de sulfato preferentemente acoplado a la oxidación del lactato. Por lo tanto, el proceso competitivo podría darse por el sustrato orgánico en común, entre la metanogénesis y la SR. No obstante, ambos procesos tiene diferencias fisicoquímicas que sugieren que podría no haber competencia entre esos procesos.

## 1.5 Sulfato reducción

La sulfato reducción es un proceso biológico donde el sulfato es reducido a sulfuro, el cual está asociado a la oxidación de un agente reductor orgánico. El lactato, pero no sólo éste, ha mostrado ser un apropiado reductor (Celis-García, 2004). El acetato también ha sido utilizado satisfactoriamente para la SR (Muthumbi y col., 2001). La SR se ha denominado de varias formas en función del tipo de donador de electrones. Algunas bacterias sulfato reductoras (BSR) suelen reducir al sulfato utilizando un donador de electrones inorgánico como el  $H_2$ , consumiendo de manera simultánea al  $CO_2$  como fuente de carbono. El proceso se conoce como SR litotrófica. Por el contrario, se ha denominado SR organotrófica cuando el donador de electrones es un compuesto orgánico (Voordouw, 1995). Hay algunas bacterias que han sido caracterizadas como productoras de sulfuro a partir de sulfato. Entre estas se pueden mencionar a los géneros *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*, *Desulfobacter*, *Desulfobulbus*, *Desulfococcus*, *Desulfonema*, *Deesulfasarcina*. (Widdel and Pfennig, 1981). Se ha encontrado que comúnmente las bacterias sulfato reductoras (BSR) presentan características del tipo Gram-negativas, como las bacterias desnitrificantes (Hao y col., 1996).

La ruta metabólica de la SR (Figura 3) parte de la activación de sulfato con ATP por acción de la ATP sulfurilasa que posteriormente es reducido a sulfito por la participación de la enzima APS sulfotransferasa. El sulfito finalmente es reducido hasta sulfuro, reacción catalizada por la sulfito reductasa (Grein y col, 2013).

La SR, así como la desnitrificación, opera de manera adecuada cuando la relación C/S es cercano al valor estequiométrico. Se tienen evidencias que bajo estas condiciones se han obtenido altas eficiencias de eliminación de sulfato (Harada y col., 1994; Annachatre y Suktrakoolvait, 2001). Asimismo, la reacción de reducción de sulfato a sulfuro, al igual que en el proceso metanogénico a partir de acetato es un proceso termodinámicamente desfavorable ( $\Delta G^{0'} = -31$  kJ/reacción), con una valor bajo de energía libre de Gibbs estándar de  $-47.6$  y  $-127.6$  kJ/reacción a partir de la oxidación de acetato y lactato, respectivamente (García-Saucedo, 2008).

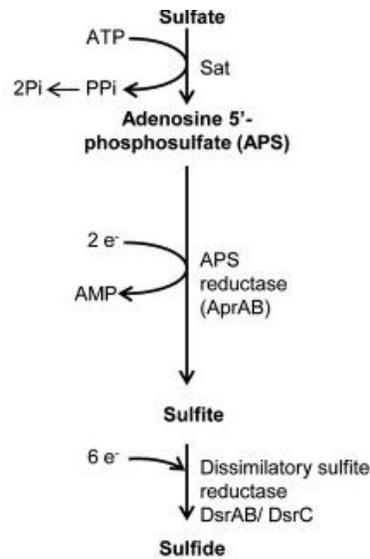


Figura. 3 Ruta metabólica del proceso sulfato reductor (Grein y col., 2013)

### 1.5.1 Factores que influyen en la sulfato reducción

Las BSR comúnmente han sido consideradas como microorganismos anaerobios, por lo cual el proceso SR puede verse afectado en presencia de oxígeno, inactivándose diversas enzimas de la ruta metabólica, particularmente las deshidrogenasas (Krekeler y Cypionka, 1995). Sin embargo, no todas las BSR han sido afectadas por la exposición al oxígeno. Marschall y col. (1993) mostraron evidencias en algunas cepas SR en presencia y en ausencia de oxígeno, por ejemplo, las cepas *Desulfavibrio desulfuricans* CNS, *Desulfavibrio vulgaris*, Marburg y *Desulfobacter hydrogenophilus* mantuvieron su actividad SR a una concentración de oxígeno menor que 0.5 mg/L. No obstante, la actividad SR se redujo en un 30% en presencia de oxígeno. Por otra parte, se ha observado un efecto negativo en la actividad SR en *Desulfobulbus propionicus*. Además, debe considerarse que si el producto final de la SR es el H<sub>2</sub>S, éste ha mostrado tener un efecto tóxico sobre diversos microorganismos, afectando negativamente la SR (Collerant, 1998).

Algunos de los metales pesados se han identificado como inhibidores del proceso sulfato reductor. Utgikar y col. (2002) observaron que altas concentraciones de metales pesados en presencia de sulfuros reaccionan formando complejos metálicos en la pared celular de los microorganismos, restringiendo el paso de sustratos necesarios para las enzimas de la SR y llevar a cabo el proceso respiratorio.

## 2. Justificación

El arranque de los reactores de gran escala, utilizados para el tratamiento de las aguas residuales, normalmente toma periodos inespecíficos de tiempo. Se dice que está estable cuando la microflora deseada es predominante. También es usual decir que el lodo está aclimatado. Los criterios de aclimatación no están bien definidos, aunque es una variable que debería estarlo. Se señala que las poblaciones microbianas necesarias son específicas y que tienen asociado un producto final intrínseco a la cepa. De esto se asume que el metabolismo es monofuncional. Sin embargo, no se puede olvidar que el metabolismo celular es un conjunto de reacciones químicas, sujetas a leyes fisicoquímicas. Por lo tanto, si las condiciones ambientales cambian, el metabolismo debe cambiar. Existen evidencias de lo expuesto desde hace ya tiempo, y se ha podido observar que muchas cepas microbianas son multifuncionales o metabólicamente flexibles (o fenotipos metabólicos). De acuerdo con esto, es muy probable que una misma cepa pueda llevar a cabo funciones respiratorias que sean intrínsecas de otra cepa. Con lo anterior, la estabilización de un reactor deberá depender principalmente de las condiciones de reacción, que de la microflora presente, predomine o no. Establecer y controlar las condiciones de reacción parece ser una acción más simple que la selección de una microflora específica. Para poder evidenciar lo anterior, es necesario hacer más investigación básica y evaluar los procesos utilizando criterios objetivos. Con esta idea en mente es necesario estudiar diferentes procesos respiratorios sobre un mismo cultivo axénicos.

Las variables de respuesta tienen el propósito de respaldar la magnitud con la que cada uno de los procesos respiratorios se realiza. Actualmente se reportan estudios sobre flexibilidad metabólica microbiana, en los que únicamente se reportan evidencias de la eficiencia con la que se consumen los sustratos. No obstante, no suelen indicarse los productos finales del metabolismo. Los procesos deben ser evaluados en términos de eficiencia de consumo [ $E\%$ ,  $(\text{mg de sustrato consumido (NO}_3^-, \text{SO}_4^{2-} \text{ o C}_2\text{H}_3\text{O}_2^-)/\text{mg sustrato alimentado}) * 100$ ], rendimientos de producción [ $Y_p$ ,  $\text{mg de producto (N}_2, \text{HS}^- \text{ o CH}_4) / \text{mg sustrato consumido}$ ] y velocidades específicas de producción [ $q$ ,  $(\text{mg de producto/g SSV d})$ ] y de esa forma se tendrá mayor información sobre el metabolismo microbiano.

