



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

AREA ACADÉMICA DE BIOLOGÍA

Efecto del *m*-cresol en el proceso de la nitrificación

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN BIOLOGÍA**

PRESENTA:

ELIZABETH GONZÁLEZ ALVAREZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. ALEJANDRO ZEPEDA PEDREGUERA

Mineral de la Reforma, Hgo., 2009.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE GENERAL	II
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ÍNDICE DE TABLAS	IV
RESUMEN	V
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	2
2.1 Eliminación biológica de compuestos nitrogenados.....	5
2.1.1 Desnitrificación.....	5
2.1.2 Nitrificación.....	6
2.2. Oxidación de compuestos fenólicos.....	9
2.2.1 Fuentes de contaminación de los compuestos fenólicos.....	9
2.2.2 Degradación de compuestos fenólicos.....	11
2.3 Reactor de Lotes Secuenciados	14
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	15
3.1 Planteamiento del problema.....	15
3.2 Justificación.....	15
4. OBJETIVOS	16
4.1 Objetivo general.....	16
4.2 Objetivos particulares.....	16
5. MATERIALES Y MÉTODOS	17
5.1 Fuente de inóculo.....	17
5.2 Reactor de lotes secuenciados nitrificante.....	17
5.2.1. Composición del medio de cultivo.....	17
5.2.2. Operación del reactor de lotes secuenciados nitrificante.....	18
5.3 Métodos analíticos.....	19
5.3.1 Determinación de la concentración de amonio	19
5.3.2 Determinación de la concentración de nitrito y nitrato en HPLC	20
5.3.3 Determinación de la concentración de proteína de biomasa..	20

5.3.4 Determinación de la concentración de C- <i>m</i> -cresol.....	21
5.4 Pruebas abióticas de C- <i>m</i> -cresol.....	21
6. RESULTADOS	22
6.1 Curvas de calibración	22
6.2 Reactor continuo: fuente de inóculo.....	24
6.3 Cinética nitrificante control del proceso de lotes secuenciados.	25
6.4 Cinética nitrificante en el proceso de lotes secuenciados nitrificante en presencia de C- <i>m</i> -cresol.....	26
6.4.1 Concentración 12.5 mg C- <i>m</i> -cresol/L.....	27
6.4.2 Variables de respuesta del proceso nitrificante.....	29
6.4.3 Comportamiento del C- <i>m</i> -cresol en el proceso nitrificante.....	30
7. DISCUSIÓN	32
8. CONCLUSIONES	35
9. LITERATURA CITADA	36
ANEXO I	47

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Funcionamiento del SBR.....	14
Figura 2. Montaje experimental del SBR nitrificante.....	18
Figura 3. Curva de calibración de N-NH ₄ ⁺	22
Figura 4. Curva de calibración de N-NO ₂ ⁻	23
Figura 5. Curva de calibración N-NO ₃ ⁻	23
Figura 6. Curva de calibración de proteína de biomasa.....	24
Figura 7. Perfiles del funcionamiento del reactor en continuo en estado estacionario estable.....	25
Figura 8. Perfiles de N-NH ₄ ⁺ , N-NO ₃ ⁻ y N-NO ₂ ⁻ del control nitrificante en modo SBR.....	26
Figura 9. Perfil nitrificante en presencia de 12.5 mg C- <i>m</i> -cresol/L.....	29

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Características de los compuestos cresílicos.....	11
Tabla 2. Oxidación de compuestos orgánicos a través de la AMO, en condiciones nitrificantes, utilizando a <i>Nitrosomonas europaea</i> como fuente de inóculo.....	12
Tabla 3. Porcentajes de inhibición en el proceso de la nitrificación en presencia de compuestos fenólicos.....	13
Tabla 4. Eficiencias y rendimientos de las cinéticas realizadas con diferentes concentraciones de C- <i>m</i> -cresol.....	29

RESUMEN

La nitrificación es la oxidación de amonio a nitrito y posteriormente a nitrato por bacterias litoautótrofas amonio y nitritoxidantes sensibles a materia orgánica.

La nitrificación ha sido escasamente estudiada en presencia de compuestos como el *m*-cresol y en sistemas dinámicos como el SBR (Sequencing Batch Reactor). En este estudio se evaluó la tolerancia de un cultivo nitrificante obtenido en un SBR al *m*-cresol y la capacidad del lodo para consumirlo.

Un reactor SBR fue inoculado con un lodo nitrificante y alimentado automáticamente con una velocidad de carga de 50 mg N-NH₄⁺ con dos ciclos de 12 hrs al día y periodos de llenado (15 min de alimentación, agitación a 300 rpm y aireación), reacción (11 hrs incluyendo 14 min de la fase de llenado), sedimentación (30 min) y vaciado (1 min).

La eficiencia del control fue de 97.7% y el rendimiento fue de 0.907. Posteriormente se adicionaron 33 ml/min de C-*m*-cresol durante 15 minutos a velocidades de carga iniciales de 12.5 a 150 mg C-*m*-cresol/L.

Durante la adición de la primera velocidad de carga del compuesto fenólico, la eficiencia disminuyó a 88.37%, mientras que el rendimiento no se vio afectado. El C-*m*-cresol disminuyó las velocidades específicas de consumo de amonio (89 a 28%) y la oxidación de nitrito (82 a 4 %). Después de 6 meses de operación en SBR, las velocidades específicas de consumo de N-NH₄⁺ y de formación de N-NO₃⁻ fueron de 0.101 g N-NH₄⁺/g proteína L y 0.07 g N-NO₃⁻/g proteína L de proteína microbiana/h respectivamente. La oxidación del C-*m*-cresol y la concentración de la biomasa aumentaron mientras que la inhibición de la nitrificación disminuyó con el número de ciclos. El SBR permitió la adaptación metabólica de los microorganismos oxidantes del C-*m*-cresol, por el incremento de las velocidades específicas en la eliminación del compuesto, incremento de ciclos y disminución en la inhibición nitrificante.

"El principio de la ciencia, casi la definición, es el siguiente: La prueba de todo conocimiento es el experimento. El experimento es el único juez de la "verdad" científica".

(Richard P. Feynman)

DEDICATORIA

A MIS PAPÁS

A ti Mami (†) por ser la luz que me ha guiado en todo momento, por el apoyo incondicional que me brindaste, pero sobretodo por hacer de mí una persona íntegra.

A ti Papá por enseñarme valores tan importantes como la responsabilidad y el esfuerzo; por brindarme todo tu apoyo en el sentido estricto de la palabra.

A MI HERMANA

Guada

Por estar siempre pendiente de lo que me sucede y por ese inmenso cariño que me demuestras en todo momento, por tu cuidado y tu valioso apoyo para la culminación de este trabajo.

A MIS HERMANOS

Quique, Deme, Paco y Dani

Por su apoyo tanto económico como moral, por ser mi ejemplo a seguir y mi orgullo constante.

AGRADECIMIENTOS

A los catedráticos y administrativos de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo por ofrecerme las herramientas necesarias en el campo de la Biología y por las facilidades otorgadas durante la actividad de movilidad estudiantil, la cual permitió ampliar mis horizontes.

A la Universidad Politécnica de Pachuca (UPP) por permitirme utilizar sus instalaciones durante un año para el desarrollo de este proyecto, un agradecimiento especial a los profesores de dicha institución por el tiempo disponible para aclarar cualquier duda.

A mi director de tesis el Dr. Alejandro Zepeda Pedreguera profesor de la UPP por permitirme participar en su proyecto de tesis y ofrecerme su apoyo para la culminación de este trabajo.

A mis sinodales (Dr. Francisco Prieto García, Dra. Rosa Icela Beltrán Hernández, Dra. Claudia Coronel Olivares, Dr. Alejandro Zepeda Pedreguera, Dr. Rafael Germán Campos Montiel, Dra. Ana Laura López Escamilla y Dra. Gabriela Alejandra Vázquez Rodríguez) por los comentarios que han hecho atinadamente para la complementación, mejoramiento y culminación de este trabajo, demostrando en todo momento la experiencia en el tema y el compromiso con su trabajo.

Al coordinador adjunto de la Licenciatura en Biología el M en C. Ulises Iturbe Acosta por tener un espacio en su agenda para la aclaración de cualquier duda a lo largo de nuestra estancia en la Universidad.

Al proyecto Ciencia Básica con número de proyecto 61787 y proyecto PROMEP con clave PROMEP/UPPACH-PTC-028 por la beca otorgada.

GRACIAS...

A DIOS por darme la sabiduría para enfrentar cualquier cambio en mi vida y sobretodo por colocarme siempre en el lugar correcto.

A MIS PAPÁS (Sabina y Enrique) y HERMANOS (Enrique, Deme, Paco, Dani y Guadalupe) por ser el centro de mi vida, por su PACIENCIA, por apoyarme a pesar de que las circunstancias no fueran las mejores y por la confianza que han tenido en mi.

A Gabi y a Kikos por su cariño y por estar conmigo en momentos difíciles.

A MIS AMIGAS

A la persona que más allá de tener un parentesco conmigo, es mi amiga, a ti Guada gracias por confiar en mí, por protegerme, tolerarme y dejarme ser tu amiga.

A Christian por brindarme tu sincera amistad durante gran parte de la carrera, compartiendo tantos momentos que permanecerán como gratos recuerdos, desde una tarea hasta una larga plática pero en especial, por que se que cuento contigo.

A ti chica Irma por brindarme tu amistad, tu sinceridad y sobretodo por darme la oportunidad de ser tu amiga.

A "Princesita" por ese corazón de perlas que tienes, por tu manera de ver las cosas y el entusiasmo que reflejas.

A todas ustedes por saber escucharme y también aconsejarme, las QUIERO MUCHO CHICAS !!!

A MIS COMPAÑEROS DE LABORATORIO

Por hacer que mi estancia en la UPP fuera menos difícil.

1. INTRODUCCIÓN

El consumo de agua es un recurso vital para la población ya que de ella depende el desarrollo de actividades indispensables tales como agrícola, industrial y urbana. En nuestro país las condiciones actuales de desarrollo urbano han ocasionado la disminución en la calidad de este recurso, lo que implica un alto porcentaje de aguas contaminadas en el territorio nacional, condiciones que han ido empeorando en las últimas décadas debido al mínimo porcentaje de tratamiento de aguas residuales.

La contaminación del agua se debe principalmente a las descargas desmedidas de efluentes sin previo tratamiento en donde los contaminantes más comunes son los compuestos que contienen carbono, fósforo y nitrógeno.

Los compuestos nitrogenados tales como el amonio, nitrito y nitrato se encuentran en la naturaleza; para llevar a cabo su eliminación de las aguas residuales existen diversos entre los cuales se encuentran tanto tratamientos fisicoquímicos como biológicos.

La nitrificación es la primera etapa del tratamiento biológico que se lleva a cabo por bacterias nitrificantes, dicho proceso es inhibido por múltiples factores, entre ellos la presencia de compuestos orgánicos (hidrocarburos saturados, insaturados y aromáticos), mismos que son encontrados en efluentes de industrias, tales como del petróleo y refinerías; sin embargo existe escasa información del efecto que puede provocar la presencia de compuestos fenólicos tales como el fenol, *orto*-, *meta*- y *para*-cresol (*o*, *m* y *p*-cresol).

Recientes estudios han demostrado que la nitrificación es un proceso eficaz para la eliminación simultánea de compuestos nitrogenados y carbonados, por lo anterior se han diseñado una gran cantidad de tecnologías tales como el reactor SBR (por sus siglas en inglés Sequencing Batch Reactor) para aumentar la eficacia en el proceso.

Debido a las múltiples fuentes contaminantes y a la escasa información de estudios cinéticos en presencia de *m*-cresol en el presente trabajo se evaluará el efecto del *m*-cresol en el proceso de la nitrificación, considerando diferentes variables de respuesta como eficiencia (E), rendimiento ($Y_{p/s}$), velocidades específicas de consumo (q_s) y velocidades específicas de formación de producto (q_p).

2. MARCO TEÓRICO

Actualmente en México, se tiene un promedio nacional de consumo de agua de 0.25 m³/d por habitante, siendo tratada únicamente el 20% del agua residual urbana producida y 12% de la industrial (Monroy y *col.*, 2000). Dentro de los contaminantes más importantes en las aguas residuales urbanas e industriales, se encuentran los compuestos nitrogenados y carbonados. Los compuestos nitrogenados existen en muchas formas, debido al número de estados de oxidación que puede presentar el nitrógeno, siendo el amoníaco (NH₃) la forma más reducida y el nitrato (NO₃⁻) la más oxidada. El nitrógeno amoniacal (N-NH₄⁺) es la forma que se encuentra principalmente en el ambiente y estrechamente asociado con las plantas, los animales y el agua residual urbana. El nitrógeno total (suma de todas las formas nitrogenadas) se ha detectado por encima de los límites máximos permisibles en cuerpos receptores de agua de acuerdo con la Agencia de Protección del Ambiente de los Estados Unidos [US Environmental Protection Agency (U.S. EPA, 2001) 10 mg N_{total}/L] y la Norma Oficial Mexicana (NOM-001-SEMARNAT-1996) (10-14 mg N_{total}/L), provocando problemas de eutrofización y toxicidad sobre los organismos acuáticos (Churchwell y *col.*, 1980; Barnes y Bliss, 1983; Moat y Foster, 1988; Prosser, 1989; Metcalf y Eddy, 1996a). Para evitar estos problemas, la eliminación de los compuestos nitrogenados de las aguas residuales puede llevarse a cabo a través de procesos de tratamiento de tipo fisicoquímico o biológico. Los procesos fisicoquímicos presentan una eficiencia de eliminación de nitrógeno cercana al 100%, sin embargo pueden ser costosos debido al elevado consumo de energía y los gastos de operación. Otra desventaja de los procesos fisicoquímicos es que el problema de contaminación no se resuelve realmente, ya que en algunos casos el contaminante únicamente es trasladado de un sitio a otro (Halling-Sorensen y Jorgensen, 1993; Gauntlet, 1981). Los procesos de tratamiento de tipo biológico presentan las ventajas de ser de bajo costo, pueden ser muy eficientes para tratar efluentes con relativa baja concentración de contaminantes y son procesos amigables con el ambiente.

