

**EFFECTO DE UNA MEZCLA DE FENOL, O-CRESOL,
P-CRESOL Y M-CRESOL SOBRE EL PROCESO
NITRIFICANTE DE UN CONSORCIO MICROBIANO
EN UN REACTOR SECUENCIAL DISCONTINUO**

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS
NATURALES TROPICALES**

POR:

**Licenciada en Química Industrial
Adriana Sosa Farfán**

Asesores:

**Dr. Alejandro Zepeda Pedreguera
M. en C. Diana Yamily Escalante Réndiz**

Mérida, Yuc., México, septiembre del 2016.

**POSGRADO INSTITUCIONAL EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y MANEJO
DE RECURSOS NATURALES TROPICALES**

Alumna: Adriana Sosa Farfán

Votos aprobatorios del sínodo

Dr. Rafael Rojas Herrera
Presidente

M en C. Aracely González Burgos
Secretario

Dra. María Del Carmen
Ponce Caballero
Vocal

Dra. Elizabeth Vázquez Borges
Suplente

Dra. Karla Y. Acosta Viana
Suplente

**Km. 15.5 carretera Mérida-X´matkuil, Apdo. Postal 4-116 Itzinná Mérida, Yucatán.
Tel (999) 9-42-32-00 Fax 9 42-32-05**

DECLARATORIA

El presente trabajo no ha sido aceptado o empleado para el otorgamiento de título o grado diferente o adicional al actual. La tesis es resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas. El autor otorga su consentimiento a la UADY para la reproducción del documento con el fin de intercambio bibliotecario siempre y cuando se indique la fuente.

DEDICATORIA

A mi padre.

A mi familia.

AGRADECIMIENTO

Al Dr. Alejandro Zepeda Pedreguera por su asesoría y paciencia.

A la M. en C. Diana Escalante Réndiz por despertar mi interés por la ciencia.

Al personal de los laboratorios de Biotecnología e Instrumental de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de Yucatán.

A la Dra. Carmen Ponce y al Dr. Rafael Rojas por sus recomendaciones.

Al CONACyT por haber financiado la elaboración de este trabajo a través del proyecto titulado “Estudio de la factibilidad de compuestos nano y microestructurados en la eliminación de metales pesados y compuestos fenólicos presentes en el agua y su efecto en el medio ambiente”. Ciencia Básica 2011. Clave: 169563.

RESUMEN

Se realizó el estudio cinético del proceso nitrificante de un consorcio microbiano en presencia de distintas concentraciones de carbono (C/L) de una mezcla de fenol, *o*-cresol, *m*-cresol y *p*-cresol (40 mg C/L y 0-320 mg C/L) en un reactor secuencial discontinuo (SBR por sus siglas en inglés). Primero se evaluó el proceso nitrificante en ausencia de la mezcla (control 1) en un SBR con volumen de trabajo de 2L y 176 mg/L de nitrógeno de proteína microbiana, obteniendo una oxidación total de amonio (eficiencia; $E_{NH_4^+}$ del 100 %) a nitrato (rendimiento; $Y_{NO_3^-}$ de 0.95) con una velocidad específica de consumo de amonio ($q_{N-NH_4^+}$) y producción de nitrato ($q_{N-NO_3^-}$) de $1.11 \pm 0.04 \text{ h}^{-1}$ y $0.67 \text{ h}^{-1} \pm 0.11$ respectivamente. Durante la fase de aclimatación con 40 mg C/L de la mezcla, se observó un efecto inhibitorio sobre el proceso nitrificante que provocó una disminución en $E_{NH_4^+}$ y $Y_{NO_3^-}$ de 11 y 54 % respectivamente, como también en las velocidades específicas (89 y 46%), siendo las bacterias amonio oxidantes (BAO) las más afectadas. Sin embargo, en los ciclos siguientes en ausencia de la mezcla (control 2) el consorcio recuperó su capacidad nitrificante ($E_{NH_4^+} = 100\%$ y $Y_{NO_3^-} = 0.98$). Después el SBR fue alimentado con 10 mg C/L de la mezcla obteniendo una $E_{NH_4^+}$ del 100%, un $Y_{NO_3^-}$ de 0.62 ± 0.006 (-36%) mientras que los valores de $q_{N-NH_4^+}$ y $q_{N-NO_3^-}$ fueron de 0.13 ± 0.004 y 0.49 ± 0.007 , correspondientes a una disminución del 87% y un aumento del 48% respectivamente comparado con los valores del control 2 (C2). No obstante, con el incremento de la concentración de la mezcla (10-160 mg C/L) y el número de ciclos, el consorcio oxidó el amonio con una $E_{NH_4^+}$ del 100% y $Y_{NO_3^-}$ cercano a uno. Bajo estas condiciones, en general se observó que aunque $q_{N-NH_4^+}$ y $Y_{NO_3^-}$ disminuyeron, las velocidades específicas en la oxidación de los compuestos fenólicos aumentaron (de 70 a 94%). Finalmente, en presencia de 320 mg C/L el consorcio fue capaz de oxidar simultáneamente el amonio ($E_{NH_4^+} = 100\%$) y la mezcla (*p*-cresol>fenol>*m*-cresol>*o*-cresol) siendo el *o*-cresol el compuesto más recalcitrante. En todo el experimento el uso del SBR permitió una adaptación en la respiración del consorcio a la presencia de la mezcla aunque las BAO mostraron ser las más afectadas en comparación con las bacterias nitrito oxidantes (BNO).