### 3. Hipótesis

Si un consorcio microbiano ha mostrado la capacidad metabólica de oxidar distintos compuestos, entonces un lodo estabilizado y cultivos axénicos pueden ser metabólicamente flexibles y realizar más de un proceso respiratorio anaerobio, como la desnitrificación, metanogénesis y sulfato reducción.

## 4. Objetivos

### 4.1 Objetivo General

Evaluar y obtener evidencias cuantitativas sobre la flexibilidad metabólica de un consorcio microbiano y cepas aisladas de un consorcio microbiano como inóculos.

### 4.2 Objetivos Específicos

Utilizando variables de respuesta, como las eficiencias, rendimientos y velocidades específicas, evaluar y analizar en cada cepa y el consorcio microbiano los tres procesos respiratorios:

- a. desnitrificación
- b. metanogénesis
- c. sulfato reducción,

## 5 Material y métodos

### 5.1 Reactor continuo de tanque agitado (RCTA) en condiciones desnitrificantes: fuente de inóculo

Se operó un RCTA en condiciones desnitrificantes con un volumen de operación de 1 L e inoculado con un consorcio microbiano proveniente de una planta tratamiento de aguas residuales operada bajo condiciones metanogénicas. El RCTA fue inoculado con una concentración de sólidos suspendidos volátiles (SSV) de 1.4 g SSV/L. La composición del medio de cultivo se muestra en la Tabla 2. El RCTA fue alimentado a una velocidad de carga (mg/L d) de 135 of  $\text{N-NO}_3^-$  y 270 de C-Acetato. Se operó con una agitación de 200 rpm,  $32.5 \pm 0.7$  °C, pH de  $7.1 \pm 0.2$  y un tiempo de retención hidráulica (TRH) de 1 d. El consorcio microbiano en el RCTA y en el estado estacionario alcanzó eficiencias de consumo de nitrato del 100%, con un rendimiento en la producción de nitrógeno molecular ( $Y_{\text{N}_2}$ ) de  $1 \pm 0.1$ . Bajo estas condiciones el RCTA se operó por 5 meses. Una vez que el consorcio estuvo fisiológicamente estable, se utilizó como fuente de inóculo para los cultivos en lote.

Tabla 2. Medio de cultivo desnitrificante (González y col., 2012)

	(g/L)
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.5
Elementos traza	1 mL
$\text{CaCl}_2$	0.1
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.2
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.01
$\text{MgSO}_4$	0.03
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.017
$\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.005
C/N	2

## 5.2 Cultivos axénicos

Se aislaron cepas del RCTA en estado estacionario por la técnica de siembra de superficie en placa a distintas diluciones. El aislamiento se llevó a cabo en cajas Petri utilizando el medio desnitrificante (Tabla 2) con agar bacteriológico (15 g/L) y una C/N de 7. Los experimentos se incubaron a  $32 \pm 1.0$  °C, y los tiempos de incubación fueron de 24, 48 y 72 horas.

Las colonias obtenidas fueron clasificadas de acuerdo a sus características morfológicas macroscópicas (color aspecto, elevación, etc.) y microscópicas (tinción Gram y microscopía). Se seleccionaron 3 cepas para su propagación, cada una fue inoculada en un medio de cultivo desnitrificante en un volumen de 2 mL en tubos de ensaye. A los 6 días de incubación se trasladaron a un volumen de 10 mL de medio de cultivo nuevo para continuar la propagación. A los 7 días, en condiciones estériles, se recambió el medio de cultivo para continuar el crecimiento microbiano. Todos los cultivos mencionados anteriormente se mantuvieron a una temperatura de incubación de  $32 \pm 1.0$  °C y  $200 \pm 2$  rpm.

Una vez realizado el frotis de cada uno de los cultivos axénicos se procedió a realizar la tinción de Gram como lo describen Olivas y Alarcón (2001).

Periódicamente se realizó la reinoculación de las cepas en el mismo medio de cultivo de aislamiento para verificar que no existiera contaminación de la cepa, es decir, se observó que las cepas mantuvieran las mismas características morfológicas coloniales y microscópicas, así como su tinción diferencial Gram.

## 5.3 Cultivos en lote

Se tomaron muestras microbianas del RCTA para evaluar en cultivos en lote bajo condiciones desnitrificantes, metanogénicas y sulfato reductoras. Los ensayos fueron realizados en botellas serológicas de 125 mL de volumen nominal y conteniendo 75 mL de volumen de operación. Todos los cultivos fueron operados a 200 rpm y un pH de  $6.9 \pm 0.3$ . La composición química cualitativa del medio de cultivo fue similar a la del RCTA (Tabla 2). Las botellas fueron adicionadas con 50 mg  $\text{N-NO}_3^-/\text{L}$  y 100 mg  $\text{C-C}_2\text{H}_3\text{O}_2^-/\text{L}$ . Para el proceso metanogénico la composición del medio de cultivo fue la que se muestra en la Tabla 3. La fuente de carbono utilizada fue acetato a una concentración de 3 g  $\text{C-C}_2\text{H}_3\text{O}_2^-/\text{L}$ . El medio de cultivo para la sulfato reducción fue el que se muestra en la Tabla 4. Los cultivos fueron alimentados con una concentración de sulfato y acetato de 100 mg  $\text{S-SO}_4^{2-}/\text{L}$  y 150 mg  $\text{C-C}_2\text{H}_3\text{O}_2^-/\text{L}$ ,

respectivamente. La concentración de SSV (g SSV/L) del lodo para la evaluación del proceso desnitrificante, metanogénico y SR fue de  $1.9 \pm 0.1$ ,  $1.9 \pm 0.2$  y  $0.7 \pm 0.02$  respectivamente. Para los ensayos en lote realizados con los cultivos axénicos, la concentración de SSV fue de  $0.1 \pm 0.03$ ,  $0.5 \pm 0.09$  y  $0.1 \pm 0.02$ , para la desnitrificación, metanogénesis y sulfato reducción, respectivamente.