La eliminación biológica de compuestos nitrogenados de las aguas residuales generalmente se lleva a cabo a través de dos etapas, una aerobia y otra anaerobia, conocidas como la nitrificación y la desnitrificación, respectivamente. El proceso de

nitrificación es la primera etapa del tratamiento biológico de los compuestos nitrogenados, en donde el amonio es oxidado hasta nitrato formando nitrito como producto intermediario. Este proceso es inhibido por múltiples factores, entre ellos la presencia de compuestos orgánicos, (hidrocarburos saturados, insaturados y aromáticos) (U.S. EPA, 1980), mismos que son encontrados en efluentes de industrias, tales como petroleras y refinerías. Por otra parte, la desnitrificación es un proceso respiratorio anóxico llevado a cabo generalmente por microorganismos que emplean al nitrato como aceptor de electrones y a la materia orgánica como donador de electrones. El proceso desnitrificante consiste en la reducción de nitrato a nitrógeno molecular (N_2) acoplada a la oxidación de la materia orgánica (o inorgánica, como el sulfuro) a CO_2 (o sulfato).

En lo que respecta a los compuestos carbonados, la presencia de ellos en las aguas residuales es muy diversa y depende esencialmente del proceso industrial que los generó. Por ejemplo las industrias químicas y de la refinería del petróleo, cuentan con una gran participación en la descarga de estos compuestos, tales como compuestos alifáticos, aromáticos y organohalogenados, considerados como los contaminantes más frecuentes. Estos compuestos son altamente tóxicos y pueden llegar a ser cancerígenos, aunque todavía faltan más evidencias. Un ejemplo de estos contaminantes son los compuestos fenólicos (fenol, *o*-, *m*- y *p*-cresol), los cuales se encuentran presentes en el agua residual de la industria petroquímica y química, además de ser contaminantes de suelo y agua subterránea, debido a los derrames accidentales de petróleo provocando efectos sobre la salud de los seres humanos (Yamagishi y col., 2001; Texier y Gomez, 2002; Liu y col., 2004). Por tal motivo, la biodegradación de compuestos fenólicos ha sido ampliamente estudiada bajo condiciones heterotróficas en donde se han estudiado una gran diversidad de aceptores de electrones para llevar a cabo la transformación, consumo y/o mineralización del compuesto aromático, proporcionando valores de gran importancia para el tratamiento de las aguas residuales, tales como la eficiencia, rendimiento, velocidades específicas, etc. (Amor y col., 2005). Sin embargo, actualmente es escasa la información sobre el conocimiento del efecto toxicológico e inhibitorio de los compuestos fenólicos sobre los microorganismos quimiolitotróficos, tales como las bacterias nitrificantes. De esta

manera, dado que el tratamiento biológico de aguas por nitrificación es ampliamente utilizado, es necesario tener más información del efecto inhibitorio de los compuestos fenólicos sobre el proceso nitrificante. Además, es importante mencionar que en los pocos estudios realizados del efecto de los compuestos fenólicos sobre la nitrificación, se emplearon esencialmente cultivos axénicos, particularmente a *Nitrosomonas europea*, proporcionando información sobre la primera etapa de la nitrificación, es decir, la oxidación de amonio a nitrito. En estos estudios, se evidenció la oxidación del fenol y *p*-cresol por la enzima amonio monooxigenasa (AMO), provocando la acumulación en el cultivo de intermediarios que conservaron aún el anillo aromático intacto (Stafford, 1974; Hyman y col., 1985; Keener y Arp, 1994). En este sentido, la diversidad de las bacterias que están presentes en consorcios microbianos, utilizados en sistemas de tratamiento de aguas residuales, ha sido omitida, dejando a un lado las interacciones que podrían existir entre los diferentes microorganismos de un consorcio nitrificante. Conviene añadir que no se han reportado en la literatura datos cinéticos, como las velocidades específicas de consumo de amonio y producción de nitrito y nitrato, variables de respuesta indispensables para entender mejor los mecanismos de inhibición del proceso nitrificante por la presencia de los compuestos fenólicos, lo cual podrá contribuir al diseño de un sistema de tratamiento de aguas residuales contaminados con amonio y compuestos fenólicos. Adicionalmente a esta información, también se ha observado que el proceso nitrificante ha mostrado un bajo rendimiento microbiano debido a limitaciones cinéticas intrínsecas del proceso respiratorio, observándose una baja producción de lodo y una sensibilidad del proceso a la presencia de materia orgánica, debido a esta problemática se han diseñado y desarrollado sistemas de reacción que permiten la acumulación de la biomasa tales como el filtro percolador, air-lift, lecho fluidificado, lotes secuenciados (SBR por sus siglas en inglés), etc. En este contexto el SBR, es un proceso caracterizado por la secuencia de cultivos en lote, incorporando ventajas como la reducción de los volúmenes de instalación, actividad biológica estable, acumulación de la biomasa y alta eficiencia de eliminación de DQO (demanda química de oxígeno) y nitrógeno. Además, el SBR es conocido como uno de los procesos más eficientes en cuanto a costo y a eliminación de contaminantes orgánicos tóxicos ó inhibitorios en aguas domésticas e industriales (Irvine y col., 1997).

De esta manera, en base a dicha información se propuso en el presente trabajo contribuir y enriquecer la información sobre este tema, enfocándose principalmente al estudio fisiológico de la nitrificación en presencia de *m*-cresol y al estudio metabólico y cinético de este compuesto en cultivos nitrificantes, utilizando un SBR. Por consiguiente, la importancia de este estudio recae en el entendimiento del proceso respiratorio de las bacterias amonio y nitrito-oxidantes en presencia *m*-cresol, así como la generación de información novedosa para una mejor comprensión de los mecanismos involucrados en el proceso respiratorio nitrificante. Por lo tanto, el propósito general de este estudio es evaluar en un SBR, el efecto inhibitorio ó tóxico y el comportamiento del *m*-cresol sobre un consorcio nitrificante producido en un reactor en continuo en estado estacionario-estable.

2.1 Eliminación biológica de compuestos nitrogenados

Con el propósito de encontrar un proceso biológico para la eliminación de compuestos nitrogenados, con mayor rendimiento, eficiencia y menor costo de operación, se han desarrollado nuevas propuestas de tratamiento biológico, tales como la alta conversión de amonio a nitrito en un solo reactor (proceso SHARON: single reactor system for high activity ammonia removal over nitrite, la oxidación anaerobia de amonio proceso ANAMMOX: anaerobic ammonium oxidation y la eliminación de amonio completamente autotrófica proceso CANON: completely autotrophic nitrogen removal over nitrite; OLAND: oxygen-limited autotrophic nitrification/denitrification) (Bock y col., 1995; Muller y col., 1995; Surmacz-Górska y col., 1997; Van Loosdrecht y Jetten, 1998; Sliekers y col., 2002; Pollice y col., 2002). Sin embargo, la eliminación biológica de los compuestos nitrogenados de efluentes se lleva a cabo principalmente a través de la desnitrificación y de la nitrificación.

2.1.1 Desnitrificación

La desnitrificación es un proceso respiratorio anóxico donde se lleva a cabo la reducción de nitrato hasta nitrógeno molecular (N₂). En la ruta metabólica, el nitrato puede ser utilizado por los microorganismos como aceptor de electrones, proceso mediante el cual se obtiene energía al ser reducido hasta N₂ (Shoun y Tanimoto, 1991; Zumft, 1997). Las bacterias desnitrificantes son de respiración facultativa y en

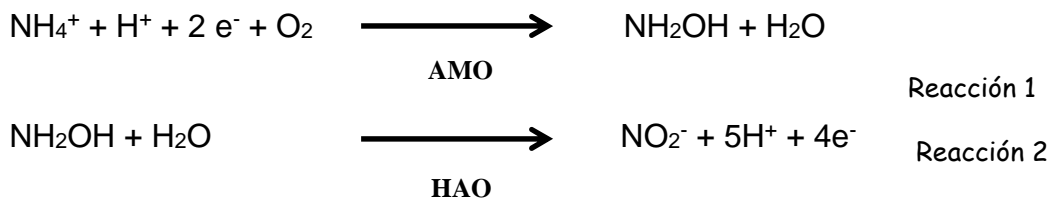
condiciones anóxicas reducen al NO_3^- a N_2 . El uso del nitrato como aceptor de electrones para formar nitrógeno gaseoso es también conocido como reducción desasimilativa de nitrato. Dado el carácter respiratorio del proceso desnitrificante, es necesaria la presencia de un sustrato oxidable que suministre energía y que pueden ser de dos tipos, orgánico e inorgánico, por lo que la desnitrificación puede ser un proceso organotrófico o litoautotrófico utilizando comúnmente a los géneros desnitrificantes *Alcaligenes*, *Aerobacter*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Thiobacillus*, *Thiosphaera* y algunos hongos como *Neurospora* y *Fusarium* (Cervantes y col., 2000; Metcalf y Eddy, 1996b), el primer paso de la ruta metabólica de la desnitrificación es la reducción de nitrato (NO_3^-) a nitrito (NO_2^-), catalizado por la enzima nitrato reductasa (Stouthamer, 1976; Kroneck y col., 1992). El segundo paso es la reducción de NO_2^- a óxido nítrico (NO) por medio de la enzima nitrito reductasa (Jetten y col., 1999). Posteriormente, se lleva a cabo la reducción de NO a óxido nitroso (N_2O), a través de la enzima óxido nítrico reductasa (Goretski y Hollocher, 1990). Por último, se lleva a cabo la reducción de N_2O a N_2 a través de la enzima óxido nitroso reductasa (Coyle y col., 1985; Andrew y col., 1994). El proceso desnitrificante con fines prácticos es empleado para eliminar materia orgánica y nitrato de aguas residuales, obteniendo como productos finales al CO_2 y N_2 .

2.1.2 Nitrificación

La nitrificación es la oxidación biológica de amonio a nitrato vía nitrito, catalizada principalmente por las bacterias de la familia Nitrobacteriaceae. Esta oxidación ha sido representada principalmente por los géneros *Nitrosomonas* (amonio-oxidantes) y *Nitrobacter* (nitrito-oxidantes). Los microorganismos nitrificantes son quimiolitautótrofos Gram negativos y frecuentemente tienden a la formación de flóculos (Prosser, 1989; Gómez y col., 1995). El proceso respiratorio nitrificante se realiza mediante dos etapas: 1) oxidación de amoníaco a nitrito (bacterias amonio-oxidantes) y 2) oxidación de nitrito a nitrato (bacterias nitrito-oxidantes). Hasta el momento no se han encontrado evidencias de que un único microorganismo sea capaz de oxidar directamente el amonio a nitrato (Prosser, 1989; Tijhuis y col., 1995).

La primera etapa de oxidación del amoníaco durante la nitrificación es llevada a cabo por las bacterias amonio oxidantes las cuales oxidan el amoníaco a hidroxilamina a través de una reacción catalizada por la enzima amonio monooxigenasa (AMO). Posteriormente se lleva a cabo una segunda reacción en donde se lleva a cabo la oxidación de la hidroxilamina a nitrito, la cual es catalizada por la enzima hidroxilamina oxido reductasa (HAO) (Reacción 1, Reacción 2).

Las bacterias que llevan a cabo esta reacción son del género *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosospira*, *Nitrosolobus* y *Nitrosovibrio* principalmente.



Durante esta primera etapa ocurre el mayor consumo de oxígeno el cual varía dentro de los valores de concentración de 4.33 a 4.57 mg O₂/ mg N-NH₄⁺ (Cervantes y col., 2000; Cortacans, 2000). Además, es conocido que durante la oxidación de hidroxilamina se liberan 4 e⁻, de los cuales dos regresan a la formación de hidroxilamina o a la formación de biomasa (Keener y Arp, 1994) y los dos electrones restantes son utilizados para llevar a cabo la fijación de CO₂, lo cual podría explicar el escaso crecimiento de las bacterias nitrificantes (Cervantes y col., 2000).

La segunda etapa de la nitrificación es la oxidación de nitrito a nitrato, la cual es realizada por las bacterias nitrito oxidantes, frecuentemente representadas por el género *Nitrobacter* y *Nitrosospira*. Esta etapa de oxidación es llevada a cabo a través de la enzima nitrito oxido reductasa (NOR), tal y como se muestra en la reacción 3.



De esta manera la reacción global de la nitrificación se presenta en la reacción 4, en la cual se observa el NO₃⁻ como producto final



Dentro de la diversidad de estudios realizados sobre la nitrificación, se ha observado que la presencia de materia orgánica, NH_4^+ , NO_2^- , la concentración de oxígeno disuelto, pH, temperatura, etc., pueden afectar el proceso respiratorio y el crecimiento microbiano nitrificante (Randall y col., 1992; García y Fernández-Polanco, 1996; Teira, 1996; Anthoinsen y col., 1976; Zepeda y col., 2007).

En este sentido, se ha observado que cuando existe una disminución en la concentración de oxígeno, la hidroxilamina puede transformarse en óxidos de nitrógeno. Además, cuando el oxígeno se encuentra en concentraciones elevadas puede inhibir la actividad nitrificante e inducir a la formación de polifosfatos (Prosser, 1989). En lo que respecta al efecto del valor de pH, se ha observado que a valores de pH ácidos, la proporción de ión amonio incrementa, disminuyendo de esta manera las velocidades de consumo del sustrato, debido a que el sustrato ideal del proceso nitrificante es el amoniaco y no el ión amonio (Susuki y col., 1974; McCarty, 1999; Cervantes y col., 2000).