Palabras clave: Cresoles, fenol, inhibición, nitrificación, reactor secuencial discontinuo

SUMMARY

A kinetic study on the nitrifying process in presence to different concentrations of carbon from a mixture of phenol, *o*-cresol, *m*-cresol and *p*-cresol (40 mg C/L and 0-320 mg C/L) in a sequencing batch reactor (SBR) was realized. Firstly, the nitrifying process was evaluated in absence of the phenolic mixture (control 1) in a SBR with 2 L of volume work and 176 mg/L of nitrogen of microbial protein, obtaining a total oxidation of ammonium (efficiency; $E_{NH_4^+}$ of 100 %) to nitrate (nitrifying yield; $Y_{NO_3^-}$ of 0.95) with a specific rates of ammonium consumption ($q_{N-NH_4^+}$) and nitrate production ($q_{N-NO_3^-}$) of $1.11 \pm 0.04 \text{ h}^{-1}$ and $0.67 \text{ h}^{-1} \pm 0.11$ respectively. During acclimation phase with 40 mg C/L of the mixture, it was observed an inhibitory effects on the nitrifying process which provoke the decreased in $E_{NH_4^+}$ and $Y_{NO_3^-}$ of 11 and 54 % respectively, as well as in the specific rates of nitrifying processes (89 y 46% respectively), being the ammonia oxidizing bacteria (AOB) the most affected. However, in the next cycles without the mixture (control 2) the consortium recovered his nitrifying capacity ($E_{NH_4^+} = 100\%$ and $Y_{NO_3^-}=0.98$). Afterwards the SBR was fed with 10 mg C/L of the mixture on the SBR, obtaining $E_{NH_4^+}$ of the 100%, $Y_{NO_3^-}$ of 0.62 ± 0.006 (-36%) while the values of $q_{N-NH_4^+}$ and $q_{N-NO_3^-}$ where 0.13 ± 0.004 and 0.49 ± 0.007 , corresponding to a decrease of 87% and an increase of 48% respectively compared with the values of control 2. Moreover, with the increase of the phenolic concentrations and the number of cycles (10-160 mg C/L) the consortium was able to oxidize the ammonia with $E_{NH_4^+}$ of 100 % and $Y_{NO_3^-}$ close to one. Under these conditions, in general we note that even the specific rates of nitrification decreased the specific rates in the oxidation in phenolic compound increased (70 to 94%). Finally, in presence of 320 mg C/L the consortium was able to simultaneously oxidize the ammonia ($E_{NH_4^+} = 100\%$) and the mixture (*p*-cresol>phenol>*m*-cresol>*o*-cresol) being the *o*-cresol the most recalcitrant compound. In all the experiment the use of the SBR allow a respiratory adaptation of the consortium to the presence of the mixture even the AOB show to be the most affected in compare with the nitrate oxidizing bacteria (NOB).

Keywords: Cresols, phenol, inhibition, nitrification, sequencing batch reactor

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN DE LA LITERATURA.....	3
2.1. Contaminación por compuestos nitrogenados y fenólicos.....	3
2.2. Efectos en la salud de los compuestos nitrogenados y fenólicos.....	5
2.3. Eliminación biológica de compuestos nitrogenados	6
2.3.1. Nitrificación	8
2.3.2. Desnitrificación	8
2.3.2.1 Fisiología y bioquímica de los microorganismos nitrificantes.....	9
2.4. Reactor Secuencial Discontinuo SBR	10
2.5. Factores ambientales que afectan la nitrificación.....	12
2.5.1. Efecto del pH y temperatura	13
2.5.2. Efecto del sustrato	14
2.5.3. Efecto de la materia orgánica.....	14
2.5.3.1 Efecto de compuestos fenólicos.....	15
2.5.3.2 Biotransformación de compuestos fenólicos.....	16
2.5.3.3 Características físicas y químicas de los compuestos fenólicos.....	17
3. OBJETIVOS	18
3.1 Objetivo general.....	18
3.2 Objetivos particulares.....	18
4. REFERENCIAS	19
5. ARTÍCULO.....	26
Resumen.....	26
1. Introducción	27
2. Materiales y métodos.....	28
2.1 <i>Inóculo y composición de los medios de cultivo</i>	28
2.2 <i>Operación del reactor secuencial discontinuo</i>	28
2.3 <i>Métodos analíticos</i>	30
3. Resultados.....	30
3.1 <i>Comportamiento del proceso nitrificante en ausencia de la mezcla fenólica</i>	30

3.2	<i>Aclimatación del consorcio microbiano a la presencia de la mezcla fenólica.....</i>	31
3.3	<i>Recuperación del consorcio microbiano nitrificante.....</i>	32
3.4	<i>Efecto de la mezcla fenólica sobre el proceso nitrificante.....</i>	32
3.5	<i>Oxidación de la mezcla fenólica.....</i>	34
4.	Discusiones	37
5.	Conclusiones	41
6.	Referencias.....	42
6.	ANEXOS.....	45

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página.
Figura I. Componentes del ciclo del Nitrógeno (modificado de Beristain <i>et al.</i> , 2009).....	7
Figura II. Estructura química de los compuestos fenólicos.	17
Figura 1. Caracterización del proceso nitrificante en ausencia de la mezcla cuaternaria de fenoles.	31
Figura 2. Efecto de la mezcla fenólica sobre el proceso nitrificante durante la aclimatación.	32
Figura 3. Cinética de oxidación de la mezcla fenólica en los distintos ciclos de operación del SBR: a) aclimatación (40 mg C/L), b) 10 mg C/L, c) 40 mg C/L, d) 160 mg C/L.....	36
Figura 4. Comportamiento del proceso nitrificante en ausencia de la mezcla fenólica (C2) después de la aclimatación.	45
Figura 5. Comportamiento del proceso nitrificante durante la adición de 10 mg C/L de la mezcla fenólica.	45
Figura 6. Comportamiento del proceso nitrificante después de 16 ciclos con 10 mg C/L de la mezcla fenólica.	46
Figura 7. Comportamiento del proceso nitrificante en presencia de 20 mg C/L de la mezcla fenólica.....	46
Figura 8. Comportamiento del proceso nitrificante en presencia por vez primera de 40 mg C/L de la mezcla fenólica.....	47
Figura 9. Comportamiento del proceso nitrificante en presencia por vez primera de 80 mg C/L de la mezcla fenólica.....	47
Figura 10. Comportamiento del proceso nitrificante en presencia por vez primera de 160 mg C/L de la mezcla fenólica.....	48
Figura 11. Comportamiento del proceso nitrificante en presencia de 320 mg C/L de la mezcla fenólica.	48