Tabla 3. Medio de cultivo metanogénico (Martínez, 2004)

	(g/L)
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.3
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.44
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.17
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.05
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.075
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.00018
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.000916
Extracto de levadura	0.5
C/N	33

Tabla 4. Medio de cultivo sulfato reductor (García-Saucedo, 2008)

	(g/L)
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.2132
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.0234
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0249
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0366
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.01563
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0183
$\text{ZnCl}_2$	0.01
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	7
C/S	1.5

Antes de iniciar alguno de los cultivos, se hizo pasar un flujo de helio por 6 minutos en el espacio de cabeza para desplazar el oxígeno y nitrógeno, y así tener una atmósfera anaerobia. Posteriormente todas las botellas fueron selladas herméticamente con tapones de caucho y sellos de aluminio. Los cultivos fueron incubados a  $33 \pm 1.5$  °C y pH inicial de  $7.0 \pm 0.2$ . Los ensayos se realizaron por duplicado y por separado; una unidad experimental para medir los compuestos solubles en el medio líquido, y otra unidad experimental para medir los compuestos gaseosos. Para los cultivos axénicos se establecieron condiciones de esterilidad, es decir, los medios de cultivo, fuentes de carbono, azufre y nitrógeno, fueron esterilizados a 15 psi por 20 minutos. Así mismo el flujo de helio utilizado en los cultivos fue esterilizado haciéndolo pasar por una columna de algodón previamente estéril y una membrana de  $0.45 \mu\text{m}$  de porosidad. Cada medio fue incubado a los tiempos de cultivo de cada proceso como control abiótico, sin observar actividad catabólica ni crecimiento. El muestreo se realizó con jeringas comerciales estériles de 5 y 1mL. Los cultivos fueron evaluados a través de las variables de respuesta; eficiencias de consumo (E, %), rendimientos de productos ( $Y_{p/s}$ ) y velocidades específicas de producción (q).

## 6. Métodos analíticos

Para mayor certeza de la reproducibilidad y linealidad de los métodos analíticos, se realizaron varias curvas de calibración para cada técnica analítica. En la Tabla 5 se resumen los coeficientes de correlación ( $R^2$ ) y de variación (C.V.) de las pendientes correspondientes a las curvas de calibración de los diferentes métodos analíticos.

Tabla 5. Coeficientes de correlación y de variación de las pendientes correspondientes a las curvas de calibración realizadas por los diferentes métodos analíticos

Análisis	C.V. (%)	$R^2$
Nitrito	7.0	$0.994 \pm 0.005$
Nitrato	8.6	$0.996 \pm 0.005$
Nitrógeno molecular	5.7	$0.970 \pm 0.021$
Acetato	6.7	$0.992 \pm 0.001$
Metano	9.2	$0.990 \pm 0.009$
Sulfato	8.1	$0.991 \pm 0.012$

## 6.1 Cuantificación de compuestos nitrogenados y azufrados

Nitrato, nitrito y sulfato fueron determinados por electroforesis capilar (Beckman Coulter, proteomeLab PA 800). El electrolito utilizado para medir estos iones fue preparado con 8 mL de  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  (32.5 mM),  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (0.17 mM) y una solución comercial CIA Pak OFM anion-BT (Waters) más 7.2 mL de agua desionizada. Un microcapilar de sílice fundida (60 cm de largo y 75  $\mu\text{m}$  de diámetro interno) fue utilizado. La absorbancia fue medida en la región ultravioleta usando una lámpara de mercurio a 254 nm y 25 °C, como lo describen De la Torre-Velasco y col. (2013). Las muestras fueron previamente filtradas con una membrana de nylon de 0.45 y 0.2  $\mu\text{m}$  de porosidad.

## 6.2 Cuantificación de sulfuro

La cuantificación de sulfuro se hizo por el método yodométrico (APHA, 2011). En un matraz Erlenmeyer de 100 o 250 mL, se adiciona 5 mL de solución de yodo (0.025N previamente valorada), con 10 mL de agua destilada y 1 mL de HCl 3N. Posteriormente se le adiciona un volumen de 10 mL de la muestra a analizar y se mantiene en reposo y en la oscuridad por 10 min. Transcurrido este tiempo se procede a titular con una solución de tiosulfato de sodio (0.025N previamente valorada). Hasta alcanzar una coloración amarilla y se adiciona 1 mL del indicador de almidón, adquiriendo una coloración oscura. Al continuar la titulación en el punto final se observa un vire de color café oscuro a incoloro, debido a la reacción del almidón con el yodo. La determinación de la concentración de sulfuro se hace a través de la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{mg S}^{2-}}{\text{L}} = \frac{[(\text{AxB}) - (\text{CxD})] \times 16000}{\text{Volumen de la muestra}}$$

Donde A = mL de la solución de yodo, B = normalidad de la solución de yodo, C = mL de la solución de tiosulfato, D = normalidad de la solución de tiosulfato.

## 6.2.1 Valoración de soluciones

### 6.2.1.1 Solución de tiosulfato de sodio 0.025 N (500 mL)

Se calentó y mantuvo en ebullición 0.7 L de agua destilada durante 10 min. Se dejó enfriar y se guardó. Se pesó 3.102 g de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  y se disolvió en el agua destilada antes mencionada aforando a 0.5 L, posteriormente se guardó en un frasco ámbar y se agregó 2.5 mL de tolueno como conservador. Para su valoración se pesaron 0.25 g de patrón primario  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  previamente secado a 100 °C durante 1 h y se aforó a 200 mL. Esta solución tiene una normalidad 0.025 N. Procedimiento: En 100 mL de agua destilada en un matraz Erlenmeyer se disuelven 1.5 g de KI y 1 g de  $\text{NaCO}_3$ , se agregan a 20 mL de la solución  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ . A continuación se agregan 5 mL de HCl concentrado cubriendo y dejando en reposo aproximadamente 10 min. Se agrega 1 mL de indicador de almidón y se titula con la solución preparada de tiosulfato de sodio. Se detiene la titulación hasta el punto final, dado por el cambio de color canela a azul ligero. Cálculo:  $N\text{-Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 = 20 \text{ mL de dicromato} * N\text{-dicromato} / \text{mL de tiosulfato}$ .

### 6.2.1.2 Solución de Yodo (500 mL)

Se disuelven 10 -12.5 g de yoduro de potasio (KI) en un volumen pequeño de agua. Se adicionan 1.6 g de yodo ( $\text{I}_2$ ), después de disolver el yodo se vierte en un matraz aforando con 500 mL de agua destilada. Se almacena en un frasco ámbar. Para su valoración, en un matraz Erlenmeyer poner 20 mL de la solución de yodo. Agregar 1 mL de HCl 3N, dejar en reposo 8 a 10 min. Adicionar unas gotas del indicador de almidón y titular con la solución de tiosulfato. Registrar el volumen de tiosulfato consumido hasta el vire del color. Cálculo:  $N\text{-yodo} = (N \text{ tiosulfato} * V \text{ tiosulfato}) / V \text{ yodo}$

### 6.2.1.3 Indicador de almidón

Se pesaron 3 g de almidón soluble y con un pequeño volumen de agua preparando una emulsión. Se vertió la emulsión en 500 mL de agua destilada en ebullición, se continuó hirviendo durante 3-5 min. Dejando enfriar y sedimentar durante 12 hrs. Recuperando por decantación el líquido claro sobrenadante. Se guardó en un frasco ámbar. Para su conservación se utilizaron 0.8 g de ácido salicílico o unas gotas de tolueno.

### **6.3 Cuantificación de nitrógeno molecular, metano y dióxido de carbono**

La determinación de los gases se hizo mediante cromatografía de gases (Varian 3350) utilizando un detector de conductividad térmica (González-Blanco y col., 2012). Como fase móvil se utilizó helio a un flujo de 16 mL/min, con una columna de acero de 1.20 m de largo, empacada con Porapak Q malla 80 - 100. Las condiciones de temperatura fueron: para la columna, 50° C; inyector, 100° C; detector, 100° C; filamento, 135° C y un volumen de inyección de 0.1 mL de muestra. Los tiempos de retención fueron 0.48, 0.7 y 1.2 minutos para metano, nitrógeno molecular y CO<sub>2</sub> respectivamente.