Por otro lado, debido a que las bacterias nitrificantes son mesófilas (30°C), se ha observado que la variación de la temperatura puede afectar a los valores de las constantes ácido-base, solubilidad de las sustancias, los coeficientes de difusión y la actividad enzimática de las bacterias nitrificantes (Garrido y col., 1997).

En lo que respecta al efecto inhibitorio ó tóxico del proceso nitrificante debido a la presencia de materia orgánica, existen evidencias de que la actividad de las bacterias amonio oxidantes es generalmente más afectada por la presencia de materia orgánica, que la de las nitrito-oxidantes (Tomlinson y col., 1976; Hyman y Wood, 1983; Hyman y col., 1985; Keener y Arp, 1994, McCarty, 1999; Zepeda y col., 2003). Asimismo, se ha observado que la gran mayoría de los estudios se han realizado utilizando cultivos axénicos principalmente con *Nitrosomonas europaea*, los cuales presentan información relevante a través del porcentaje de disminución de la eficiencia de oxidación del amoniaco en presencia de materia orgánica, sin embargo esta información no se acompaña de: a) el rendimiento de producción en nitrito (mg N-NO_2^- formado/ mg N-NH_4^+ oxidado), b) el balance de materia del nitrógeno en el proceso nitrificante, c) las velocidades específicas de consumo de amonio y de producción de nitrito, d) las velocidades específicas de oxidación del compuesto orgánico. Además que en los

cultivos axénicos, no es posible considerar las interacciones que se pueden establecer entre las bacterias amonio y nitrito oxidantes en consorcios nitrificantes. Asimismo, a partir de los datos de la literatura es difícil establecer una concentración máxima del compuesto orgánico tolerable para las bacterias nitrificantes. Esto se debe a que las concentraciones inhibitorias dependen de múltiples factores tales como: estructura química del compuesto orgánico, concentración, tipo e historial del inóculo, diseño del reactor e hidráulica del sistema, presencia individual o en mezcla del compuesto orgánico (Anthonisen, 1976; Zepeda y col., 2003). Puede verse que el control de la concentración de la materia orgánica disuelta, en el proceso nitrificante, es un factor que debe tomarse en cuenta. De esta manera, sería de suma importancia la elaboración de trabajos donde se estudie el efecto inhibitorio ó toxico de compuestos orgánicos sobre el proceso nitrificante en donde se utilicen consorcios nitrificantes como fuente de inóculo.

2.2 Oxidación de compuestos fenólicos

2.2.1 Fuentes de contaminación por compuestos fenólicos

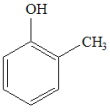
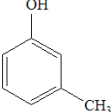
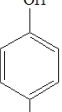
Las industrias químicas y de la refinería del petróleo son de las principales fuentes de contaminación por hidrocarburos de acuerdo con el Programa Internacional en Seguridad Química [International Programme Chemical Safety (IPCS, 1995)]. Dentro de ellos, se encuentran los compuestos fenólicos tales como el fenol, *o*-, *m*- y *p*-cresol (U.S. EPA, 1980). Dichos compuestos están ampliamente distribuidos en la naturaleza y son liberados al ambiente por la combustión de madera, carbón y combustibles fósiles, otra fuente importante de contaminación es causada por derrames accidentales de petróleo provocando contaminación de los mantos freáticos y efectos sobre la salud de los seres humanos (Yamagishi y col., 2001, Texier y Gomez, 2002; Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades [Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR, 2003)]; Liu y col., 2004); se ha observado que la contaminación de aguas subterráneas por compuestos fenólicos en los que se encuentra el *m*-cresol, es difícil de remediar debido a que estos compuestos son relativamente solubles en agua y pueden difundirse rápidamente una vez introducidos en el acuífero. Por otro lado, se ha observado que todos los cresoles son absorbidos

por el aparato respiratorio y por el tracto gastrointestinal y al contacto con la piel se distribuyen en todo el cuerpo (Bray y *col.*, 1950; IPCS, 1995). En este sentido se han realizado diversos estudios con ciertos organismos para evaluar el efecto de compuestos fenólicos tales como el *m*-cresol. Un ejemplo de estos estudios fue realizado con ratones, en donde se estudió la exposición de diferentes concentraciones del *m*-cresol a una relación de 242 mg de *m*-cresol/Kg, en donde los ratones presentaron una hipoactividad, convulsiones, salivación, inflamación en el aparato digestivo, hiperemia en pulmones, riñones e hígado. También se han realizado estudios en donde la contaminación de aguas superficiales por compuestos cresílicos ocasiona serios problemas sobre la salud de algunos organismos acuáticos, tal como lo muestra el caso de sensibilidad en larvas de trucha a una exposición máxima de 6 mg/L durante 24 hrs (U. S. EPA, 1997; Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer [The International Agency for Research on Cancer (IARC, 1987)]; ATSDR, 1997 y U.S. EPA, 1998a).

La U.S. EPA ha determinado que los cresoles son posiblemente agentes carcinogénicos en seres humanos, por lo cual están clasificadas dentro de la categoría de sustancias químicas, sin embargo, no hay información adecuada para evaluar su posible carcinogenicidad (ATSDR, 2003).

A través de la información proporcionada en la Tabla 1 puede observarse que los compuestos cresílicos son solubles en agua. El coeficiente de partición octanol/agua ($\log P_{O/W} = 2$) muestra que los cresoles presentan una mayor solubilidad en solventes no polares, es decir, son hidrofóbicos, lo que puede influir de modo significativo en su transporte en los sistemas biológicos (Sikkema y *col.*, 1995; Denich y *col.*, 2003).

Tabla 1. Características de los compuestos cresílicos

Fórmula empírica:	C ₇ H ₈ O		
Masa molecular relativa:	108,14 g/mol		
Densidad:	1,03 g/cm ³		
Densidad relativa del gas:	3,74		
Estructura química	 <i>o-cresol</i>	 <i>m-cresol</i>	 <i>p-cresol</i>
Punto de ebullición:	203°C	191°C	202°C
Punto de fusión:	35°C	31°C	11°C
Punto de inflamación:	86°C	81°C	86°C
Temperatura de ignición:	560°C	555°C	555°C
Solubilidad (gr/100 gr de H ₂ O)	2.3	2.5	2.6
Solvólisis:	2%	2%	2% (en agua)
Factores de conversión:	1 ppm = 4,49 mg / m ³		
	1 mg/m ³ = 0.22 ppm		

(Tabla modificada de Catálogo de Estándares Ambientales, 1996).

2.2.2 Biodegradación de los compuestos fenólicos

Debido a la importancia de eliminar los compuestos fenólicos del ambiente, se han llevado a cabo trabajos diversos para su eliminación biológica, de forma individual y en mezcla. En la mayoría de los estudios, se emplearon cultivos axénicos heterotróficos, utilizando diferentes aceptores de electrones como el oxígeno, nitrato, sulfato, Fe (III), Mn (II), Mn (IV), quinonas, humus y CO₂ (Grbić-Galić y Vogel, 1987; Yadav y Reddy, 1993; Collins y Daugulis, 1999; Heider y col., 1999; Cervantes y col., 2000). Estos estudios han proporcionado valores de gran importancia para el tratamiento de las aguas residuales, tales como la eficiencia, rendimiento, velocidades específicas, etc. Amor y col., 2005). Sin embargo, a pesar de la considerable información existente sobre la biodegradación de los compuestos fenólicos por microorganismos heterotróficos en condiciones aerobias y anaerobias, aún hace falta información de tipo cinético para entender mejor cada uno de estos procesos, así como estudios de la oxidación de los compuestos fenólicos con consorcios microbianos. Además, también se ha observado que sobre la biodegradación en autotrofia de los compuestos fenólicos, los estudios realizados son escasos, provocando incertidumbre sobre su efecto y transformación en

cultivos autotróficos. No obstante, que la actividad de los microorganismos nitrificantes puede ser inhibida por la presencia de materia orgánica, también se ha mostrado la capacidad de estas bacterias a biotransformar compuestos orgánicos, entre los cuales se encuentran el *p*-cresol y fenol. En la Tabla 2 se muestran algunos ejemplos de los compuestos orgánicos que han sido reportados como oxidados por la enzima amoniomonooxigenasa (AMO), presente en *Nitrosomonas europaea*.

Tabla 2. Oxidación de compuestos orgánicos a través de la AMO, en condiciones nitrificantes, utilizando a *Nitrosomonas europaea* como fuente de inóculo.

Compuesto orgánico	Producto mayoritario	Referencia
Metano	Metanol	Hyman y Wood, 1983
Etileno	Oxido de etileno	Hyman y Wood, 1984
Metanol	Formaldehído	Voysey y Wood, 1987
Monóxido de carbono	Dióxido de carbono	Tsang y Suzuki, 1982
Metil fluoruro y dimetil éter	Formaldehído y metanol-formaldehído	Hyman y col., 1994
Alcanos (hasta C ₈)	Alcoholes	Hyman y col., 1988
Alquenos (hasta C ₅)	Epóxidos y alcoholes	Hyman y col., 1988
<i>Trans</i> -2-buteno	2-buteno-1-ol	Vannelli y col., 1990
Metil sulfuro	Metil sulfóxido	Juliette y col., 1993
Iodoetano	Acetaldehído	Rasche y col., 1990a
Fluorometano	Formaldehído	Rasche y col., 1990a
Bromoetano	Acetaldehído	Rasche y col., 1990b
Clorometano	Formaldehído	Rasche y col., 1990b
Benceno	Fenol	Keener y Arp, 1994
Tolueno	Alcohol bencílico y benzaldehído	"
Etilbenceno	Fenil alcohol	"
<i>p</i>-cresol	No identificado	Texier y Gomez, 2007
naftaleno	2-naftol	Chang y col., 2002
Estireno	Fenilglioxal	Keener y Arp, 1994
Clorobenceno	4-Clorofenol	"
Anilina	Nitrobenceno	"
Nitrobenceno	3-Nitrofenol	"
Acetofenona	2-Hidroxiacetofenona	"
Alcohol bencílico	Benzaldehído	Keener y Arp, 1994
Fenol	Hidroquinona	Hyman y col., 1985
Nitrapirina (aerobio)	6-Ácido cloropicolínico	Vannelli y Hooper, 1992
Nitrapirina (anaerobio)	2-cloro-6-diclorometil piridina	Vannelli y Hooper, 1993

(Tabla modificada de Zepeda, 2005)

En lo que respecta a los estudios realizados en nitrificación en presencia de compuestos fenólicos, Dyreborg y Arvin, 1995, reportaron concentraciones *pseudo-críticas* (concentración de un compuesto tóxico que se espera que inhiba la nitrificación al 100%) de una crosota compuesta de benceno, xileno, fenol y *o*-cresol, con valores de concentraciones de 10.7, 8.4, 1.3 y 1.3 mg/L, respectivamente. Por su parte, Texier y Gomez, 2002 reportaron que el *p*-cresol a concentraciones menores de 10 mg/L en forma de carbono no presentó ningún efecto adverso en la nitrificación en cultivos en lote; sin embargo a concentraciones de 17 mg/L de *C-p*-cresol se observó una inhibición del 70% en las velocidades de formación de nitrato.

Otro ejemplo del efecto de compuestos fenólicos sobre la nitrificación fue realizado por Liu y *col.*, 2004 sobre la influencia del fenol y el crecimiento de gránulos microbianos mediante el proceso de la nitrificación, en donde encontraron que la actividad nitrificante no fue afectada después de la degradación del fenol cuando las concentraciones iniciales no fueron mayores a 10 mg/L. Sin embargo, a concentraciones de 15 y 20 mg/L de fenol, la producción de nitrato disminuyó en un 23 y 33 %, respectivamente. Asimismo, el estudio de Quiang y *col.*, 2005 mostró que las bacterias encapsuladas en gránulos pueden tolerar concentraciones de 15 a 20 mg/L de fenol, obteniendo de un 77% y 67% de la formación de nitrato con respecto al control, respectivamente. En la Tabla 3 se muestra el porcentaje de inhibición de la nitrificación obtenido en presencia de diferentes compuestos fenólicos:

Tabla 3. Porcentajes de inhibición en el proceso de la nitrificación en presencia de compuestos fenólicos

Compuesto	Concentración (mg/L)	Inhibición en la formación de nitrito (%)	Inhibición de la formación de nitrato (%)	Inhibición en la oxidación de amonio (%)	Referencias
<i>o</i> -cresol	12.8	---	---	75	Tomlison y <i>col.</i> , 1966
Fenol	5.6	---	---	---	---
Fenol	5.6	---	---	75	Stafford, 1974
<i>o</i> -cresol	4.4	---	---	---	---
Fenol	5.0	---	---	75	Hockemburg y Grady, 1977
<i>o</i> -cresol	13.0	---	---	---	---
<i>o</i> -cresol	4.4	---	---	75	Richardson, 1985
Fenol	~ 4.7	90	---	---	Keener y Arp, 1994
Fenol	5.6	---	---	80	Dyereborg y Arvin, 1995
<i>o</i> -cresol	4.4	---	---	---	---
<i>p</i> -cresol	17.0	---	70	---	Texier y Gomez, 2002

Como puede observarse, a través de los escasos estudios realizados con compuestos fenólicos en la nitrificación, aún hace falta información sobre el efecto de compuestos tales como el *m*-cresol. Además es de suma importancia mencionar que la gran mayoría de estos trabajos han sido realizados con cultivos axénicos en particular con *Nitrosomonas europaea* (Tabla 2, obteniendo únicamente información sobre la primera etapa de la nitrificación (oxidación de amoniaco a nitrito), dejando a un lado el efecto de estos compuestos fenólicos sobre el proceso respiratorio nitrito-oxidante. De igual manera, también se ha dejado a un lado la posible interacción con otros microorganismos que puedan estar presentes en un consorcio nitrificante (Zepeda y *col.*, 2003, 2007). De esta manera, sería de gran relevancia la existencia de trabajos

que tomen en cuenta dicha interacción y de esta forma proporcionar información cinética de las dos etapas que involucran la nitrificación.