ÍNDICE DE CUADROS

	Página.
Cuadro I. Valores reportados de amonio en las aguas costeras de Yucatán.	3
Cuadro II. Concentraciones reportadas de fenoles en aguas residuales de diversas industrias.	4
Cuadro III. Clasificación de los compuestos fenólicos según la lista 2013 de la ASTDR. ...	6
Cuadro IV. Estudios de nitrificación en SBR en presencia de compuestos fenólicos.....	12
Cuadro V. Efecto del pH y temperatura en la eficiencia de la nitrificación.	13
Cuadro VI. Concentraciones inhibitorias de amoniaco y ácido nitroso sobre la nitrificación.	14
Cuadro VII. Estudios reportados de inhibición en la nitrificación por compuestos fenólicos.	15
Cuadro VIII. Estudios realizados con los compuestos fenólicos de interés.....	16
Cuadro IX. Propiedades físicas y químicas de los compuestos fenólicos.....	17
Cuadro 1. Condiciones de operación del SBR.	29
Cuadro 2. Variables respuesta del proceso nitrificante en presencia de la mezcla fenólica.	33
Cuadro 3. Velocidades de oxidación específicas de la mezcla fenólica y porcentajes de remoción de materia orgánica.....	35

ABREVIATURAS

AMO. Amonio Oxigenasa.

ATSDR. Agencia para Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades.

BAO. Bacterias Amonio Oxidantes.

BNO. Bacterias Nitrito Oxidantes.

DQO. Demanda Química de Oxígeno.

$E_{NH_4^+}$. Eficiencia nitrificante.

EPA. Agencia de Protección Ambiental.

HOR. Hidroxilamina Oxido Reductasa.

NID. Nitrógeno Inorgánico Disuelto.

NOR. Nitrito Oxido Reductasa.

OD. Oxígeno Disuelto.

OMS. Organización Mundial de la Salud.

$q_{N-NH_4^+}$. Velocidad específica de consumo de oxidación de amonio.

$q_{N-NO_3^-}$. Velocidad específica de formación de nitrato.

q_{fenol} . Velocidad específica de oxidación del fenol.

$q_{m-cresol}$. Velocidad específica de oxidación del *m*-cresol.

$q_{o-cresol}$. Velocidad específica de oxidación del *o*-cresol.

$q_{p-cresol}$. Velocidad específica de oxidación del *p*-cresol.

SBR. Sequencing Batch Reactor, por sus siglas en inglés.

$Y_{NO_3^-}$. Rendimiento Nitrificante.

1. INTRODUCCIÓN

En décadas recientes, el mundo está enfrentando las consecuencias del desarrollo incontrolable de actividades humanas (industria, transporte, agricultura y urbanización) que producen aguas residuales con diversos contaminantes. En la actualidad, estos contaminantes continúan causando graves cambios al agua, aire, suelo, recursos naturales, ecosistemas y salud (Gavrilescu, 2010). Algunos de estos contaminantes son los compuestos nitrogenados que causan eutrofización, reducción del oxígeno disuelto y toxicidad en los organismos acuáticos, por lo que deben ser eliminados de las aguas residuales antes de su descarga al medio ambiente (Cortés et al., 2015; Dytczak, et al., 2008). La remoción de contaminantes nitrogenados se ha realizado por más de 100 años mediante tratamientos biológicos, uno de estos tratamientos es la nitrificación, el cual se ve afectado por la presencia de fenoles que también derivan de los procesos industriales como refinación de petróleo, manufactura de fármacos, plásticos, pintura e industria de madera y papel (Xiao et al., 2015). Se ha reportado la presencia simultánea de compuestos nitrogenados y fenólicos en aguas industriales a concentraciones de hasta 120 g/L de cresoles totales y 1500 mg/L de nitrógeno amoniacal (Texier y Gómez, 2002) lo que representa un problema al momento de tratar estas aguas residuales porque es necesario eliminar previamente los compuestos fenólicos antes de iniciar con el proceso de nitrificación, esto a su vez significa que se requiere una infraestructura compleja y por lo tanto un mayor costo. Debido a esta necesidad han surgido varios estudios con el fin de proponer un tratamiento simple para la eliminación simultánea de estos contaminantes pues es una opción necesaria para resolver este tipo de problemas (Ge et al., 2015).

A pesar de que existen numerosos estudios sobre la eliminación simultánea de compuestos fenólicos y nitrogenados utilizando bacterias nitrificantes, estos se limitan al estudio de la presencia de compuestos fenólicos de manera individual, dejando a un lado el comportamiento fisiológico de un consorcio nitrificante expuesto a una mezcla de dos o más compuestos fenólicos. Por tal motivo el objetivo principal de este trabajo es evaluar el efecto de una mezcla de compuestos fenólicos sobre el proceso de nitrificación de un consorcio microbiano en un reactor secuencial discontinuo, con el fin de aportar

conocimientos que en un futuro puedan ser empleados en los procesos de biorremediación de aguas contaminadas con mezclas de compuestos tanto fenólicos como nitrogenados.