### **6.4 Cuantificación de acetato**

El acetato fue medido por cromatografía de gases (Varian 3400) con un detector de ionización de flama (FID). El nitrógeno molecular fue utilizado como fase móvil a un flujo de 4 mL/min y utilizando una columna AT 1000 de 10 m de longitud y 0.53 mm de diámetro. Las temperaturas de operación fueron 180, 230, y 250 °C para la columna, inyector y detector respectivamente. Las muestras fueron previamente filtradas con una membrana de nylon de 0.45 y 0.2 µm de porosidad y posteriormente acidificadas al 5% (V/V) con una solución de HCl al 50%. El volumen de inyección de la muestra fue de 2 µL.

### **6.5 Cuantificación de sólidos suspendidos volátiles (SSV)**

La concentración de SSV del consorcio y de los cultivos axénicos se determinó por el método APHA/AWWA/WEF, (2005). Se pusieron a peso constante crisoles a 100 °C al menos por 4 horas. Se tomó una muestra homogénea de 5 mL (por duplicado), se evaporó el líquido de la muestra en el crisol en una parrilla a baja temperatura, para evitar ebullición y pérdidas. Las muestras con líquidos evaporados se secaron en una estufa a 105°C por al menos una hora, y posteriormente se colocaron en un desecador por 15 minutos. Se pesaron en una balanza analítica y se obtuvo el peso de sólidos suspendidos totales (SST). Posteriormente se colocaron los crisoles con la muestra seca por 45 minutos en una mufla a 550°C y fueron desecados por 15 minutos, para posteriormente obtener el peso de

sólidos suspendidos fijos (SSF). Y con los pesos anteriores se calculó la concentración de SSV de la siguiente manera, donde A es el peso constante del crisol:

$$\frac{\text{g SSV}}{\text{L}} = \frac{(\text{SST} - A) - (\text{SSF} - A)}{\text{Volumen de la muestra}}$$

## 7. Resultados y discusión

### 7.1 Reactor continuo de tanque agitado (RCTA) en condiciones desnitrificantes: fuente de inóculo

Después de 5 días de operación bajo condiciones desnitrificantes las eficiencias de consumo de nitrato y acetato en el RCTA fueron cercanas al 100 % (Fig. 4). El consumo de acetato se vio acoplado al proceso desnitrificante, alcanzando un rendimiento en la producción de nitrógeno molecular de  $1.0 \pm 0.01$  mg N-nitrógeno producido/mg N-nitrato consumido. El rendimiento y las eficiencias de consumo se mantuvieron durante todo el tiempo con una velocidad promedio de producción de nitrógeno de  $134.9 \pm 10.8$  mg  $N_2$ /L d. De esta manera el RCTA se mantuvo en estado estacionario y fisiológicamente estable durante este periodo de tiempo, y bajo estas condiciones se tomaron los inóculos necesarios para evaluarlos en cada cultivo.

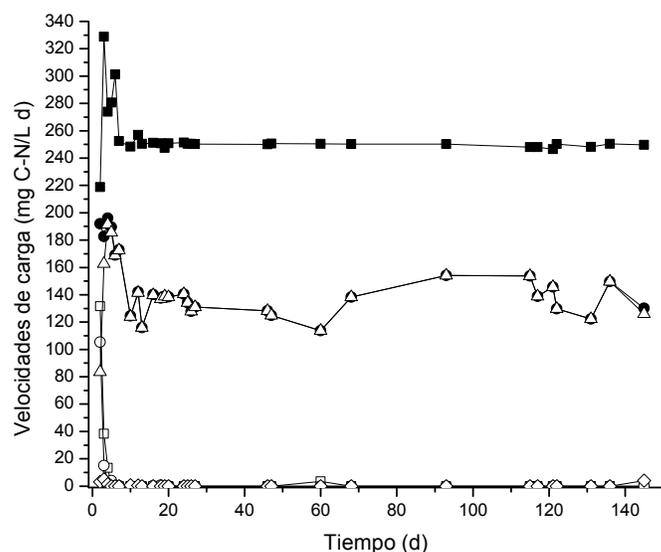


Figura 4. Perfil de los compuestos nitrogenados y carbonados en el RCTA. (■)  $C-C_2H_3O_2^-$  Influyente, (□)  $C-C_2H_3O_2^-$  Efluente, (●)  $N-NO_3^-$  Influyente, (○)  $N-NO_3^-$  Efluente, (◊)  $N-NO_2^-$  Efluente, (Δ)  $N-N_2$  Efluente

## 7.2 Cultivos axénicos

Una vez alcanzado y manteniendo el régimen estacionario del RCTA así como la estabilidad fisiológica del consorcio microbiano, los cultivos axénicos fueron aislados del consorcio. Los cultivos axénicos fueron seleccionados por sus distintas características morfológicas macroscópicas (Tabla 6). Asimismo, se realizó el análisis microscópico de las cepas seleccionadas, de las cuales se observaron formas bacilares para las tres cepas (Figura. 5 y 6). Éstas también pudieron ser diferenciadas por su tinción Gram, donde sólo una de las 3 cepas aisladas presentó tinción de Gram positivo (Tabla 7). Con las características descritas se concluyó que los cultivos axénicos son diferentes entre sí. Las cepas seleccionadas fueron nombradas J, P y R.

Tabla 6. Características morfológicas macroscópicas de los aislados

Cepa	Color	Apariencia	Aspecto	forma y/o tamaño	elevación
J	Blanco	Opaco	Liso	Irregular	-
P	anaranjado-amarillo	Brillante	Cremosa	redonda y grande	+
R	Amarillento	Brillante	Liso	Redonda	+

Tabla 7. Características morfológicas microscópicas de los aislados

Cepas	Gram (+/-)	Morfología microscópica
J	-	Bacilar
P	+	Bacilar
R	-	Bacilar

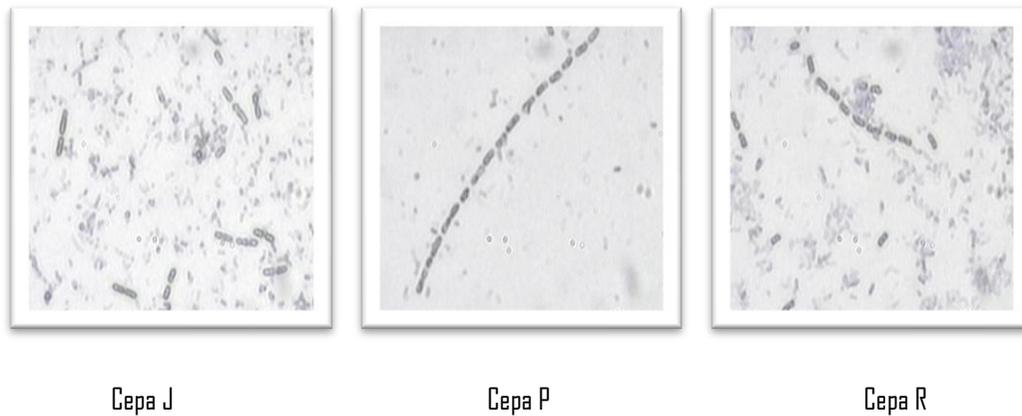


Figura 5. Características morfológicas microscópicas de las cepas aisladas (microscopía óptica 40X)