2.3 Reactor de lotes secuenciados (SBR)

Debido a que el tratamiento de aguas residuales es muy demandante y se requiere de un amplio conocimiento, se ha tenido que recurrir a la utilización de herramientas alternativas que nos permitan una mayor eficiencia de tratamiento y acumulación de biomasa. El reactor de lotes secuenciados (SBR) con respecto a otros procesos tiene ventajas significativas tales como los costos accesibles, eficiencia en la eliminación de la materia orgánica, además que dentro del mismo reactor se llevan a cabo tanto las reacciones biológicas y la separación de biomasa (ausencia de decantadores) (Irving y col., 1997; Texier y Gomez, 2004; Wilderer y col., 2002). Debido a estas características el SBR, se presenta como una alternativa para aquellos procesos biológicos que presentan una baja producción de biomasa, tal como la nitrificación.

Cada ciclo de SBR se lleva a cabo en cinco etapas (Figura 1):

Llenado: en esta fase el reactor es alimentado por un influente.

Reacción (agitación y aireación): el objetivo de estas etapas es que las reacciones iniciadas en la fase de llenado se completen.

Sedimentación: en esta fase el propósito es permitir que los sólidos se puedan separar de los líquidos, para obtener un sobrenadante clarificado denominado efluente.

Vaciado: en esta fase se extrae el efluente del reactor.

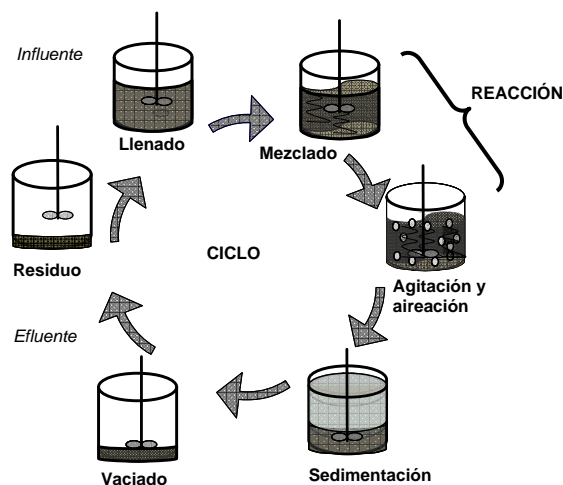


Figura 1. Funcionamiento del SBR

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

3.1 Planteamiento del problema

El nitrógeno amoniacal y los compuestos fenólicos provienen principalmente de efluentes petroquímicos, refinerías de petróleo y de productos de uso cotidiano, como desinfectantes, perfumes, agentes conservantes, herbicidas y productos de limpieza, entre otros. Es bien sabido que el ión amonio afecta aspectos fisiológicos de algunos organismos acuícolas y por otro lado se ha reportado que la oxidación del amonio y nitrito, son inhibidas por la presencia de compuestos orgánicos, tales como el fenol, *p*- y *o*- cresol, en donde se desconoce gran parte de la información cinética y metabólica del proceso nitrificante.

Debido a que es escasa la información sobre el estudio metabólico y cinético de la nitrificación en presencia de *m*-cresol en cultivos nitrificantes, en este trabajo se propone contribuir y enriquecer dicha información, para lo cual se cuantificarán las concentraciones de $N-NH_4^+$, $N-NO_3^-$, $N-NO_2^-$ y *C-m*-cresol, así como las velocidades específicas de consumo y velocidades específicas de formación de producto, por lo que la importancia de este estudio recae en el entendimiento del proceso metabólico de las bacterias amonio y nitrito-oxidantes que forman parte de un consorcio nitrificante aplicado a un sistema SBR en presencia del *m*-cresol.

3.2 Justificación

La contaminación con amonio y compuestos fenólicos, en este caso particular, el *m*-cresol hacen necesario un tratamiento previo a la descarga de los efluentes contaminados debido a los efectos tóxicos que genera.

Para que el tratamiento biológico de aguas residuales sea eficaz, deberá garantizar la eliminación de los compuestos inhibitorios y/o tóxicos en su proceso, es por ello que en este estudio se plantea evaluar el efecto que pudiera tener el *m*-cresol en la nitrificación utilizando un sistema SBR, analizando las diferentes variables de respuesta del proceso nitrificantes tales como la eficiencia ($E = \%$), rendimiento producto/sustrato ($Y_{p/s}$), velocidades específicas de consumo de amonio (q_s), velocidades específicas de formación de nitrato (q_p) y crecimiento microbiano.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

- Analizar y evaluar el efecto del *m*-cresol sobre un consorcio nitrificante presente en un reactor de lotes secuenciados.

4.2 Objetivos particulares

- Caracterizar fisiológicamente el proceso nitrificante en un sistema SBR en ausencia de *m*-cresol.
- Analizar el efecto de diferentes velocidades de carga de C-*m*-cresol (25 – 300 mg/Ld) sobre variables de respuesta, tales como eficiencia, rendimiento producto/sustrato, velocidades específicas de consumo de amonio, velocidades específicas de formación de nitrato y crecimiento microbiano.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Fuente de inóculo

Como fuente de inóculo para el SBR, se utilizó un cultivo nitrificante en estado estacionario. El reactor, con un volumen de operación de 3 L, fue operado por más de 3 años con una agitación de 200 rpm, una temperatura constante de 30°C, un pH de 8.0 ± 0.5 y un tiempo de retención hidráulica de 2.2 d. El reactor fue aireado de manera continua con 2 volúmenes de aire por volumen de líquido por minuto (vvm), con una concentración promedio de proteína microbiana de 0.36 ± 0.04 g/L. El medio de cultivo estuvo compuesto por dos medios (A y B), los cuales fueron alimentados al reactor por separado para evitar la precipitación de algunos componentes. Un volumen de 200 mL del medio A fue diluido en un litro de agua para poder obtener la siguiente composición de nutrientes (g/L): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (5.9), NH_4Cl (4.8), KH_2PO_4 (7.0), MgSO_4 (3.0), y NaCl (5.0), obteniendo una concentración total de N-NH_4^+ de 500 mg/L. Por otro lado, la composición de nutrientes del medio B fue la siguiente (g/L): $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.4) y NaHCO_3 (40.4), el cual actuó como solución amortiguadora del pH y como fuente de carbono. Ambos medios A y B fueron alimentados con un flujo de 1.19 y 0.26 L•d, respectivamente. También fue adicionado diariamente de manera individual $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ al reactor a 0.01 g/L•d.

5.2 Reactor de lotes secuenciados nitrificante

5.2.1 Composición del medio de cultivo

El reactor SBR, fue inoculado inicialmente con una concentración de lodo de 200 mg proteína de biomasa/L. El medio usado para el cultivo SBR, fue representado por una mezcla de dos medios (A y B). La composición química del medio A fue de (g/L): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.59), NH_4Cl (0.48), KH_2PO_4 (0.70), MgSO_4 (0.30), y NaCl (0.50). El medio B consistió de (g/L): $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.01) y NaHCO_3 (0.90). El medio A y B fueron bombeados a 33 y 67 mL/min respectivamente. También fue adicionado diariamente en el reactor $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a una concentración de 0.01 g/L. Por consiguiente se mantuvo una relación C/N de 3.0 (sin la adición de *m*-cresol).

5.2.2 Operación del reactor de lotes secuenciados nitrificante

Se utilizó un SBR a escala laboratorio con un volumen de trabajo de 1.5 L, el cual fue operado con ciclos de tratamiento de 12 h. Cada ciclo fue conformado por los cuatro siguientes periodos: Llenado (15 min, correspondiente a un llenado con agitación y aireación), Reacción (11 h de aireación-agitación), Sedimentación (44 min) y vaciado (1 min). Cada uno de los periodos de funcionamiento fue controlado de manera automática mediante el programa Labview (Laboratory Virtual Instrumental Engineering Workbench, National Instruments). El aire fue suministrado con un flujo constante de dos volúmenes de aire por volumen de líquido por minuto (VVM) y una agitación constante de 300 rpm. La temperatura fue controlada automáticamente a 30° C. El valor de pH inicial fue de 8 ± 0.5 . En la figura 2 se muestra el montaje experimental del SBR nitrificante.



Figura 2. Montaje experimental del SBR nitrificante

En los estudios en presencia del *m*-cresol, se utilizó la metodología anteriormente descrita con una diferencia en los flujos de alimentación. El medio A, B y C (*m*-cresol) fueron introducidos en el reactor con un flujo de 33 mL/min durante 15 min, respectivamente, para poder obtener concentraciones iniciales en el intervalo de 12.5 a 150 mg C-*m*-cresol/L. El estudio en presencia de *m*-cresol, fue iniciado con una concentración de 12.5 mg C-*m*-cresol/L, hasta alcanzar valores semejantes al proceso SBR nitrificante sin compuesto aromático. Posteriormente se adicionaron las concentraciones de 25, 50, 75 y 150 mg C-*m*-cresol/L, tomando como criterio la eliminación del compuesto aromático y la estabilización en la respuesta de los parámetros del proceso respiratorio nitrificante.

Durante este estudio se tomaron diariamente muestras al final del ciclo SBR y a diferentes intervalos de tiempo durante las 12 h de reacción. Todas las muestras fueron filtradas por medio de un filtro con tamaño de poro de 0.45 μm y posteriormente fueron analizadas para determinar la concentración de proteína, N-NH₄⁺, N-NO₂⁻, N-NO₃⁻, y *m*-cresol. La eficiencia de consumo de N-NH₄⁺ ($E\text{-NH}_4^+ = (\text{g N-NH}_4^+ \text{ consumido} / \text{g N-NH}_4^+ \text{ alimentado}) \times 100$), rendimiento nitrificante ($Y_{p/s}$, g N-NO₃⁻/g N-NH₄⁺ consumido) y velocidades específicas de la nitrificación fueron determinadas para evaluar la respuesta fisiológica del lodo nitrificante en presencia de *m*-cresol. Las velocidades volumétricas de consumo de N-NH₄⁺ y de formación de N-NO₃⁻ fueron estimadas de las cinéticas y expresadas como mgN/L•h. Con la concentración de proteína de biomasa nitrificante conocida y asumiendo que el 16% de la proteína microbiana total es nitrógeno, las velocidades específicas de consumo de N-NH₄⁺ (q_s) y de formación de N-NO₃ (q_p), fueron calculadas y expresadas como g N/g de N-proteína de biomasa•h.

5.3 Métodos analíticos

5.3.1 Determinación de la concentración de N-NH₄⁺

En un tubo de ensaye se adicionaron 10 ml de muestras estándares a partir de soluciones de (NH₄)₂SO₄ y 0.5 ml de MnSO₄ 0.003 M. A continuación se adicionaron 0.5 ml del reactivo de hipoclorito (20 ml de cloro comercial aforados a 100 ml de H₂O

destilada) y 0.6 ml del reactivo fenante (disolver 2.5 mg de NaOH en perlas y 10 de Fenol blanco en 100 ml de agua destilada) y posteriormente se agitaron por medio de un vortex para homogenizar la muestra. Después de 10 minutos, cuando la reacción se completó las muestras se midieron en un espectrofotómetro a 630 nm.

5.3.2 Determinación de la concentración de nitrito y nitrato en HPLC

Para la determinación de nitrógeno de nitrito y nitrógeno de nitrato se utilizó un HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) marca Perkin Elmer Serie 200 a una longitud de onda de 254 nm, con una columna Waters IC-Pack Anion HR 4.6 X 75 mm y una fase móvil compuesta por una mezcla de 20 mL de gluconato, 20 ml de butanol y 120 mL de acetonitrilo aforados a 1 L de agua destilada, la cual fue transferida a un flujo de 1 mL/min. Se prepararon muestras estándares de N-NO_3^- y N-NO_2^- con concentraciones conocidas (10, 20, 30, 40 y 50 mg/L) a partir de NaNO_2 y KNO_3 respectivamente, las cuales fueron inyectadas en el HPLC para realizar la curva de calibración. Posteriormente, se inyectaron las muestras tomadas de cada una de las cinéticas realizadas para obtener su concentración, a través de la curva de calibración. El valor cuantificado fue calculado a partir de la ecuación de la recta obtenida por los estándares.

5.3.3 Determinación de la concentración de proteína de biomasa

La medición de proteína se basó en el método de Lowry, 1951, de acuerdo a la metodología reportada por Zepeda y *col.*, 2003, para lo cual se preparó una solución estándar de albúmina serológica bovina con una concentración de 0.30 g/L. En cada tubo se adicionó 1 ml de la muestra y se adicionaron 0.1 ml de NaOH 10 N, los cuales se homogeneizaron por medio de un vortex. A continuación se calentaron durante 20 minutos a 90°C. Posteriormente se adicionaron 5 ml de una mezcla de soluciones A + B + C (1 ml solución A + 1 ml solución B aforados a 50 ml con solución C) a cada tubo. La composición de la solución A (20 g de NaCO_3 en 1 L de NaOH 0.1 N), solución B (1.56 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 100 ml de H_2O) y solución C (2.68 g de tartrato de sodio y potasio $\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ en 100 ml de agua). A continuación se agitaron los tubos y posteriormente se dejaron reposar en la oscuridad durante 30 minutos. Al finalizar el

tiempo de reposo se adicionó el reactivo Folin Fenol Reagent (1 ml) sin diluir a los tubos, los cuales se agitaron vigorosamente y se dejaron reposar en la oscuridad por 2 h. Una vez terminado este procedimiento se cuantificó el concentrado de proteína de cada una de las muestras por medio de la lectura de absorbancia a una longitud de onda de 750 nm. La concentración de proteína fue determinada mediante una curva de calibración construida a partir de una solución estándar de albúmina. El valor cuantificado puede ser calculado de la ecuación de la recta obtenida por los estándares.