2. REVISIÓN DE LA LITERATURA

2.1. Contaminación por compuestos nitrogenados y fenólicos

El nitrito, nitrato y amoníaco, denominados nitrógeno inorgánico disuelto (NID) son las formas iónicas (reactivas) de nitrógeno inorgánico más comunes en los ecosistemas acuáticos. Estas formas se encuentran de forma natural como resultado de la deposición atmosférica, la descomposición biológica de la materia orgánica y la fijación de nitrógeno por parte de los microorganismos. Sin embargo, las actividades antropogénicas han alterado esta composición de manera que se ha incrementado su disponibilidad en muchas regiones (Camargo y Alonso, 2007; Zehr y Ward, 2002). Tal es el caso de las aguas costeras de algunos puertos de Yucatán, donde en el transcurso de dos años se ha observado un incremento en la concentración de amonio. De manera que en algunos sitios se rebasa el límite máximo permitido (0.50 mg/L de N amoniacal) para que no cause efectos tóxicos en los organismos (NOM-127-SSA1-1994). En el Cuadro I se presentan los valores reportados de las concentraciones de amonio en algunos puertos de Yucatán.

Cuadro I. Valores reportados de amonio en las aguas costeras de Yucatán.

Puerto	Concentración de amonio mg/L	Fuente
Celestún	0.62	Aranda et al., 2006
	0.09	Herrera et al., 2004
Chelem	0.39	González et al., 2008
Dzilam de Bravo	0.43	Aranda et al., 2006
	0.08	Herrera et al., 2004
Progreso	0.42	Aranda et al., 2006
	0.09	Herrera et al., 2004
Sisal	0.76	Aranda et al., 2006
	0.08	Herrera et al., 2004

La contaminación por nitrógeno inorgánico en los ecosistemas acuáticos se asocia principalmente a los siguientes problemas medioambientales: 1) acidificación de ríos y lagos; 2) eutrofización de aguas dulces y marinas; y 3) toxicidad de estos compuestos para los seres vivos acuáticos. Además la contaminación por nitrógeno inorgánico puede ejercer efectos negativos en la salud humana (Camargo y Alonso, 2007).

Por otro lado, las aguas industriales además de contener contaminantes nitrogenados también contienen fenoles que surgen de los procesos industriales como el refinamiento de petróleo, la fabricación de productos petroquímicos, farmacéuticos, plásticos, productos de madera, pintura y las industrias de la celulosa y el papel (Figuerola y Erijman, 2010). Por ejemplo, en las aguas ácidas de la industria petroquímica es común encontrar concentraciones mayores a 60 mg/L de fenol y 710 mg/L de nitrógeno amoniacal (Olmos et al., 2004), mismas que sobrepasan los límites máximos permisibles (25 mg/L de N total y 0.5 mg/L de fenoles) para poder ser descargadas sin que causen daño a los organismos vivos (NOM-001-SEMARNAT-1996; NOM-CCA-003-ECOL/1993).

Es por eso que estas aguas deben ser tratadas antes de ser vertidas al ambiente, de lo contrario el efecto de los fenoles sobre el proceso natural nitrificante provocaría una acumulación de amonio en el medio ambiente. En el Cuadro II se presentan concentraciones reportadas de estos contaminantes en aguas residuales de industrias del petróleo y de alimentos.

Cuadro II. Concentraciones reportadas de fenoles en aguas residuales de diversas industrias.

Industria/sitio	Concentración en mg/L					Referencias
	Amonio	Fenol	<i>o</i> -cresol	<i>m</i> -cresol	<i>p</i> -cresol	
Refinería de Tula/ Hidalgo, México	710	1,200	20		60	Olmos et al, 2004
Planta de desgasificación del carbón/ Harbin China	182-259	342-487	-	-	-	Li et al., 2011
Burra Foods/ Australia	4.5	-	-	0.0285	-	Heaven et al. 2011
Refinería Al-Dauri/ Irak	94	-	-	-	-	Farhod, 2013

2.2.Efectos en la salud de los compuestos nitrogenados y fenólicos.

La descarga de aguas residuales con concentraciones altas de amonio representa un serio daño ambiental y en la salud, debido a que el amonio es rápidamente oxidado por los microorganismos del medio hasta nitritos y nitratos, estos se acumulan en el medio causando problemas de eutrofización. El amonio es tóxico para los peces y el consumo de agua contaminada con nitritos y nitratos causa daños en la salud, ya que el contacto de estos compuestos con las bacterias intestinales provoca la formación de nitrosaminas, compuestos asociados al desarrollo de cáncer (De Miguel y Vázquez, 2006). Por otro lado, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha confirmado que una concentración del ion nitrato (NO_3^-) por arriba de 50 mg/L puede provocar intoxicación en lactantes, debido a que el nitrato al convertirse en nitrito en el aparato gastrointestinal es transferido a la sangre en donde reacciona con el ion ferroso (Fe^{2+}) de la desoxihemoglobina convirtiéndola a metahemoglobina en donde el hierro se encuentra en estado férrico (Fe^{3+}) y por lo tanto es incapaz de transportar el oxígeno, generando cianosis (Guías para la calidad del agua potable de la OMS, 2006).

En cuanto a los compuestos fenólicos, se ha reportado que concentraciones de 5-25 ppm daña letalmente a peces (Ge et al., 2015), además la Agencia para Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades (ATSDR por sus siglas en inglés) en el 2008 reportó que la respiración y contacto de compuestos fenólicos ocasiona irritación así como su ingestión causa daños gastrointestinales, renales e incluso la muerte.

La Agencia de Protección Ambiental (EPA por sus siglas en inglés) ha clasificado a los compuestos fenólicos como potencialmente cancerígenos y en el Acta de Agua Limpia de los Estados Unidos de América el fenol y los cresoles han sido registrados como contaminantes prioritarios basados en el grado de carcinogenicidad, mutagenicidad, teratogenicidad, bioacumulación y persistencia (ATSDR, 2008). En el Cuadro III se puede observar la posición que ocupan los compuestos fenólicos en la lista de los 275 compuestos tóxicos según la ATSDR.