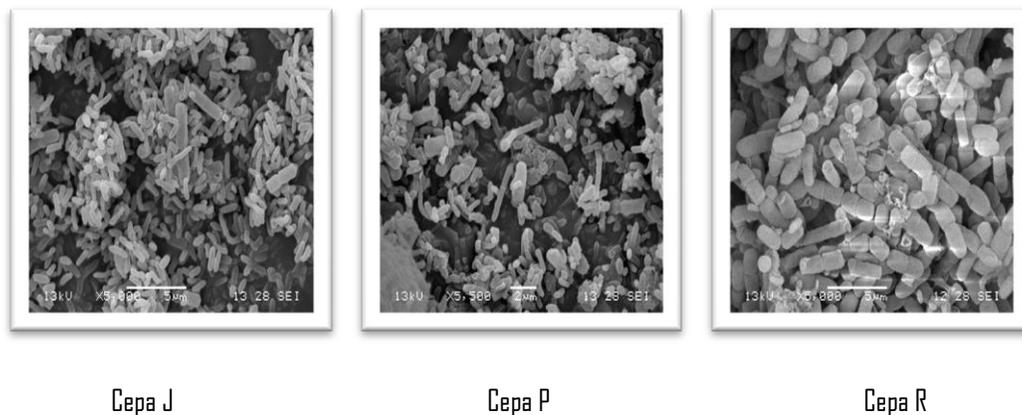


Figura 6. Características morfológicas microscópicas de las cepas aisladas (microscopía electrónica de barrido 5000X)

## 7.3 Cultivos en lote

### 7.3.1 Cultivo en lote bajo condiciones desnitrificantes

La Figura 7 muestra el perfil de producción de  $N_2$  bajo condiciones desnitrificantes en los cultivos en lote, con el consorcio microbiano (control) y con los cultivos axénicos J, P y R. En todos los casos, los cultivos mostraron la capacidad de reducir  $NO_3^-$  a  $N_2$ , con eficiencias de consumo cercanas al 100% a las 6 horas de cultivo, y con rendimientos altos en la producción de  $N_2$  ( $Y_{N_2}$ ) para cada cultivo (Tabla 8). Los resultados dan evidencia de la capacidad metabólica de todos estos para desnitrificar. Se ha observado que algunas cepas bacilares han mostrado

la capacidad desnitrificante como *N. europaea* (Shrestha y col., 2002), *B. licheniformis* (Brycki y col., 2000). En algunos casos, incluso, desnitrifican en condiciones aeróbicas, como lo sugieren Robertson y Kuenen (1990) para el caso de *P. denitrificans*. Se sugiere que para las cepas J y R pudiera asociárseles a alguno de esos bacilos de acuerdo a su capacidad desnitrificante y a su semejanza en la tinción de Gram. Comúnmente se han encontrado que cepas bacilares predominan en los sistemas eficientes de tratamiento de aguas residuales para eliminar nitrógeno y carbono por consorcios microbianos (Choi y col., 2000). Sin embargo, son necesarios más estudios para confirmar, ampliar y profundizar sobre estas semejanzas.

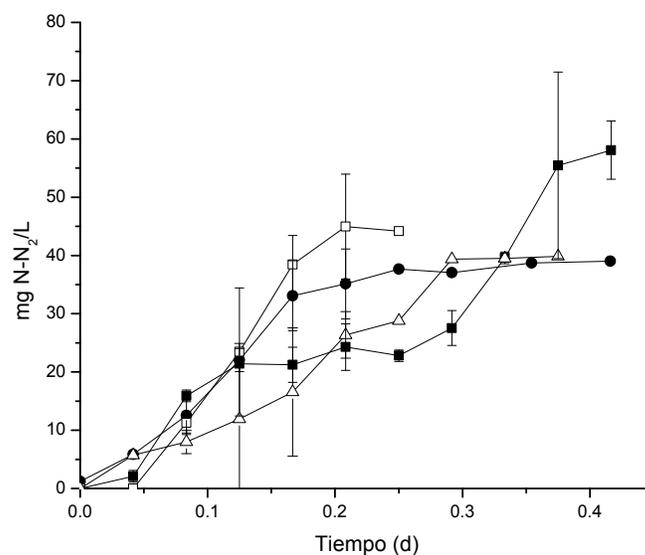


Figura 7. Producción de  $N_2$  por el consorcio microbiano y cultivos axénicos en lote. (■) Consorcio microbiano, (□) Cepa J, (●) Cepa P, (△) Cepa R

Tabla 8. Eficiencias de consumo de  $NO_3^-$ , rendimientos de producción de  $N_2$  y velocidades específicas de producción de  $N_2$  del consorcio microbiano y cultivos axénicos

Cultivos	E (%)	$Y_{N_2/NO_3}$	q (mg $N_2$ /g SSV d)
Consorcio microbiano	$59.7 \pm 1.2$	$0.61 \pm 0.01$	$360.8 \pm 108$
J	$100 \pm 0.01$	$1.1 \pm 0.01$	$1959.5 \pm 255$
P	$100 \pm 0.1$	$0.73 \pm 0.06$	$2149.6 \pm 470$
R	$71.7 \pm 7.8$	$0.73 \pm 0.1$	$1528.6 \pm 301$

Cabe notar que las velocidades específicas de producción de  $N_2$  de los cultivos axénicos fueron superiores a las del consorcio microbiano. Una posible explicación podría deberse a que el porcentaje de estas cepas dentro del consorcio, fue una fracción pequeña, por lo cual su contribución en la velocidad específica de producción de  $N_2$  fue mínima. Un estudio de biología molecular que cuantifique el porcentaje de estas cepas dentro del lodo desnitrificante, podría confirmar este supuesto.

### 7.3.2 Cultivo en lote bajo condiciones metanogénicas

En la Figura 8 se observa un perfil de producción de metano. En este caso, el proceso metanogénico sólo pudo observarse con el consorcio microbiano, a los 9 días de cultivo, con una eficiencia de consumo de acetato del 100%, siendo los productos finales  $CH_4$  y  $CO_2$  con un rendimiento de  $0.1 \pm 0.01$ . La velocidad específica de producción de metano fue  $37.9 \pm 0.6$  mg C- $CH_4$ /g SSV d. A pesar de la formación de metano ( $265 \pm 10$  mg C- $CH_4$ /L) y la formación de  $CO_2$  (15 mg C- $CO_2$ /L), se observó que el 100% de consumo de acetato no estuvo destinado a la producción de metano, lo cual podría sugerir que el resto del acetato consumido fue utilizado por otra ruta metabólica no identificada. Lo anterior da también evidencia de que el consorcio microbiano tiene la capacidad metabólica de obtener energía, a partir de acetato, por otra ruta metabólica; dado que se observó un mínimo rendimiento en la producción de biomasa ( $Y_{BM}$ ) de  $0.06 \pm 0.01$  mg C-BM producida/mg C- $C_2H_3O_2^-$  consumido. Por otra parte, se ha mencionado que la metanogénesis puede disminuir hasta un 50% de la producción de metano por la presencia de amonio o sulfuro, así como por el incremento en el valor de pH por encima de 7.4 (Borja y col., 1996; Zeeman y col., 1985) y una temperatura mayor que  $37$  °C (Hansen y col., 1999). Estos factores fueron considerados en la formulación del medio de cultivo y no se descarta la contribución a la disminución de los rendimientos de la actividad metanogénica en el consorcio y los cultivos axénicos.