5.3.4 Determinación de la concentración del C-*m*-cresol

Para la determinación del compuesto aromático se utilizó el HPLC, (*High Performance Liquid Chromatography*) marca Perkin Elmer Series 200, una columna C18, una fase móvil de acetonitrilo y agua HPLC en una proporción de 60:40, una a longitud de onda de 254 nm y un flujo de 1.5 ml/min, de acuerdo a la metodología propuesta Zepeda y *col.*, 2003.

5.4 Pruebas abióticas del C-*m*-cresol

Para determinar la volatilidad del *m*-cresol se llevaron a cabo pruebas en ausencia de inóculo (abióticas), para las cuales se utilizó una concentración inicial de 50 mg C-*m*-cresol/L bajo las mismas condiciones de operación planeadas para el sistema SBR durante un periodo de 24 horas.

Es importante mencionar que cada una de las pruebas realizadas y medición de muestras se realizaron por lo menos por duplicado.

6. RESULTADOS

6.1 Curvas de calibración

Se obtuvieron las siguientes curvas de calibración a partir de los métodos propuestos, de las cuales se hicieron repeticiones obteniendo un margen de error menor al 10 %.

La Figura 3, representa la curva de calibración de N-NH₄⁺ mediante la técnica colorimétrica.

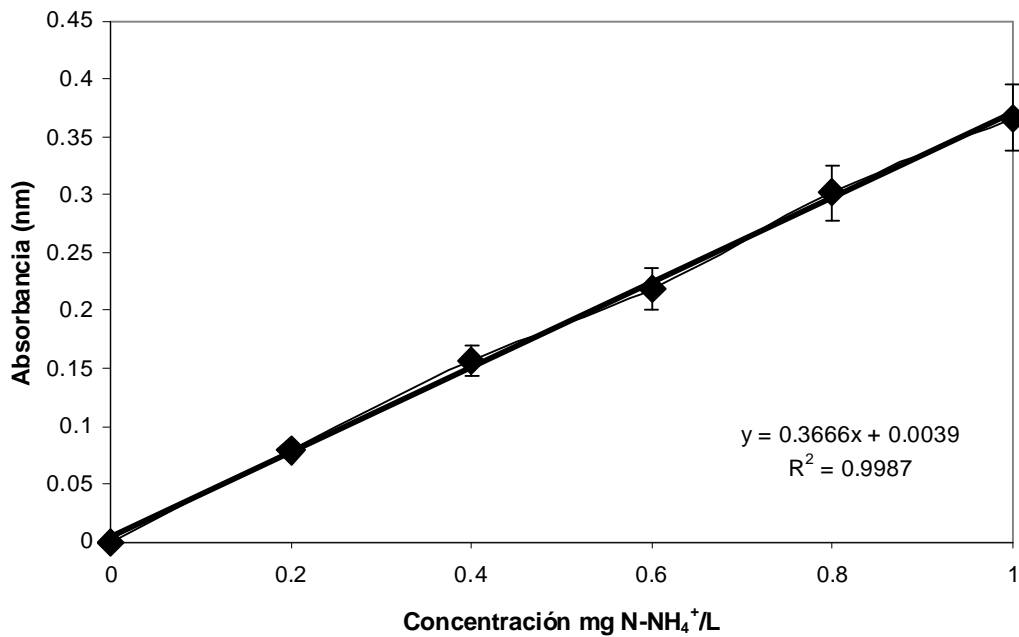


Figura 3. Curva de calibración de N-NH₄⁺

Las Figuras 4 y 5 representan las curvas de calibración realizadas en HPLC para determinar las concentraciones de N-NO₂⁻ y N-NO₃⁻.

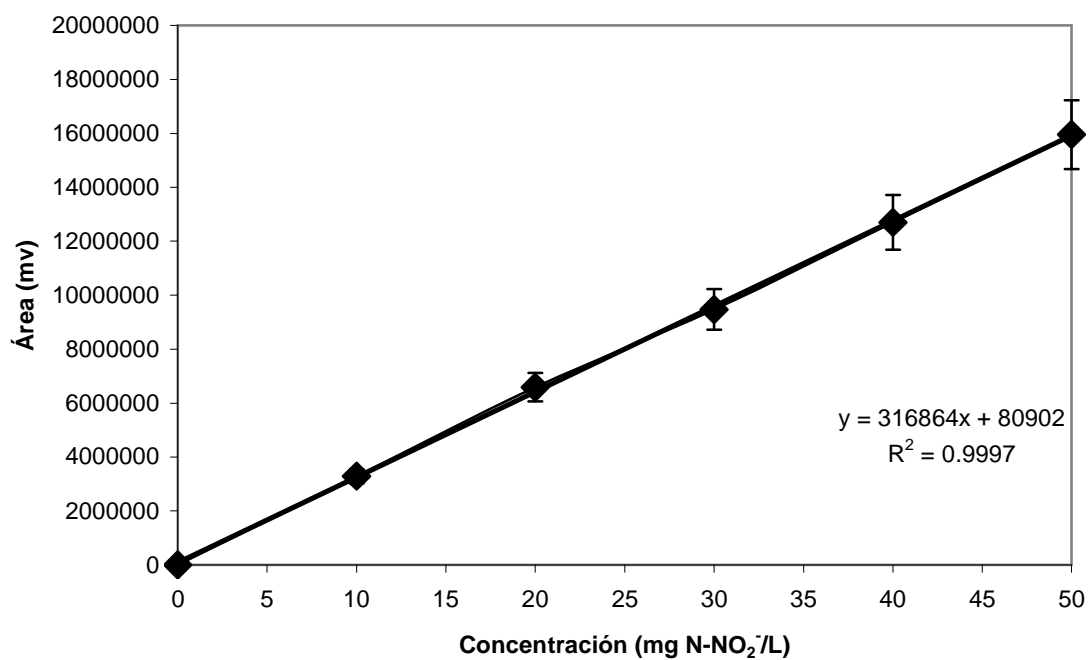


Figura 4. Curva de calibración de N-NO₂⁻

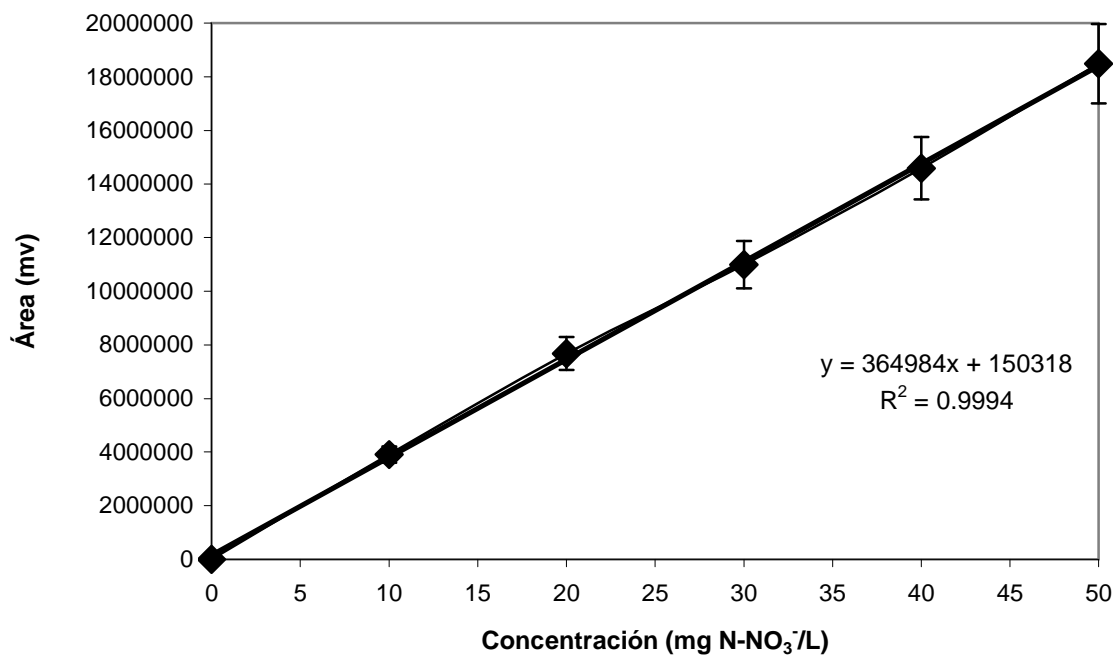


Figura 5. Curva de calibración N-NO₃⁻

En la figura 6 se observa la curva de calibración de proteína de biomasa con una $R=0.9995$.

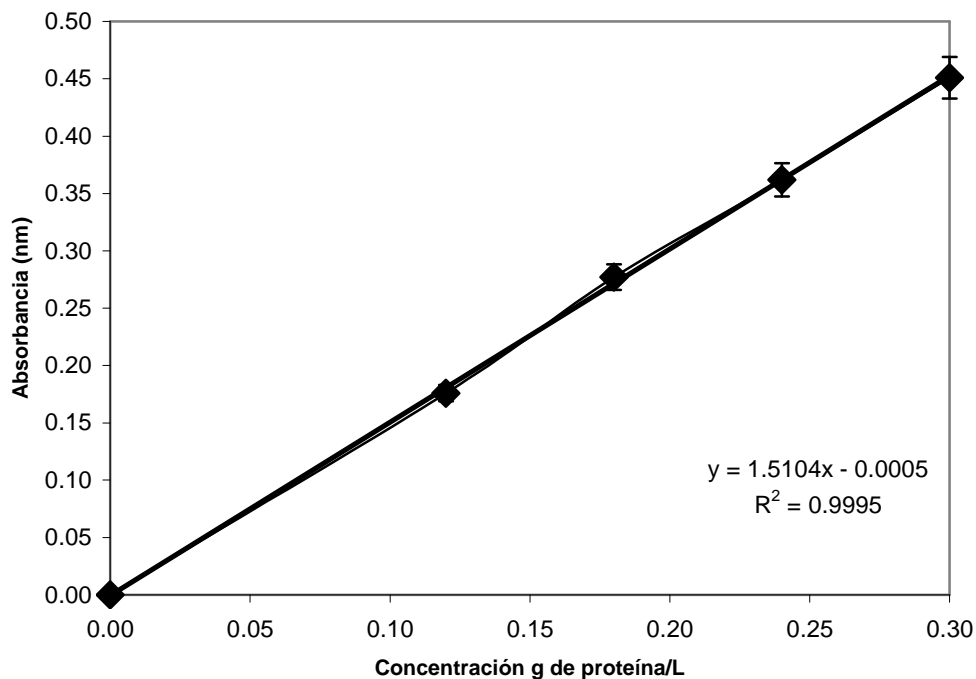


Figura 6. Curva de calibración de proteína de biomasa

6.2 Reactor continuo: Fuente de inóculo

El reactor continuo nitrificante fue alimentado con una velocidad de carga de $N-NH_4^+$ constante de 194 ± 4 mg/L•d. Durante el tiempo de operación del reactor, se obtuvo una velocidad de producción de $N-NO_3^-$ de 191 ± 7 mg/L•d, tal y como se observa en la Figura 7. La velocidad de salida de $N-NH_4^+$ permaneció baja con valores alrededor de 0.2 mg/L.d. En consecuencia, el lodo nitrificante alcanzó el estado estacionario, debido a que las velocidades de carga y descarga en $N-NH_4^+$ y $N-NO_3^-$ permanecieron constantes. Bajo estas condiciones, la eficiencia de consumo de amonio ($E-N-NH_4^+$) fue cercana al 100% con un rendimiento de producción en $N-NO_3^-$ ($Y-N-NO_3^-$) de 0.98. Durante toda la operación del reactor continuo, el nitrito no fue detectado en el cultivo. En concordancia con el proceso netamente desasimilativo, la velocidad de producción en proteína microbiana fue baja y permaneció cercana a 12 mg/L•d, lo que corresponde a una velocidad aproximada de 1.9 mg N-proteína/L•d. En estos términos, sólo el 1%

del nitrógeno de amonio consumido fue utilizado para biosíntesis de biomasa microbiana. Por lo tanto, durante la operación del reactor en continuo (3 años), se obtuvo un proceso nitrificante desasimilativo en régimen estacionario (y dada la escasa acumulación de biomasa, es posible decir que el cultivo operó en régimen estacionario-estable).

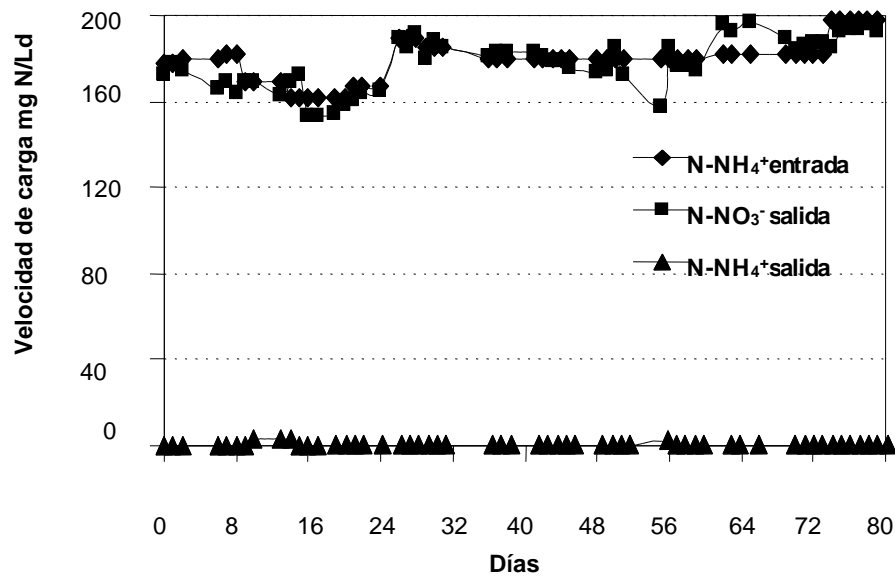


Figura 7. Perfiles del funcionamiento del reactor en continuo en estado estacionario estable.