Cuadro III. Clasificación de los compuestos fenólicos según la lista 2013 de la ASTDR.

Puesto	Nombre del compuesto	Puntaje total de toxicidad
172	<i>p</i> -cresol	703.2
180	Fenol	686.1
195	<i>o</i> -cresol	652.4
241	Cresoles	596.7

Debido a que la composición de las aguas residuales industriales representa un gran reto para su tratamiento, se ha considerado a la nitrificación como una alternativa para eliminar simultáneamente ambos contaminantes con el fin de reducir los costos en el tratamiento. Es por eso que existen varios estudios donde se evalúa el proceso de nitrificación como tratamiento biológico, en presencia de fenoles con el fin de explicar el efecto que estos compuestos ejercen sobre la eficiencia y rendimiento nitrificantes y así proponer métodos que resuelvan futuros problemas ambientales (Silva et al., 2011; Ge et al., 2015).

2.3. Eliminación biológica de compuestos nitrogenados

Es importante tener presente que los métodos fisicoquímicos no siempre resuelven el problema ya que trasladan el contaminante de un lugar a otro, mientras que los biológicos logran eliminar al contaminante teniendo como productos CO₂ y N₂, además se considera la alternativa más económica (Demirbas, 2009). Entre los diversos métodos para el tratamiento de aguas residuales, la eliminación autótrofa de nitrógeno (nitrificación) ha sido ampliamente utilizada, seguida por la desnitrificación (heterótrofa); estos procesos en conjunto (Figura 1) eliminan los compuestos nitrogenados y compuestos carbonados tales como los compuestos aromáticos (fenoles, cresoles, xileno, tolueno, etc.) los cuales pueden ser utilizados como fuente de carbono y energía por los microorganismos heterótrofos o litótrofos (Farhadian et al., 2008; Hiscock et al., 1991). Por consiguiente existe un gran número de estudios centrados en esta área con el fin de resolver los problemas que se

generan debido a la acumulación en exceso de los compuestos nitrogenados que impiden cumplir con los estándares de las normas ambientales (Cervantes et al., 2000).

Tanto la nitrificación como la desnitrificación forman parte del ciclo del nitrógeno (Figura 1), y son realizadas por microorganismos que se encargan de, en el caso de la nitrificación, oxidar al amoníaco hasta nitrato el cual posteriormente servirá como sustrato para ser reducido en el proceso de desnitrificación hasta nitrógeno elemental.

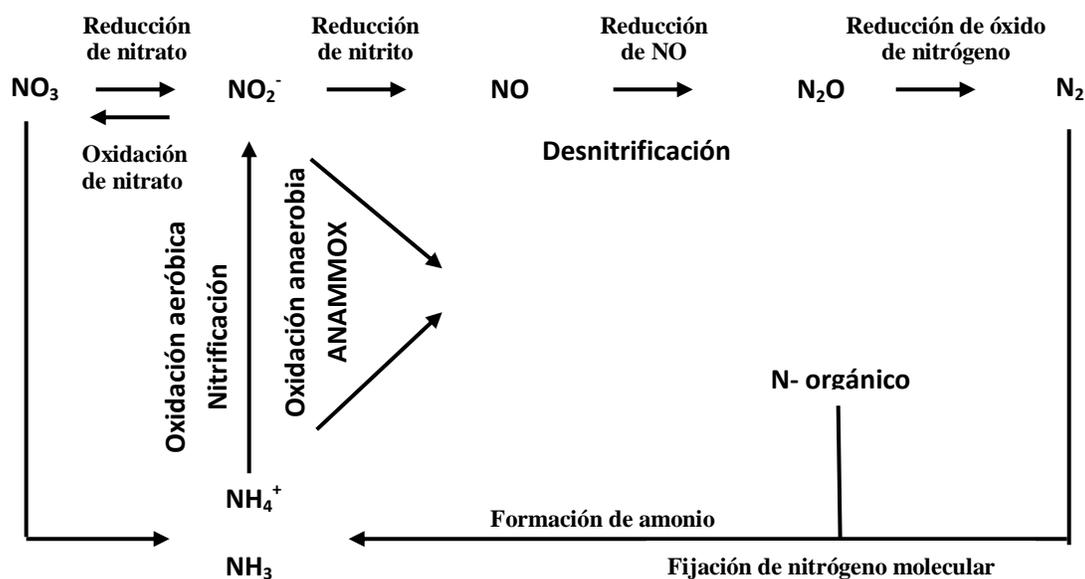


Figura I. Componentes del ciclo del Nitrógeno (modificado de Beristain et al., 2009).

Como se puede observar en la figura 1, el ciclo del nitrógeno inicia con la reducción del nitrógeno atmosférico (N_2) a amonio (NH_4^+), seguido por la nitrificación, conversión de amonio a nitrato que a su vez puede ser aeróbica o anaeróbica. El nitrato se reduce a N_2 mediante el proceso de respiración anóxica denominado desnitrificación, lo que completa el ciclo del N_2 en la biosfera. En condiciones anaerobias puede darse la reducción de nitrato a amonio mediante procesos asimilativos o no asimilativos. La mayor parte de los conocimientos de este ciclo se han obtenido a través del estudio de las transformaciones que ocurren en experimentos con cultivos axénicos (Zehr y Ward, 2002).