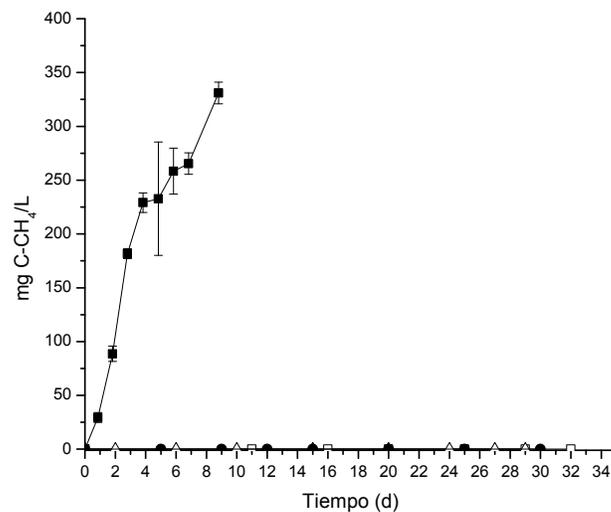


Figura 8. Producción de CH<sub>4</sub> por el consorcio microbiano y cultivos axénicos en lote. (■) Consorcio microbiano, (□) Cepa J, (●) Cepa P, (Δ) Cepa R

La ausencia en la actividad metanogénica en los cultivos axénicos no necesariamente significa que en el consorcio no formen metano. Hay algunas sugerencias que proponen que los fenómenos de transferencia horizontal de genes (conjugación, transformación y transducción) están activos en los consorcios, por tanto, las poblaciones presentes podrían ser genéticamente modificadas. Se sugiere que la inactividad metanogénica en los cultivos axénicos pudo estar relacionada con la reversión genética durante el proceso de aislamiento y propagación, sin embargo se requieren de más estudios moleculares que corroboren esta hipótesis. Algunos autores han reportado que la capacidad y flexibilidad metabólica de una cepa está conferida a la posesión constitutiva de las enzimas necesarias para expresar la actividad metabólica más que a la inducción de éstas (Robertson y Kuenen, 1990). Por otra parte, la capacidad metabólica de algunos grupos bacterianos presentes en consorcios microbianos se relaciona con la transferencia horizontal de genes, la cual puede originarse durante la interacción de distintas cepas en un consorcio (Lorenz y Wackernagel, 1994, Ludwig y col, 1993), sin embargo, esta transferencia genética puede revertirse en función de la estabilidad que posee cada población. Por lo cual el factor de reversión génica no debe descartarse durante el tiempo de aislamiento y propagación.

### 7.3.3 Cultivo en lote bajo condiciones sulfato reductoras

En la Figura 9 se observa la producción de sulfuro. La actividad SR pudo evidenciarse en todos los cultivos. La mayor producción de sulfuro se apreció en la cepa J, con una concentración de 34.4 mg S-SH<sup>-</sup>/L mayor que en el propio consorcio microbiano. Situación similar fue observada por Ivanov y col. (2006), quienes notaron una mayor actividad metabólica en un proceso en cepas aisladas de un consorcio microbiano en un menor tiempo de cultivo que el mismo consorcio. En la Tabla 9 se expresan las variables de respuesta del proceso SR, donde se puede ver que el proceso SR se realizó en distintas magnitudes para cada cultivo. Cabe señalar que la relación C/S del proceso experimental estuvo por encima del valor estequiométrico, y que algunos autores mencionan que cuando existe un exceso de materia orgánica en condiciones SR, el proceso SR podría favorecer otro proceso respiratorio como la metanogénesis (García-Saucedo, 2008). No obstante, la capacidad metabólica SR evidenciada en los cultivos axénicos muestra que las cepas parecen ser metabólicamente flexibles, como el género *Sulfurospirillum*, que ha mostrado ser desnitrificante y reducir al sulfato (Hubert y Voordouw, 2007; Gerasimchuk y col., 2010).

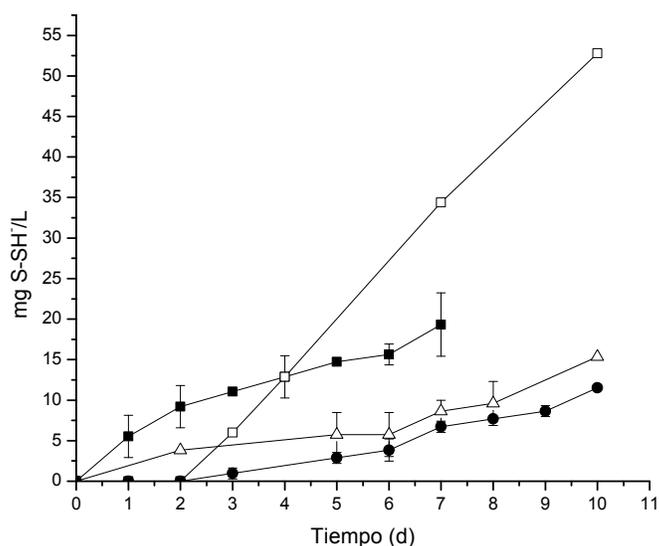


Figura 9. Producción de SH<sup>-</sup> por el consorcio microbiano y cultivos axénicos en lote. (■) Consorcio microbiano, (□) Cepa J, (●) Cepa P, (△) Cepa R

Tabla 9. Eficiencias de consumo de  $\text{SO}_4^{2-}$ , rendimientos de producción de  $\text{SH}^-$  y velocidades específicas de producción de  $\text{SH}^-$  del consorcio microbiano y cultivos axénicos

Cultivos	E (%)	$Y_{\text{SH}^-/\text{SO}_4}$	q (mg $\text{SH}^-$ /g SSV d)
Consorcio microbiano	49.1 ± 1.4	0.4 ± 0.1	5.3 ± 0.4
J	21.5 ± 3.4	1.0 ± 0.2	107.2 ± 0.1
P	16.5 ± 0.3	0.4 ± 0.1	14.6 ± 0.3
R	13.2 ± 2.4	0.6 ± 0.2	25.2 ± 4.6

## 8. Conclusiones

Los estudios en lote desnitrificantes, metanogénicos y sulfato reductores, con el consorcio microbiano, mostraron flexibilidad metabólica y llevaron a cabo 3 procesos respiratorios con nitrógeno molecular, metano y sulfuro como productos finales. El consorcio mostró una alta eficiencia de consumo de sustrato para cada proceso. Por otra parte los cultivos axénicos, bajo las condiciones de estudio, sólo mostraron flexibilidad metabólica para desnitrificar y sulfato reducir, siendo los productos finales nitrógeno molecular y sulfuro, respectivamente. Bajo las condiciones de ensayo establecidas (con acetato como fuente de energía), no se detectó la formación de metano con los cultivos axénicos. Se observó que, bajo las mismas condiciones experimentales, un cultivo axénico expresó una mayor tasa de producción específica ( $\text{N}_2$  y  $\text{SH}^-$ ), que el consorcio microbiano. Con los cultivos en lote estudiados se pudo observar que fueron capaces de modificar su metabolismo como respuesta a las condiciones de cultivo, lo que fue un indicio de la flexibilidad metabólica microbiana.