6.3 Cinética nitrificante control del proceso de lotes secuenciados

Con el objetivo de determinar las características nitrificantes del consorcio bacteriano en ausencia de *m*-cresol, se trabajó durante 7 meses en un sistema SBR nitrificante con dos ciclos de tratamiento al día, tal y como se describe en material y métodos. En la Figura 8, se presenta el perfil nitrificante obtenido en modo SBR antes de adicionar el *m*-cresol. Es importante mencionar que la concentración de biomasa durante el estudio cinético fue estimada con una concentración de 0.20 g de proteína/L.

Como puede observarse en la Figura 8 el proceso nitrificante se llevó a cabo de manera satisfactoria, obteniendo una eficiencia de consumo de amonio del 98% y un rendimiento en la formación de producto (N-NO₃⁻) de 0.91. Además, al término del ciclo de tratamiento (12 h), no se observó la presencia del intermediario (N-NO₂⁻), sustrato

residual, así como crecimiento significativo de la biomasa nitrificante, lo cual confirma que dicho proceso fue netamente desasimilativo.

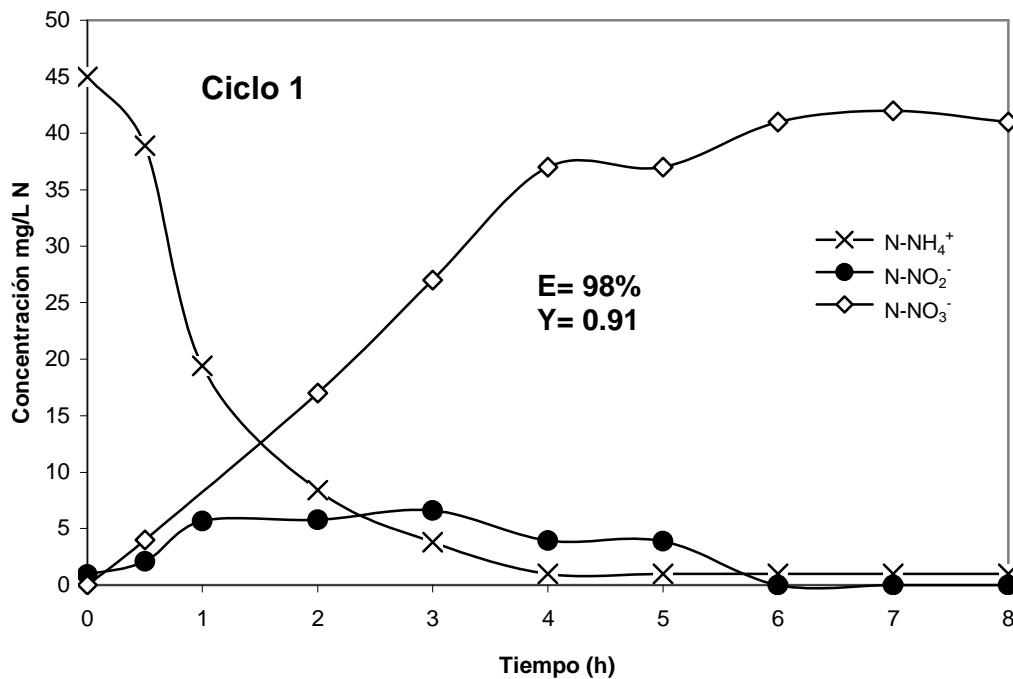


Figura 8. Perfiles de $N-NH_4^+$, $N-NO_3^-$ y $N-NO_2^-$ del control del reactor SBR

Por otro lado, durante este estudio cinético se estimaron tanto las velocidades volumétricas como las velocidades específicas del proceso respiratorio nitrificante, a través de los perfiles de consumo de amonio y formación de nitrato (Figura 8). En este sentido en el sistema SBR nitrificante en ausencia del *m*-cresol, se obtuvieron los valores de las velocidades específicas de consumo de sustrato ($0.57 \text{ mg } N-NH_4^+ / \text{ mg } N\text{-proteína} / L \cdot h$) y de formación de producto ($0.328 \text{ mg } N-NO_3^- / \text{ mg } N\text{-proteína} / L \cdot h$). En donde la eficiencia, rendimiento, crecimiento microbiano, velocidades específicas de consumo de amonio y de formación de producto, fueron utilizadas como parámetros de referencia del proceso nitrificante en ausencia del *m*-cresol (Tabla 4).

6.4 Cinética nitrificante en el proceso de lotes secuenciados en presencia del C-*m*-cresol

Una vez estimado los valores de referencia del proceso nitrificante control, se procedió a introducir el *m*-cresol en forma de carbono con el objetivo de evaluar el efecto de dicho compuesto sobre el proceso respiratorio nitrificante bajo estudios cinéticos (12 h). Durante esta fase de estudio, se introdujo el *m*-cresol, considerando la concentración

del carbono presente en este compuesto, de tal manera que las concentraciones estudiadas en este trabajo fueron las siguientes: 12.5, 25, 50, 75 y 150 mg C-*m*-cresol/L, las cuales fueron adicionadas por cada ciclo de tratamiento. Al término de los estudios cinéticos de cada una de las concentraciones utilizadas, se determinaron los parámetros de referencia para poder llevar a cabo la comparación con los parámetros obtenidos por el sistema SBR nitrificante control.

A continuación se describen los resultados obtenidos durante los estudios cinéticos nitrificantes en presencia de una concentración de 12.5 mg C-*m*-cresol/L, en donde se muestran los perfiles de consumo de amonio y de formación de nitrato. Los perfiles obtenidos con las concentraciones de 50, 75 y 150 mg C-*m*-cresol/L, se muestran en el Anexo I.

Es importante mencionar que durante las pruebas abióticas no se observó una pérdida significativa de *m*-cresol.

6.4.1 Concentración 12.5 mg C-*m*-cresol /L

Al evaluar por primera vez el efecto de la presencia del *m*-cresol en el proceso nitrificante, se utilizó una concentración de 12.5 mg C-*m*-cresol/L, y un ciclo de tratamiento en modo SBR de 24 h, debido a una posible disminución de las velocidades de consumo de amonio y de formación de nitrato ocasionada por la presencia de la materia orgánica (Texier y Gomez, 2007). Durante la primera cinética realizada a 12.5 mg C-*m*-cresol/L, definido como ciclo 7, se observó que durante las 24 h de duración del ciclo de tratamiento, el amonio no fue consumido en su totalidad, obteniendo una eficiencia de consumo de amonio de 88% y un rendimiento de 0.98 (conversión total del amonio consumido en nitrato) (Figura 9c). Además, durante el ciclo 7 de tratamiento se estimaron las velocidades específicas de consumo de amonio (0.057 g N-NH₄⁺/g N-proteína•h) y velocidades específicas de formación de nitrato (0.074 g N-NO₃⁻/g N-proteína•h), las cuales mostraron una disminución con respecto al SBR nitrificante control con valores de 89 y 77% respectivamente, observando que a pesar de obtener una elevada eficiencia y rendimiento nitrificante, tanto el proceso respiratorio amonio-oxidante como nitrito-oxidante fueron inhibidos significativamente por la presencia del *m*-cresol.

Posteriormente, siete días después de haber realizado la cinética relacionada al ciclo 7 de tratamiento, se llevo a cabo un nuevo estudio cinético durante el ciclo 14 de tratamiento (Figura 9). Durante este estudio cinético se pudo observar que el amonio fue totalmente consumido, obteniendo una eficiencia del 98% y un rendimiento de 0.88. Además, durante este estudio cinético se pudo observar que tanto las velocidades de consumo de amonio, como las velocidades de formación de nitrato, mostraron una recuperación obteniéndose valores en porcentaje de disminución de 48 y 4% respectivamente (Tabla 4). Estos resultados mostraron que las bacterias amonio-oxidantes fueron mayormente afectadas por la presencia del *m*-cresol, debido a que después de este periodo de reacción únicamente recuperaron el 52% de la velocidad de oxidación de amonio a nitrito, mientras que las bacterias nitrito-oxidantes recuperaron el 96% de la velocidad de oxidación de nitrito a nitrato con respecto a los valores obtenidos por el control. Una vez observada estabilidad en las variables de respuesta del proceso nitrificante, se incrementaron los ciclos de tratamiento (2 ciclos por día), manteniendo constante la concentración inicial del compuesto aromático (12.5 mg *C-m*-cresol/L). Estas condiciones de trabajo fueron probadas durante 16 días de operación hasta alcanzar el ciclo de tratamiento 31 (Figura 9). Al término de los 16 días de operación, se pudo observar que el proceso respiratorio nitrificante no presentó ningún cambio significativo con respecto a los valores obtenidos en el ciclo de tratamiento 14, tal y como se observa en la Tabla 4. De esta manera, se pudo corroborar que la presencia del *m*-cresol afectó en mayor proporción a las bacterias amonio-oxidantes, obteniendo un porcentaje de disminución de $44 \pm 6\%$ en las velocidades específicas de consumo de amonio.

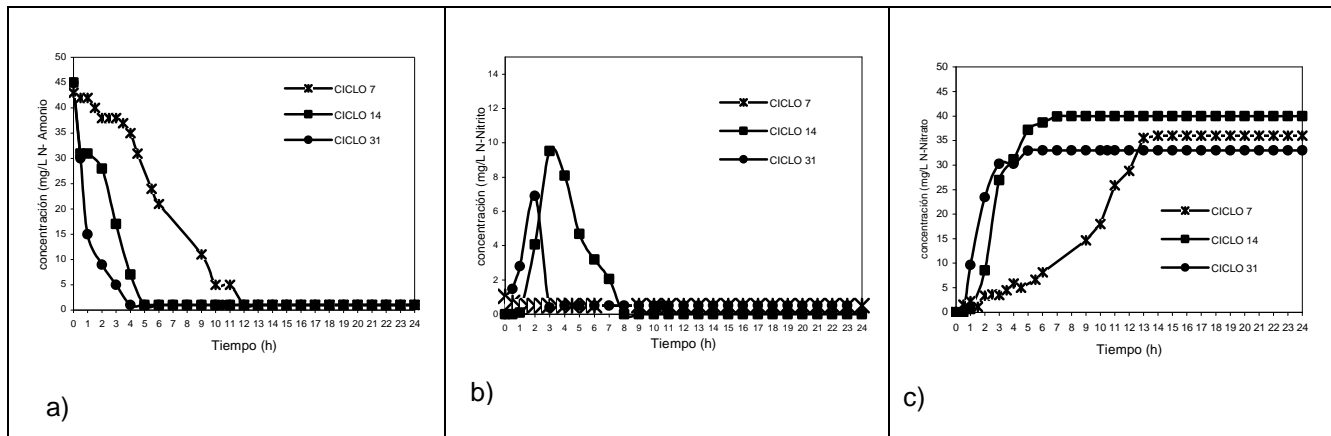


Figura 9. Perfiles con una velocidad de carga de 12.5 mg/L C-m-cresol

NOTA: Las cinéticas realizadas con concentración de 25 a 150 mg/L•ciclo se presentan en el ANEXO I.

6.4.2 Variables de respuesta del proceso nitrificante

En la Tabla 4 se muestran los valores obtenidos de: eficiencia (E %), rendimiento ($Y_{p/s}$), velocidades específicas de consumo de sustrato (q_s), velocidades de formación de producto (q_p) y proteína de biomasa, de cada una de las cinéticas realizadas.

Tabla 4. Eficiencias y rendimientos de las cinéticas realizadas con diferentes concentraciones de C-m-cresol

Ciclo	C-m-cresol	E (N-NH ₄ ⁺) %	$Y_{p/s}$ (N-NO ₃ ⁻)	q_s	q_p	Disminución q_s (%)	Disminución q_p (%)	Concentración proteína (g/L)
1 (control)	0	97.7	0.91	0.52	0.328			0.22
7	12.5	88.37	0.98	0.057	0.074	89	77	0.216
14	12.5	97.9	0.88	0.272	0.316	48	4	0.218
31	12.5	97.7	0.88	0.312	0.301	40	8	0.22
34	25	97.7	0.83	0.346	0.313	33	5	0.24
44	25	97.7	0.78	0.355	0.218	32	34	0.24
46	50	97.7	0.76	0.373	0.233	28	29	0.24
56	50	97.7	0.67	0.339	0.193	35	41	0.26
74	75	97.7	0.71	0.328	0.125	37	62	0.4
98	75	97.7	0.69	0.171	0.093	67	72	0.5
114	150	97.7	0.64	0.118	0.057	77	83	0.65
132	150	97.7	0.60	0.101	0.07	81	79	0.68

Como se observa en la Tabla 4, la eficiencia de consumo de amonio de manera general no presentó ningún cambio significativo durante la presencia del *m*-cresol con respecto al control, obteniéndose porcentajes de consumo de amonio de 98%. Sin embargo, los valores de conversión de amonio a nitrato ($Y_{p/s}$) mostraron una disminución significativa, observándose de manera general una relación directa de la disminución del rendimiento con el incremento de la concentración del *m*-cresol (Tabla 4).

En lo que respecta las velocidades específicas de consumo de amonio y de formación de nitrato, se puede mencionar que hasta una concentración de 25 mg C-*m*-cresol/L, las bacterias amonio-oxidantes son mayormente afectadas que las bacterias nitrito-oxidantes. Posteriormente a partir de la concentración de 50 mg C-*m*-cresol/L, se puede observar que tanto las bacterias amonio-oxidantes como las nitrito-oxidantes son afectadas en la misma proporción, observándose adicionalmente que el incremento en la disminución de dichas velocidades se encontró directamente relacionado al incremento de la concentración del *m*-cresol (Tabla 4). Además también se observó que dicho fenómeno estuvo relacionado con el incremento de la biomasa tal y como se muestra en la Tabla 4, en donde se observó un incremento significativo de la proteína de biomasa a partir de la concentración de 50 mg C-*m*-cresol/L. De esta manera se puede mencionar que hasta una concentración de 25 mg C-*m*-cresol/L el proceso nitrificante fue netamente desasimilativo y que a partir de la concentración de 50 mg C-*m*-cresol/L, el proceso nitrificante es modificado metabólicamente a un proceso asimilativo, lo cual podría explicar el crecimiento microbiano y la disminución del rendimiento nitrificante.