2.3.1. Nitrificación

La nitrificación, es la oxidación de amoníaco hasta nitrato, es un proceso fisiológico aerobio realizado en dos etapas por microorganismos gram-negativos quimiolitautótrofos pertenecientes a la familia Nitrobacteriaceae (Arp, Chain y Klotz, 2007). Ocupa un lugar importante en los procesos biológicos de tratamiento de aguas, donde los microorganismos pertenecientes a dos géneros de bacterias: *Nitrosomonas* y *Nitrobacter* actúan en conjunto; en la etapa 1, las bacterias amonio oxidantes (BAO) consumen el oxígeno para producir nitrito (NO_2^-), mientras que en la etapa 2, las nitrito oxidantes (BNO), oxidan el nitrito para formar NO_3^- (Jaranowska et al., 2013).

A pesar de que las BAO se consideran quimiolitautotróficas, diversos estudios han demostrado que son capaces de utilizar compuestos orgánicos como fuente de carbono e incluso tienen el potencial de iniciar la remoción de ciertos contaminantes (Arp et al., 2001).

2.3.2. Desnitrificación

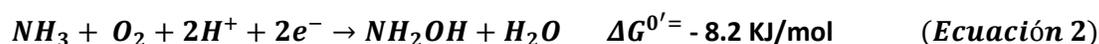
Una vez que se ha oxidado el amonio a nitrato, el paso siguiente es su reducción hasta nitrógeno elemental (N_2) mediante la desnitrificación biológica (Knowles, 1982; Thomsen et al., 1994), proceso respiratorio heterotrófico de tipo anóxico, en donde se involucra la actividad de varias enzimas. Los géneros más citados incluyen: *Alcaligenes*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Thiobacillus*, y *Thiosphaera*, la mayoría son heterótrofos pero algunos pueden utilizar autotróficamente el hidrógeno y CO_2 (Tiedje, 1988). El primer paso para llevar a cabo la desnitrificación, es la reducción de nitrato (NO_3^-) a nitrito (NO_2^-) por medio de la enzima nitrato reductasa, de la cual se han identificado dos tipos: una membranal y otra periplasmática (Berks et al., 1995; Siddiqui et al., 1993). El siguiente paso incluye la reducción de NO_2^- a NO por acción de la enzima nitrito reductasa, de la cual se han identificado dos tipos, la que contiene cobre y la que contiene el hemo Cd_1 (Jetten et al., 1997). A continuación se lleva a cabo la reducción de NO a N_2O , catalizada por la óxido nítrico reductasa, localizada en la membrana citoplasmática (Goretski y Hollocher, 1990). En el último paso se lleva a cabo la reducción de N_2O a N_2 por medio de la enzima óxido

nitroso reductasa localizada en el periplasma (Andrew et al., 1994; Coyle et al., 1985). Como esta enzima es severamente inhibida por la presencia de O₂ (Ferguson, 1994), es importante evitar la presencia de O₂ en el proceso desnitrificante que produce la liberación de N₂O, gas que contribuye al efecto invernadero (Hong et al., 1993).

2.3.2.1 Fisiología y bioquímica de los microorganismos nitrificantes

En la primera etapa de la nitrificación (Ec. 1, reacción global) ocurre la oxidación de amoníaco a nitrito realizada por bacterias de los géneros *Nitrosomonas* y *Nitrosolabus*, entre otras. Se involucran dos pasos: en el primero (Ec. 2) se oxida el amoníaco a hidroxilamina mediante la enzima amonio oxigenasa (AMO), la cual se encuentra en la membrana. En el segundo paso la hidroxilamina es convertida a nitrito mediante la hidroxilamina oxido-reductasa (HOR) localizada en el espacio periplásmico (Ec. 3) (Kowalchuk y Stephen, 2001). Se tiene evidencia de que el sustrato que las BAO utilizan es el amoníaco y no el amonio, y además dos de los electrones producidos en la segunda reacción (Ec. 3) se utilizan para compensar los utilizados en la primera (Ec. 2), mientras que los dos sobrantes son pasados a la cadena respiratoria para obtener energía.

A continuación se resumen las reacciones.



En la segunda etapa (ecuación 4), el nitrito es oxidado a nitrato por medio del complejo enzimático nitrito oxido reductasa (NOR). Debido a que la energía es menor en la oxidación de nitrito que en la oxidación de amonio las BNO crecen menos que las BAO, es

por eso que las BAO tienen tiempos de duplicación de entre 7 y 24 h mientras que las BNO entre 10 y 140 h (Brock y Madigan, 1991).



Las variables respuesta en el proceso de nitrificación son la eficiencia $E_{\text{NH}_4^+}$ y rendimiento $Y_{\text{N-NO}_3^-}$, y se definen a continuación:

$$E_{\text{NH}_4^+} = \frac{g \text{ N-NH}_4^+ \text{ consumido}}{g \text{ N-NH}_4^+ \text{ Inicial}} \times 100 \qquad Y_{\text{N-NO}_3^-} = \frac{g \text{ N-NO}_3^- \text{ producido}}{g \text{ N-NH}_4^+ \text{ consumido}}$$

Generalmente, la nitrificación se considera como la etapa limitante del tratamiento biológico de aguas residuales debido a la baja tasa de crecimiento de los organismos que participan en este proceso (Bassin et al., 2012), es por eso que en la actualidad se sugiere el empleo de sistemas dinámicos que permitan una estabilidad a estos microorganismos, dentro de estos se encuentra el reactor secuencial discontinuo (SBR por sus siglas en inglés) que gracias a sus condiciones de operación permiten lograr un proceso completo de nitrificación.

2.4. Reactor Secuencial Discontinuo SBR

El uso de reactores secuenciales discontinuos (SBRs) ha demostrado una buena efectividad en el tratamiento de efluentes que poseen sustancias inhibidoras y altas cargas orgánicas, lográndose remociones importantes de nitrógeno, fósforo y carbono inorgánico (Moreno y Buitrón, 2006). Además su flexibilidad operativa ha permitido su uso en tratamientos de aguas residuales incluyendo el proceso de nitrificación. Estos reactores trabajan en un sólo ciclo constituido de varias operaciones: llenado, agitación, aireación, sedimentación, clarificación y vaciado; de manera que se pueden llevar a cabo varios procesos (Amashta y García, 2005).