Con los resultados obtenidos se sugiere que el arranque de los sistemas para el tratamiento de las aguas residuales puede ser sistematizado y en tiempos más cortos, dado que parecieran ser no dependientes del tipo de poblaciones, sino de las condiciones de cultivo, en particular de las condiciones químicas del influente. Sin embargo son necesarios más estudios de identificación molecular que corroboren esta hipótesis.

## 9. Referencias

1. Annachhatre, A.P., Suktrakoolvait, S. (2001). Biological sulfate reduction using molasses as a carbon source. *Water Environ. Res.* 73:118-126.
2. APHA. (2011). Standard methods for examination of water and wastewater. Washington, D.C., USA: American Public Health Association.
3. APHA/AWWA/WEF. (2005). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, Washington DC, USA.
4. Baker, L.A., Herlihy, A.T., Kaufmann, P.R. y Eilers, J.M. (1991). Acidic lakes and streams in the: the role of acidic deposition. *Science* 252: 1151-1154.
5. Beristain-Cardoso R., Pérez-González D.N., González-Blanco G., Gómez J. (2011). Simultaneous oxidation of ammonium, *p*-cresol and sulfide using a nitrifying sludge in a multipurpose bioreactor: A novel alternative. *Bioresource Technology* 102:3623-3625.
6. Beristain-Cardoso R., Texier A.-C., Alpuche-Solís A., Gómez J., Razo-Flores R. (2009). Phenol and sulfide oxidation in a denitrifying biofilm reactor and its microbial community analysis. *Process Biochemistry* 44:23-28.
7. Beristain-Cardoso R., Texier A.-C., Sierra-Álvarez R., Field J., Razo-Flores R., Gómez J. (2008). Simultaneous sulfide and acetate oxidation under denitrifying conditions using an inverse fluidized bed reactor. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 83: 1197-1203.
8. Bond D., Lovley D. (2002). Reduction of Fe (III) oxide by methanogens in the presence and absence of extracellular quinones. *Environmental Microbiology* 4: 115-124.
9. Borja R., Sánchez E., Weiland P. (1996). Influence of ammonia concentration on thermophilic anaerobic digestion of cattle manure in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Process Biochemistry* 31: 477-483.
10. Bremner J., Shaw K. (1958). Denitrification in soil. II. Factors affecting denitrification. *Journal of Agricultural Science* 51: 40-52.
11. Brycki B., Seifert K., Szymanska K., Domka F. (2000). The effect of Oxidizing Biocides on Desulfurication and Denitrification Processes. *Polish Journal of Environmental Studies* (9): 363-367.

12. Camargo J., Alonso A. (2007). Contaminación por nitrógeno inorgánico en los ecosistemas acuáticos: problemas medioambientales, criterios de calidad del agua, e implicaciones del cambio climático. *Ecosistemas* 16(2): 98-110.
13. Castillo F., Roldan M., Blasco R., Huertas M., Caballero F., Moreno-Vivian C., Luque-Romero M. (2005). *Biotecnología Ambiental*. Ed. Tébar 128-139.
14. Celis-García, M.L.B. (2004). Eliminación de óxidos de azufre de efluentes. Tesis doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.
15. Cervantes-Carrillo F., Pérez J., Gómez J. (2000). Avances en la Eliminación Biológica del Nitrógeno de las Aguas Residuales. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 42:73-82.
16. Chapin F., Zavaleta E., Eviner V., Naylor R., Vitousek P., Reynolds H., Hooper D., Lavorel S., Sala O., Hobbie S., Mack M., Díaz S. (2000). Consequences of changing biodiversity. *NATURE* 405: 234-242.
17. Choi, Y.S., Hong, S.W., Kim, S.J., Chung, I.H., 2000. Development of a biological process for livestock wastewater treatment using a technique for predominant outgrowth of Bacillus species. *Water Science and Technology* 45: 71-78.
18. Colleran E., Concannon F., Golden T., Geoghegan F., Crumlish B., Killilea E., Henry M., Coates J. (1992). Use of methanogenic activity tests to characterise anaerobic sludges, screen for anaerobic biodegradability and determine toxicity thresholds against individual trophic groups and species. *Water Science and Technology* (25): 31-40.
19. Cuervo-López FM., Martínez F., Gutierrez-Rojas M., Noyola RA., Gomez J. (1999). Effect of volumetric loading rate and carbon source on denitrification and sludge settleability in UASB reactors. *Water Sc. Technol.* 40:123-130.
20. De la Torre-Velasco A., Beristain-Cardoso R., Damian-Matsumura P., Gómez J. (2013). Sequential nitrification-denitrification process for nitrogenous, sulfurous and phenolic compounds removal in the same bioreactor. *Bioresource Technology* 139: 220-225
21. Ellis T.G. (2004). *Encyclopedia of Life Support System (EDLSS)*. Developed under the Auspices of the UNESCO. Oxford, UK; EDLSS.
22. Galagan J., Nusbaum G., Roy A. (2002). The genome of *M. acetivorans* Reveals Extensive Metabolic and Physiological Diversity. *Genome Research* 12: 532-542.

23. García-Saucedo C., Fernández F., Buitrón G., Cuervo-López F., 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.
24. Garrity G. (2001). Bergey's manual of systematic bacteriology. *Springer-Verlag*. 721.
25. Gerasimchuk A., Shatalov A., Novikov A., Butorova O., Pimenov N., Lein A., Yanenko A., Karnachuk O. (2010). The search for sulfate-reducing bacteria in mat samples from the lost city hydrothermal field by molecular cloning. *Microbiology* 79: 96-105.
26. González-Blanco G., Beristain-Cardoso R., Cuervo-López F., Cervantes F., Gómez J. (2012). Simultaneous oxidation of ammonium and *p*-cresol linked to nitrite reduction by denitrifying sludge. *Bioresource Technology* 103: 48-55.
27. Grein F., Ramos A., Venceslau S., Pereira I. (2013). Unifying concepts in anaerobic respiration: Insights from dissimilatory sulfur metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta* 1827: 145-160.
28. Hansen K., Angelidaki I., Ahring B. (1999). Improving Thermophilic anaerobic digestion of swine manure. *Water Research* 33: 1805-1810.
29. Hao D., Chen J., Huang L., Buglass R. (1996). Sulfate reducing bacteria. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* (26): 155-187
30. Harada H., Uemura S., Momoi K. (1994). Interaction between sulfate-reducing bacteria and methane-producing bacteria in UASB reactors fed with low strength wastes containing different levels of sulfate. *Water Res.* 28:355-367
31. Hubert C., Voordouw G. (2007). Oil Field Souring Control by Nitrate-Reducing *Sulfurospirillum* spp. That Outcompete Sulfate-Reducing Bacteria for Organic Electron Donors. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 2644-2652.
32. Ivanov V., Wang X., Tay S., Tay J. (2006). *Applied Microbiology and Biotechnology* 70: 374-381.
33. Kida K., Shigematsu T., Kijima J., Numaguchi M., Mochinaga Y., Abe N., Morimura S. (2001). Influence of Ni<sup>2+</sup> and Co<sup>2+</sup> on methanogenic activity and the amounts of coenzymes involved in methanogenesis. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 91 (6): 590-595.
34. Knowles, R. (1982) Denitrification. *Microbiology Review*. 46 (1): 43-70.
35. Krekeler D. y Cypionka H. (1995). The preferred electron acceptor of *Desulfovibrio desulfuricans* DSM. *FEMS Microbiology Ecology* (17): 271-278.