6.4.3 Comportamiento del C-*m*-cresol en el proceso nitrificante

Las muestras obtenidas durante los estudios cinéticos en presencia de C-*m*-cresol se midieron a través de HPLC para cuantificar la concentración del compuesto aromático. En este sentido se pudo observar que desde el primer punto de muestreo (30 minutos), ya no se encontraba presente el C-*m*-cresol. Sin embargo, se observó la presencia de otro compuesto (intermediario), el cual no pudo ser identificado ni cuantificado. Una posible explicación a este comportamiento es que la oxidación del C-*m*-cresol, es realizada inmediatamente, tal y como lo describe Texier y Gomez, 2007, en donde se

estudio el *p*-cresol en presencia de un consorcio nitrificante, y este compuesto fue oxidado casi por completo a los 8 minutos de reacción. Por otro lado, también es importante mencionar que al incrementar la concentración de *C-m*-cresol, se observó un cambio metabólico significativo, observándose la transición de un proceso netamente desasimilativo a uno asimilativo, representado por el crecimiento microbiano y por la disminución del $Y_{p/s}$.

7. DISCUSIÓN

Condiciones pseudo estacionarias fueron mantenidas a través de 7 meses de operación en modo SBR con eficiencia de consumo de amonio del 98%, rendimiento nitrificante ($Y_{p/s}$) en el intervalo de 0.98 - 0.60, observando que la presencia del *m*-cresol, provocó una disminución en el rendimiento y velocidades específicas de consumo de amonio y formación de nitrato. Asimismo, al adicionar el *m*-cresol al proceso nitrificante se observó que hasta una concentración de 25 mg C-*m*-cresol/L, las velocidades específicas de consumo de amonio presentaron un mayor porcentaje de disminución que las velocidades de formación de nitrato, sin observar la acumulación de nitrito o de *m*-cresol, sugiriendo que las bacterias nitrito-oxidantes son más tolerantes a la presencia del *m*-cresol que las bacterias amonio-oxidantes. Estos resultados son similares a los obtenidos por Zepeda y col., 2003, 2006, en donde se observó que el benceno, tolueno y *m*-xileno inhibieron principalmente la actividad de las bacterias amonio-oxidantes. En este sentido, varios trabajos han reportado que la enzima amonio monooxigenasa (AMO) se encuentra involucrada en la oxidación de una amplia gama de hidrocarburos (Hyman y col., 1985; Keneer y Arp, 1993, 1994; Duddleston y col., 2002), donde el efecto inhibitorio de los compuestos orgánicos sobre el proceso respiratorio de la oxidación de amoníaco fue debido a un efecto competitivo sobre el sitio activo de esta enzima de acuerdo a McCarty, 1999.

Por otro lado, el lodo nitrificante fue capaz de tolerar hasta 150 mg de C-*m*-cresol/L en un cultivo en modo SBR, la cual corresponde a una velocidad volumétrica de 300 mg C/L•d, con una eficiencia de consumo de 98%, rendimiento $Y_{p/s}$ de 0.62 ± 0.03 , velocidades específicas de consumo de 0.110 ± 0.012 g N/g de N-proteína y velocidades específicas de formación de nitrato 0.064 ± 0.009 g N/g de N-proteína. Además los resultados indicaron que el lodo nitrificante fue capaz de oxidar el *m*-cresol en intermediarios, los cuales posteriormente fueron totalmente consumidos. Amor y col., 2005 durante el estudio de la biodegradación del fenol y su efecto sobre la nitrificación en un reactor continuo de lodos activados, obtuvieron una velocidad específica de eliminación de fenol de 225 mg DQO/g SSV•d correspondiente a 94 mg fenol/g SSV•d, manteniendo una velocidad de carga de 140 mg N-NH₄⁺/L•d, la cual fue similar a la

velocidad de carga empleada en este trabajo (100 mg N-NH₄⁺/L•d). Estos autores observaron una alta eficiencia de consumo, y un efecto significativo en el rendimiento nitrificante. En este sentido Amor y col., 2005, sugirieron que la disminución del rendimiento nitrificante se debió a que el amonio fue asimilado por los microorganismos heterotrófos debido a que la biomasa incrementó sustancialmente en el reactor, lo cual explicaría el incremento significativo de biomasa en nuestro estudio a partir de la concentración de 50 mg C-*m*-cresol/L (Tabla 6). Por otro lado, también se ha observado que al incrementar la relación C/N, por la adición de materia orgánica se presenta una disminución de la actividad nitrificante del consorcio microbiano, debido posiblemente al incremento de la microflora heterotrófica disminuyendo el amoníaco o el oxígeno disponible para la nitrificación (Hanaki y col., 1990; Van Niel y col., 1993; Wiesmann, 1994; Delgado y col., 2004). En este sentido en el cultivo control sin *m*-cresol, la única fuente de carbono provino del bicarbonato del medio de cultivo, obteniéndose una C/N de 3.0, observándose que bajo estas condiciones de trabajo se obtuvo un rendimiento de biomasa muy bajo (0.01 g de N-proteína/g N-NH₄⁺ consumido), indicando un proceso nitrificante desasimilativo. Sin embargo cuando se introdujo el *m*-cresol a 12.5, 25, 50, 75, y 150 mg C-*m*-cresol/L, se obtuvo un incremento en la relación C/N de 3.25, 3.5, 4.0, 4.5 y 6.0, lo cual explicaría el cambio de un proceso netamente desasimilativo a uno asimilativo a partir de la concentración de 50 mg C-*m*-cresol/L, correspondiente a una relación C/N de 4.0. Resultados similares fueron reportados por Texier y Gomez, 2007, quienes trabajando con *p*-cresol observaron un proceso nitrificante netamente desasimilativo a una concentración de 150 mg *p*-cresol y una relación C/N de 3.5.

Por otra parte, durante este trabajo se observó que el lodo nitrificante fue capaz de oxidar al amonio y *m*-cresol de manera simultánea sin importar la concentración inicial del compuesto aromático, esto podría ser probablemente obtenido debido al empleo del sistema SBR, el cual promovió la estabilidad metabólica de los microorganismos responsables de la oxidación del *m*-cresol. Este fenómeno ha sido previamente reportado en los sistemas SBR, los cuales han permitido incrementar la estabilidad fisiológica de los microorganismos a través de los ciclos de tratamiento (Texier y Gomez, 2004).

Además diferentes trabajos con *Nitrosomonas europaea* han reportado la capacidad de la AMO para oxidar simultáneamente el amoníaco y compuestos orgánicos, generando la acumulación de los productos de la oxidación en el medio de cultivo (Keener y Arp, 1993, 1994; McCarty, 1999). De esta manera las bacterias heterotróficas del consorcio microbiano pueden también estar involucradas en el consumo del *m*-cresol y de los intermediarios producidos en el cultivo nitrificante de acuerdo a lo sugerido por Zepeda y col., 2003, 2006.

Esto podría explicar por que la eficiencia de consumo de amoníaco y la oxidación del *m*-cresol no fueron afectadas. Además, la tolerancia al *m*-cresol por parte del lodo nitrificante podría ser obtenida principalmente por el incremento en la capacidad metabólica de los microorganismos para consumir *m*-cresol, la cual sería inducida por el sistema SBR y no por el incremento de la biomasa microbiana.

8. CONCLUSIONES

Los estudios cinéticos mostraron que el sistema control del proceso nitrificante en modo SBR trabajó de manera adecuada, obteniéndose una eficiencia del 98% y un rendimiento de 0.91. Una vez adicionado el compuesto fenólico a 12.5 mg/L por primera vez, la eficiencia y el rendimiento no mostraron cambios; sin embargo las velocidades específicas de consumo y de sustrato disminuyeron ($q_s = 0.057$ y $q_p = 0.074$). Además, se observó que conforme se aumentaron los números de ciclos con la misma concentración de compuesto fenólico, las velocidades específicas mostraron valores cercanos al control ($E\% = 97.7$ y $Y = 0.907$).

A través de los resultados obtenidos con este trabajo se pudo observar que las bacterias amonio oxidantes son más susceptibles a la presencia del *m*-cresol, la cual puede ser corroborada con el porcentaje de disminución de las q_s y el porcentaje de disminución de las q_p .

Por otro lado, a partir de la carga volumétrica de 50 mg/L por ciclo del compuesto fenólico, la q_s y q_p disminuyeron significativamente.

Además, se observó que puede existir la oxidación simultánea de amonio y *m*-cresol.

A partir de una relación C/N de 4.0, se observó una modificación del proceso respiratorio asimilativo a desasimilativo, provocando una disminución en el rendimiento nitrificante $Y_{p/s}$, debido al incremento de la biomasa nitrificante.

El reactor SBR favoreció la estabilidad metabólica para llevar a cabo la oxidación del *m*-cresol), debido al principio de su funcionamiento.

Se observó la biotransformación del compuesto fenólico en un tiempo menor a 30 minutos.

Se observó la presencia de intermediarios, los cuales no fueron identificados.

9. LITERATURA CITADA

1. **Anthonisen, A. C., Loehr, R. C., Prakasam, T. B. S. y Srinath, E. G.** 1976. Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *J. Water Pollut. Control Fed.* **48**:835-852.
2. **Amor, L., Eiroa, M., Kennes, C., Veiga, M.C.,** 2005. Phenol biodegradation and its effect in the nitrification process. *Water Res.* **39**:2915–2920
3. **Andrew, C., Han, J., de Vries, S., van de Oost, J., Averill, B., Loehr, T. y Sanders-Loehr, J.** 1994. *CuA* of cytochrome c oxidase and the A site of N₂O reductase are tetrahedrally distorted type 1 Cu cysteinates. *J. Am. Chem. Soc.* **116**:10805-10806.
4. **ATSDR.** 1997. Toxicological profile for benzene. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
5. **ATSDR.** 2003. Toxicological profile for cresols. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
6. **Barnes, D. y Bliss, P. J.** 1983. Biological Control of Nitrogen in Wastewater Treatment. E. and F. N. Spon, New York, NY.
7. **Bock, E., Schmidt, I., Stüven, R. y Zart, D.** 1995. Nitrogen loss caused by denitrifying *Nitrosomonas* cells using ammonia or hydrogen as electron donors and nitrite as electron acceptor. *Arch. Microbiol.* **163**:16-20.
8. **Bray, W.V. Thorpe and K. White.** 1950. Metabolism of derivatives of toluene. *Biochem. Journal.* **46**: 275-0.

-
9. **Carrillo, L. 2003.** Microbiología Agrícola. Capítulo 3. Actividad microbiana. Ed. Salta: UNSA, v.1. p.160.
 10. **Cervantes, C.F. J. Pérez y J. Gomez .2000.** Avances en la eliminación biológica del nitrógeno de las aguas residuales. Revista Latinoamericana de microbiología. **42:** 73-82.
 11. **Chang, S. W., Hyman, M. R. y Williamson.** 2002. Cooxidation of naphthalene and other polycyclic aromatic hydrocarbons by nitrifying bacterium, *Nitrosomonas europaea*. Biodegradation. **13:**373-381.
 12. **Churchwell, R. L., Kachtick, J. W., y Ford, D. L.** 1980. "Comprehensive Analysis of Nitrification of Chemical Processing Wastewaters" J. WPCF. **52:**2726-2746.
 13. **Collins, L. D., Daugulis, A. J.** 1999. Simultaneous biodegradation of benzene, toluene, and *p*-xylene in a two-phase partitioning bioreactor: concept demonstration and practical application. Biotechnol. Prog. **15:** 74-80.
 14. **Cortacans. T.J.A.** 2000. Fangos Activos- Eliminación Biológica de nutrientes. 1° edición, Ed. Colegio de ingenieros, caminos, canales y puertos.
 15. **Coyle, C. L., Zumft, W. G., Kroneck, P. M. H., Körner, H. y Jakob, W.** 1985. Nitrous oxide reductase from denitrifying *Pseudomonas perfectomarina* – Purification and properties of a novel multicopper enzyme. Eur. J. Biochem. **153:**459- 467.
 16. **Denich, T. J., Beaudette, L. A., Lee, H., and Trevors, J. T.** 2003. Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes. J. Microbial. Methods. **52:**149-182.

-
17. **Diario Oficial de la Federación.** 1996. NOM-001-SEMARNAT-1996 Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales, 24 de Junio de 1996.
18. **Duddleston, K. M., Arp, D. J., Bottomley, P. J.,** 2002 Biodegradation of monohalogenate alkanes by soil NH₃-oxidizing bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**: 535–539.
19. **Delgado, A., Aspé, E., Martí, M.C., Roeckel, M.,** 2004. The effect of volatile fatty acids on the nitrification of saline effluent. *Environ. Technol.* **25**: 413–422.
20. **Dyreborg, S., y Arvin, E.** 1995. Inhibition of nitrification by creosote-contaminated water. *Water Res.* **29**:1603-1606.
21. **García- Encina, P.A y Fernández-Polanco, F.** 1996. Parámetros de operación en sistemas de operación de nutrientes, 2º curso de Ingeniería Ambiental: Eliminación Biológica de nutrientes en aguas residuales, Lleida, 28 a 30 de octubre de 1996. Pp. 42-62.
22. **Garrido-Ramos MA, Soriguer MC, de la Herrán R, Jamilena M, Ruiz Rejon C, Domezain A, Hernando JA and Ruiz Rejon M.** 1997. Morphometric and genetic analysis as proof of the existence of two sturgeon species in the Guadalquivir river. *Mar. Biol.* **129**: 33-39.
23. **Gauntlet, R. B.** 1981. Removal ammonia and nitrate in the treatment of potable water. In: *Biological fluidized potable water and wastewater*, Cooper, T. y Atkinson, H. ed. Ellis Horwood Ltd. London. Pp. 49-60.
24. **Gómez, H. J., Lema, R. J. M. y Méndez, P. J. R.** 1995. La nitrificación biológica con cultivos axénicos o lodos activados. *Ciencia.* **46**:507-523.