Texier y Gómez (2004) observaron que el SBR permitió un incremento en la estabilidad fisiológica de consorcios bacterianos tales como los nitrificantes (que poseen lento crecimiento) debido al incremento de las velocidades de respiración amonio y nitrito-oxidantes, a su vez en el 2007, estudiaron la eficiencia de consumo de amonio ($E\text{-NH}_4^+$) en presencia de *p*-cresol a concentraciones de 150 mg/L, observando que inicialmente la nitrificación fue afectada en un 70%, pero a medida que los ciclos aumentaban, la eficiencia de consumo de amonio incrementó hasta alcanzar el 100% de la oxidación de amonio (Texier y Gómez, 2007). Por otro lado, Moreno y Buitrón (2006), realizaron estudios para evaluar la degradación del 4-clorofenol como fuente de carbono en un SBR, reportando una eficiente biodegradación de este compuesto sin importar las variaciones de concentración del 4-clorofenol, manteniendo valores máximos en las velocidades de degradación fenólica durante todo el ciclo de reacción. Otros estudios han demostrado que el incremento en el número de ciclos propicia un aumento en la velocidad de degradación de los compuestos fenólicos debido a la adaptación de los microorganismos a la presencia del compuesto fenólico (Beristain et al., 2009), por ejemplo Silva et al. (2014) observaron que la velocidad de consumo del carbono del *p*-cresol (*C-p*-cresol) incrementó de 30 ± 4 mg *C-p*-cresol/ g biomasa.h en el ciclo 106 a 160 mg *C-p*-cresol/ g biomasa.h en el ciclo 226.

Sin embargo, a pesar de los estudios realizados hasta el momento, existe escasa información sobre el comportamiento fisiológico de los microorganismos nitrificantes al ser expuestos simultáneamente a más de un compuesto fenólico en reactores dinámicos tales como el SBR, por lo que es necesario realizar más esfuerzos sobre este aspecto con el objetivo de establecer un mayor conocimiento del proceso respiratorio nitrificante, en presencia de diversas fuentes orgánicas recalcitrantes tales como como los compuestos fenólicos.

En el Cuadro IV se presentan algunos estudios del proceso nitrificante en SBR en presencia de compuestos fenólicos.

Cuadro IV. Estudios de nitrificación en SBR en presencia de compuestos fenólicos.

Compuesto estudiado	Concentración mg C/L	Eficiencia (%)	Rendimiento ($Y_{NO_3^-}$)	Referencias
<i>p</i> -hidroxibenzaldehido	400	99.2 ± 1.5	0.97 ± 0.03	Téllez et al., 2013
<i>m</i> -cresol	150	98 ± 2	0.86 ± 0.05	Zepeda et al., 2013
<i>p</i> -cresol	150	99.7 ± 2.5	0.92 ± 0.05	Texier y Gómez, 2007
	200	99 ± 0.5	0.98 ± 0.7	

2.5. Factores ambientales que afectan la nitrificación

Diversos estudios han presentado evidencias de que la actividad fisiológica de las bacterias nitrificantes es afectada por la presencia de compuestos orgánicos y factores ambientales tales como la temperatura, pH, oxígeno disuelto y compuestos aromáticos (Henze, 2002), provocando una gran expectativa e interés científico en la determinación de la influencia y comportamiento de dichos factores sobre las variables nitrificantes (eficiencia, rendimiento, velocidades específicas de oxidación de amonio y nitrito) con el objetivo de optimizarlas en el tratamiento de aguas residuales (Jaranowska et al., 2013).

El reactivo más común en los procesos aerobios es el oxígeno disuelto, por lo tanto la velocidad en el consumo de oxígeno es la herramienta más usada para evaluar la toxicidad de los procesos aerobios (Xiao et al., 2015).

A pesar de que las BAO como *Nitrosomonas europaea*, son capaces de adaptarse a concentraciones bajas de oxígeno disuelto (menor a 1 mg/L) (Park y Noguera, 2004) las velocidades de crecimiento de las bacterias nitrito oxidantes se ven afectadas. Debido a lo anterior, es común que en las plantas de tratamiento de aguas industriales se utilicen concentraciones de oxígeno disuelto (OD) mayores a 2 mg/L, ya que por debajo de este valor la nitrificación se puede ver limitada. (Grady et al., 2011).

2.5.1. Efecto del pH y temperatura

Diversos estudios en plantas de tratamiento de aguas residuales demuestran que los valores diferentes de pH y temperatura producen diferentes productos y eficiencias en la nitrificación, en general la nitrificación decrece en proporción con la temperatura. Cho et al. (2014) reportaron un rango de temperatura óptima entre 32.8 °C y 34.1°C y un rango bastante pequeño de pH (7.9-8) a diferencia de los valores de pH previamente reportados (Kim et al., 2007) (7.5-9), estas diferencias se deben a que en la actualidad las aguas residuales industriales tienen una composición más compleja y por lo tanto los microorganismos se ven más vulnerables a los cambios de pH. En el Cuadro V se puede observar el efecto de estos dos factores en las eficiencias.

Cuadro V. Efecto del pH y temperatura en la eficiencia de la nitrificación.

Temperatura °C	pH	Observación
35	Incremento de 7-8	La eficiencia se duplica a medida que el pH aumenta.
35	Incremento de 8-9	La eficiencia decrece, el pH óptimo fue de 8.
25	Incremento de 7-8	Incremento de la eficiencia.
25	Incremento de 8-9	Decremento en el mismo orden.
Incremento de 25-35	7	Incrementa la eficiencia
Incremento de 35-45	7	Decremento de la eficiencia.