36. Kroeker E., Schulte D., Sparling A., Lapp, H. (1979). Anaerobic treatment process stability. *Journal Water Pollution Control Federation* (51) 718-727.
37. Liu T., Sung S., 2002. Ammonia inhibition on thermophilic acetoclastic methanogens. *Water Science and Technology* (45):113-120.
38. Lorenz M., Wackernagel W. (1994). Bacterial Gen Transfer by Natural Genetic Transformation in the Environment. *Microbiological Reviews* 58: 563-602.
39. Ludwig W., Mittenhuber G., Friedrich C. (1993). Transfer of *Thiosphaera pantotropha* to *Paracoccus denitrificans*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 43: 363-367.
40. Madigan MT., Martinko, JM. (2005). Brock Biology of Microorganisms, 11<sup>th</sup> Ed. Pearson Prentice Hall.
41. Marschall C., Frenzel P., Cypionka H. (1993). Influence of oxygen on sulfate reduction and growth of sulfate-reducing bacteria. *Archives of Microbiology* 159: 168-173.
42. Martínez-Gutiérrez E. (2004). Estudio molecular de las poblaciones de un lodo anaerobio en condiciones desnitrificantes y metanogénicas. Tesis. Maestría en biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.
43. Meuer, J., H.C. Kuettner, J.K. Zhang, R. Hedderich and W.W. Metcalf. (2002). Genetic analysis of the archaeon *Methanosarcina barkeri* Fusaro reveals a central role for Ech hydrogenase and ferredoxin in methanogenesis and carbon fixation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:5632-5637.
44. Montes, Varela R., Ladaría P., Alonso C., Pérez A., Parafita J., Berrocal M., Urquijo S., García F., Seoánez P. (2000). Ingeniería del medio ambiente. Ed. Mundi-Prensa. Pp. 59.
45. Muhumbi W., Boon N., Boterdaele R., De Vreese I., Top E., Verstraete W. (2001). Microbial sulfate reduction with acetate: process performance and composition of the bacterial communities in the reactor at different salinity levels. *Applied Microbiology and Biotechnology* 55: 787-793.
46. Olivas y Alarcón (2001). Manual de prácticas de microbiología básica y microbiología de alimentos. Ed. UACJ. México. Pp. 14.
47. Reyes-Ávila J., Razo-Flores E., Gómez J. (2004). Simultaneous biological removal of nitrogen, carbon and sulfur by denitrification. *Water Research* 38: 3313-3321.
48. Richardson D., Felgate H., Watmough N., Thomson A., Baggs E. (2009). Mitigating release of the potent greenhouse gas N<sub>2</sub>O from the nitrogen cycle- could enzymic regulation hold the key?. *Trends in Biotechnology*. 27: 388-397.

49. Robertson L., Kuenen J. (1990). Combined heterotrophic nitrification and aerobic denitrification in *Thiosphaera pantotropha* and other bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 57:139-152.
50. Robertson L., Kuenen J. (1990). Combined heterotrophic nitrification and aerobic denitrification in *Thiosphaera pantotropha* and other bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* (57): 139-152.
51. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. (2009). El medio ambiente en México, en resumen.
52. Shon H., Vigneswaran S., Snyder S. (2006). Effluent Organic Matter (EfOM) in Wastewater: Constituents, Effects, and Treatment. *Environmental Science and Technology*, 36:327-374.
53. Shrestha N.K., Hadano S., Kamachi T., Okura I. (2002). Dinitrogen production from ammonia by *Nitrosomonas europaea*. *Applied Catalysis A* 237: 33-39.
54. Sierra-Álvarez R., Beristain-Cardoso R., Salazar M., Gómez J., Razo-Flores E., Field JA. (2007). Chemolithotrophic denitrification with elemental sulfur for groundwater treatment. *Water Res.* 41:1253 - 1262.
55. Takii S., Fukui M. (1990). Relative importance of Methanogenesis, Sulfate Reduction and Denitrification in Sediments of the Lower Tama River. *Bulletin of Japanese Society of Microbial Ecology* 6: 9-17.
56. Téllez-Pérez S.K., Silva C.D., Texier A.-C. (2013). Simultaneous Ammonium and *p*-Hydroxybenzaldehyde Oxidation in a Sequencing Batch Reactor. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 12:97-104.
57. Thauer R., Jungermann K., Decker K. (1977). Energy conservation in chemotropic anaerobic bacteria. *Bacteriological Rev.* 41:100.
58. Third K., Burnett N., Cord-Ruwisch R. (2003). Simultaneous nitrification and denitrification using stored substrate (phb) as the electron donor in an SBR. *Biotechnology and Bioengineering* 83: 706-720.
59. Utgikar V., Harmon S., Chaudhary N., Tabak H., Govind R., Haines J. (2002). Inhibition of sulfate reducing bacteria by metal sulfide formation in bioremediation of acid mine drainage. *Environmental toxicology* (17): 40-48.
60. Vitousek P., Mooney H., Lubchenco J., Mellilo J. (1997). Human Domination of Earth's Ecosystems. *Science* 277: 494-499.
61. Vollbrecht D., Schlegel H. (1978). Excretion of Metabolites by Hydrogen Bacteria II. Influences of Aeration, pH, Temperature, and Age of Cells. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 6: 157-166.
62. Voordouw G. (1995). The genus *Desulfovibrio*: The centennial. *Applied and Environmental Microbiology* (61): 2813-2819.

63. Whittmann C., Zeng A., Deckwer W. (1995). Growth inhibition by ammonia and use of pH-controlled feeding strategy for the effective cultivation of *Mycobacterium chlorophenolicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* (44): 519-525.
64. Widdel F., Pfennig N. (1981). Studies in Dissimilatory Sulfate-reducing Bacteria that Decomposed Fatty Acids. *Arch Microbiol* 129: 395-400.
65. Wrage N., Velthof G., Beusichem M., Oenema O. (2001). Rol of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide. *Soil Biology & Biochemistry* 33: 1723-1732.
66. Zeeman G., Wiegant W., Koster-Treffers M., Lettinga G. (1985). The influence of the total ammonia concentration on the thermophilic digestion of cow manure. *Agricultural Wastes* 14: 19-35.