-
25. **Goretski, J. y Hollocher, T. C.** 1990. The kinetic isotopic competence of nitric oxide as an intermediate in denitrification. *J. Biol. Chem.* **265**:889-895.
26. **Grbi'c-Gali'c, D. y Vogel, T.** 1987. Transformation of toluene and benzene by mixed methanogenic cultures. *Appl Environ. Microbiol.* **53**:254–260.
27. **Halling-Sørensen, B. and S. Jörgensen** (eds.). 1993. The removal of nitrogen compounds from wastewater, p. 3. Elsevier, Netherlands.
28. **Hanaki, K., Wantawin, C. y Ohgaki, S.** 1990. Effects of the activity of heterotrophs on nitrification in a suspended-growth reactor. *Wat. Res.* **24**:289-296
29. **Heider, J., Spormann, A. M., Beller, H. R. y Widdel, F.** 1999. Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. *FEMS Microbiol. Rev.* **22**:459-473.
30. **Hockemburg M. R y Grady C.P..L** 1977. Inhibition of nitrification effects of selected organic compounds, *J.Wat. Pollut. Control Fed.* **49**:768-777.
31. **Hyman, M. R., Murton, I. B., y Arp, D. J.** 1988. Interaction of ammonia monooxygenase from *Nitrosomonas europaea* with alkanes, alkenes, and alkynes. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:3187-3190.
32. **Hyman, M. R., Page, C. L. y Arp, D. J.** 1994. Oxidation of methyl fluoride and dimethyl ether by ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:3033-3035.
33. **Hyman, M. R. y Wood, P. M.** 1984. Ethylene oxidation by *Nitrosomonas europaea*. *Arch. Microbiol.* **137**:155-158.
34. **Hyman, M. R., Sansome-Smith A. W., Shears, J. H. y Wood, P. M.** 1985. A kinetic study of benzene oxidation to phenol by whole cells of *Nitrosomonas*

-
- europaea* and evidence for the further oxidation of phenol to hydroquinone. Arch. Microbiol. **143**:302-306.
35. **Hyman, M. R. y Wood, P. M.** 1983. Methane oxidation by *Nitrosomonas europaea*. Biochem. J. **212**:31-37.
36. **IARC** monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. An updating of IARC monographs. 1987. 1±42, Suppl 7, Lyon, France.
37. **IPCS.** 1995. Environmental Health Criteria 175: Anticoagulant Rodenticides, Geneva, World Health Organization
38. **Irvine R.L., Wilderer y H.C Flemming.** 1997 Controlled unsteady state processes and technologies an overview. Wat. Sci. Tech. **35**: 1, 1-10.
39. **Jetten, M. S. M., Strous, M., van de Pas-Schoonen, K. T., Schalk, J., van Dongen, U. G. J. M., van de Graaf, A. A., Logemann, S., Muyzer, G., van Loosdrecht, M. C. M. y Kuenen, J. G.** 1999. The anaerobic oxidation of ammonium. FEMS Microbiol. Rev. **22**:421-437.
40. **Juliette, L. Y., Hyman, M. R. y Arp, D. J.** 1993. Inhibition of ammonia oxidation in *Nitrosomonas europaea* by sulfur compounds: thioethers are oxidized to sulfoxides by ammonia monooxygenase. Appl. Environ. Microbiol. **59**:3718-3727.
41. **Keener, W. K. y Arp, D. J.** 1993. Kinetic studies of ammonia monooxygenase inhibition in *Nitrosomonas europaea* by hydrocarbons and halogenated hydrocarbons in an optimized whole-cell assay. Appl. Environ. Microbiol. **59**:2501-2510.
42. **Keener, W. K. y Arp, D. J.** 1994. Transformations of aromatic compounds by *Nitrosomonas europaea*. Appl. Environ. Microbiol. **60**:1914-1920.

-
43. **Krieger, C. J., Beller, H. R., Reinhard, M. y Spormann, A. M.** 1999. Initial reactions in anaerobic oxidation of *m*-xylene by the denitrifying bacterium *Azoarcus* sp. Strain T. J. Bacteriol. **181**:6403–6410.
44. **Kroneck, P. M., Beuerle, M. J. y Schumacher, R. W.** 1992. Metal-dependent conversion of inorganic nitrogen and sulfur compounds, p. 455-505. In: H. Siegel and A. Siegel (ed.). Metal ions in biological systems, v. 28. Marcel Dekker, U.S.A.
45. **Liu Y, Yang SF, Tay JH.** 2004. Improved stability of aerobic granules by selecting slow-growing nitrifying bacteria. J- Biotechnol. **108**: 161-9.
46. **Lowry, O. H., Rosen Brough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J.** 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. **193**:265-275.
47. **McCarty, G. W.** 1999. Review article: Modes of action of nitrification inhibitors. Biology and Fertility of Soils. **29**:1-9.
48. **Metcalf y Eddy, Inc.** 1996a. "Chapter 8: Biological Unit Processes" in: Wastewater Engineering: Treatment, Disposal, and Reuse, Third Ed. McGraw-Hill, Inc., New York, NY.
49. **Metcalf y Eddy, Inc.** 1996b. "Chapter 11: Biological Unit Processes" in: Wastewater Engineering: Treatment, Disposal, and Reuse, Third Ed. McGraw-Hill, Inc., New York, NY.
50. **Moat, G. A. y Foster, J. W.** Microbial physiology. 1988. John Wiley and Sons. Singapore.
51. **Monroy, O., Fama, G., Meraz, M., Montoya, L. y Macarie H.** 2000. Anaerobic digestion for wastewater treatment in Mexico: State of the technology. Water Res. **36**:1803-1816.

-
52. **Muller, E. B., Stouthamer, A. H. y Verseveld, H. W.** 1995. Simultaneous NH₃ oxidation and N₂ production at reduced O₂ concentrations by sewage sludge subcultured with chemolithotrophic medium. *Biodegradation*. **6**:339-349.
53. **Pollice, A., Tandoi, V. y Lestingi, C.** 2002. Influence of aeration and sludge retention time ammonium oxidation to nitrite and nitrate. *Water Res.* **36**:2541-2546.
54. **Prosser, J. I.** 1989. Autotrophic nitrification in bacteria. *Adv. Microbiol. Physiol.* **30**:125-181.
55. **Quiang, Y.L, Tay J, H., Ivanov, V, B.Y.P.Moy, L.Yu y S.** 2005. Influence of phenol on nitrification by microbial granules. *Process biochemistry*. **40**: 3285-3289.
56. **Randall, C. W. Barnard, J. L. y Stensel. H. D.** 1992. Design and retrofit of wastewater treatment plants for biological nutrient removal, Technomic Publishing Co., Inc., **5**.
57. **Rasche, M. E., Hicks, R. E., Hyman, M. R. y Arp, D. J.** 1990a. Oxidation of monohalogenated ethanes and n-chlorinated alkanes by whole cells of *Nitrosomoas europaea*. *J. Bacteriol.* **172**:5368-5373.
58. **Rasche, M. E., Hyman, M. R. y Arp, D. J.** 1990b. Biodegradation of halogenated hydrocarbon fumigants by nitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:2568-2571.
59. **Richardson, M.** 1985. Nitrification inhibition in the treatment of sewage. The Royal Society of Chemistry . Thomas Water reading. Burlington House, London, U.K.SAS. Version 6. release 6.02. SAS Institute INC, Cary NC, U.S.A.
60. **Shoun, H. y Tanimoto, T.** 1991. Denitrification by the fungus *Fusarium oxysporum* and involvement of cytochrome P-450 in the respiratory nitrite reduction. *J. Biol. Chem.* **25**:1527-1536.

-
61. **Sikkema, J., de Bont, J. A. M., and Poolman, B.** 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews*. **59**:201-222.
62. **Sliekers, A. O., Derwort, N., Gomez, J. L. C., Strous, M., Kuenen, J. G. Jetten, M. S. M.** 2002. Completely autotrophic nitrogen removal over nitrite in one single reactor. *Water Res.* **36**:2475-2482.
63. **Stafford, D. A.** 1974. The effect of phenols and heterocyclic bases on nitrification in activated sludges. *J. Appl. Bact.* **37**:75-82.
64. **Stouthamer, A.** 1976. Biochemistry and genetics of nitrate reductase in bacteria. *Adv. Microbiol. Physiol.* **14**:315-375.
65. **Surmacz-Górska, J., Cichon, A. y Miksch, K.** 1997. Nitrogen removal from wastewater with high ammonia nitrogen concentration via shorter nitrification and denitrification. *Wat. Sci. Tech.* **36**:73-78.
66. **Suzuki, I., Dular, V. and Kwok, S. C.** 1974. Ammonia or ammonium ion as substrate for oxidation by *Nitrosomonas europaea* cells and extracts. *J. Bacteriol.* **120**:556-558.
67. **Teira, M. R.** 1996. Bases microbiológicas. Microorganismos nitrificantes, desnitrificantes y con capacidad para acumular fósforo. 2º Curso de Ingeniería Ambiental. Eliminación biológica de nutrientes en aguas residuales. Lleida, 28 a 30 de octubre der 2006. pp 1-21.
68. **Texier, A. -C. y Gomez, J.** 2002. Tolerance of nitrifying sludge to *p*-cresol. *Biotechnol. Lett.* **24**:321-324.

-
69. **Texier, A-C y Gomez, J.** 2004. Settleability and kinetics of a nitrifying sludge in a sequencing batch reactor. *J. Microbiol.* **50**: 943-949.
70. **Texier, A-C y Gomez, J.** 2007 Simultaneous nitrification and p-cresol oxidation in a nitrifying sequencing batch reactor. *Water Research* **41**: 315 – 322.
71. **Tijhuis, L., Huisman, H. D., van Loosdrecht, M. y Heijnen, J.** 1995. Formation of nitrifying biofilms on small suspended particles in airlift reactors. *Biotechnol. Bioeng.* **47**:585-595.
72. **Tomlinson, T. G., Boon, A. G. y Trotman, C. N. A.** 1966. Inhibition of nitrification in the activated sludge process of sewage disposal. *J. Appl. Bact.* **29**:266-291.
73. **Tsang, D. C. Y. y Suzuki, I.** 1982. Cytochrome c554 as a possible electron donor in the hydroxylation of ammonia and carbon monoxide in *Nitrosomonas europaea*. *Can J. Biochem.* **60**:1018-1024.
74. **U.S. Environmental Protection Agency (U.S. EPA).** 1980. "Treatability manual. Vol.1. Treatability data." *Rep. No. EPA/600/8-80/042a*, Washington, D.C.
75. **U.S. Environmental Protection Agency (U.S. EPA).** 1997 Special report on environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis. Risk Assessment Forum. Office of Research and Development. United States Environmental Protection Agency, Washington DC.
76. **U.S. Environmental Protection Agency (U.S. EPA).** 1998a. "Carcinogenic effects of benzene: An update." *Rep. No. EPA/600/P-97/001F*, Washington, D.C.
77. **U.S. Environmental Protection Agency (U.S. EPA).** 2001. National Primary drinking water regulations. *Federal Register*, **19**:141.

-
78. **Van Loosdrecht, M. C. M. y Jetten, M. S. M.** 1998. Microbial conversions in nitrogen removal. *Water Sci. Technol.* **38**:1-7.
79. **Van Niel, E.W.J., Robertson, L.A., Kuenen, J.G.,** 1993. A mathematical description of the behaviour of mixed chemostat cultures of an autotrophic nitrifier and a heterotrophic nitrifier/aerobic denitrifier; a comparison with experimental data. *FEMS Microbiol. Ecol.* **102**: 99–108.
80. **Vannelli, T., Logan, M., Arciero, D. M. y Hooper, A. B.** 1990. Degradation of halogenated aliphatic compounds by ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:1169-1171.
81. **Vannelli, T. y Hooper, A. B.** 1992. Oxidation of nitrapyrin to 6-chloropicolinic acid by ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:2321-2325.
82. **Vannelli, T. y Hooper, A. B.** 1993. Reductive dehalogenation of the trichloromethyl group of nitrapyrin by the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:3597-3601.
83. **Voysey, P. A. y Wood, P. M.** 1987. Methanol and formaldehyde oxidation by an autotrophic nitrifying bacterium. *J. Gen. Microbiol.* **33**:283-290.
84. **Wiesmann, U.** 1994. Biological nitrogen removal from wastewater.. In: Fiechter, A. (ed.). *Advances in biochemical engineering/biotechnology*. Springer Verlag, Berlin. p. 113-154.
85. **Wilderer, A. P., R.L. Irvine; M.C.Goronszy.** 2002. *Sequencing Batch Reactor Technology*. IWA Publishing.

-
86. **Yadav, J. S. y Reddy, C. A.** 1993. Degradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes (BTEX) by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:756-762.
87. **Yamagishi, T., Leite, J., Ueda, S., Yamaguchi, F., Suwa, Y.,** 2001. Simultaneous removal of phenol and ammonia by an activated sludge process with cross-flow filtration. *Water Res.* **35**: 3089–3096
88. **Zepeda, A., Texier, A.-C. y Gomez, J.** 2003. Benzene transformation in nitrifying batch cultures. *Biotechnol. Prog.* **19**: 789–793.
89. **Zepeda A.** 2005. Efecto del benceno, tolueno y m-xileno sobre un cultivo nitrificante. Tesis de Doctorado. México, D.F.
90. **Zepeda, A., Texier, A.-C., Razo-Flores, E., Gomez, J.,** 2007. Kinetic and metabolic study of benzene, toluene, and m-xylene in nitrifying batch cultures. *Water Res.* **40**: 1643–1649.
91. **Zumft, W.G.** 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**: 533-616.

ANEXO 1

Cinéticas realizadas con concentración de 25 a 150 mg/L•ciclo