Fuente Cho et al. (2014)

El pH depende de la velocidad de nitrificación, por cada mol de amoníaco que se oxida se liberan dos moles de hidrógeno, debido a esto el pH tiende a acidificarse (Kowalchuk y Stephen, 2001). Por ejemplo a pH de 6.5 se propicia la formación de ácido nitroso (HNO_2) que produce un efecto inhibitorio en la nitrificación y el amoníaco se ioniza a amonio, mientras que a pH muy alcalinos (9.2) ocurre una acumulación del ion amoníaco (NH_3) que tiende a evaporarse pues su forma es gaseosa (Burton y Prosser, 2001). El pH óptimo reportado para la nitrificación es entre 7 y 8 ya que a este valor se ha reportado la mayor velocidad específica de consumo de amonio (Cho et al., 2014).

2.5.2. Efecto del sustrato

Tanto las BAO como las BNO son inhibidas por las formas no ionizadas de sus propios sustratos (NH_3^+ y HNO_2) en donde el equilibrio entre las formas ionizadas depende del pH y la temperatura, sin embargo las BNO son más sensibles al amoníaco (Carrera et al., 2004). Kim et al. (2008) observaron que a pH 7 y temperatura de 30°C concentraciones por debajo de 350 mg/L de amoníaco no producen efecto inhibitorio en la nitrificación, sin embargo al rebasar este valor ocurre una inhibición debido a la formación de amoníaco libre. Este amoníaco libre inhibe la actividad enzimática de las BNO, entonces ocurre una formación de NO_2^- que tiende a acumularse en el medio ya que no es transformado a NO_3^- (Zhang et al., 2012).

En el Cuadro VI se resumen las concentraciones inhibitorias de cada uno de estos sustratos.

Cuadro VI. Concentraciones inhibitorias de amoníaco y ácido nitroso sobre la nitrificación.

Tipo de bacteria	Rango de concentraciones inhibitorias		Fuente
	NH_3 mg/L	HNO_2 mg/L	
Amonio-oxidante (<i>Nitrosomonas</i>)	10-150	Sin precisar	Kim et al., 2008
Nitrito-oxidante (<i>Nitrobacter</i>)	0.1-1 0.1-4	0.22-2.8	Zhao et al., 2014

2.5.3. Efecto de la materia orgánica

Debido a la alta sensibilidad de los microorganismos nitrificantes hacia la materia orgánica han surgido diversos estudios enfocados a la inhibición del proceso de nitrificación, en particular de la enzima Amonio Mono Oxigenasa (AMO) que cataliza la oxidación del amonio (Silva, Gómez, Houbron y Cuervo, 2009). Se ha observado que la materia orgánica afecta a la nitrificación en diferente magnitud, misma que depende de las estructuras químicas de los compuestos, su concentración y propiedades químicas (Beristain et al., 2009). Otra hipótesis afirma que en los consorcios microbianos la competencia entre organismos autótrofos y heterótrofos por el carbono y oxígeno es otro factor que disminuye la eficiencia nitrificante.

2.5.3.1. Efecto inhibitorio de compuestos fenólicos

En cuanto a los compuestos fenólicos, se sabe que tienen un efecto inhibitorio en el proceso de nitrificación, sin embargo pueden ser utilizados por los microorganismos nitrificantes como fuente de carbono, obteniendo energía para el transporte activo del amonio logrando su eliminación (Farhadian et al., 2008; Silva et al., 2011). Además diversos estudios reportan la resistencia de los microorganismos a la presencia de fenoles, ejemplo de esto es el estudio de Van Schie y Young (2000) donde se observa que las bacterias son capaces de cambiar la configuración de sus membranas (de *cis* a *trans*) volviéndolas más rígidas aunque posiblemente, este cambio afecte el transporte del amoníaco y por consiguiente su eficiencia en el consumo. Cabe mencionar que las concentraciones inhibitorias y la eficiencia de la nitrificación dependen de las condiciones de crecimiento de los microorganismos, como se puede observar en el Cuadro VII.

Cuadro VII. Estudios reportados de inhibición en la nitrificación por compuestos fenólicos.

Compuesto estudiado	Concentración mg/L	Inhibición en la eficiencia (%)	Sistema	Referencias
<i>p</i> -cresol	17	70	Lote	Texier y Gómez, 2002
	25	0	SBR	Texier y Gómez, 2007
	50	0	SBR	Texier y Gómez, 2007
	100	0	Lote	Kim et al., 2008
	150	97	Lote	Kim et al., 2008
	150	0	SBR	Silva et al., 2014
<i>p</i> -cresol	50	0	Lote	Silva et al., 2011
fenol	50	27		
2-clorofenol	50	84		
<i>p</i> -hidroxibenzaldehído	50	4		
Mezcla	200	41		
<i>m</i> -cresol	25	14	SBR	Zepeda et al., 2013
	150	47		

Es importante destacar que la mayoría de los estudios reportados se realizaron con compuestos individuales, además se sabe que los compuestos individuales tienen un menor efecto en la eficiencia de la nitrificación que cuando se añaden en mezcla (Silva et al., 2014). Finalmente, se necesitan más estudios para caracterizar cinéticamente la habilidad

de las bacterias nitrificantes para oxidar el amoníaco en presencia de mezclas fenólicas que incluyan a todos los cresoles.

2.5.3.2. *Biotransformación de compuestos fenólicos*

Debido a que los fenoles se encuentran en forma natural en el ambiente, existen organismos que son capaces de mineralizarlos (Okpokwasili y Nweke, 2006). Existen varios estudios relacionados a la biodegradación de compuestos fenólicos, por ejemplo Liu et al. (2012) realizaron estudios con *Pseudomonas sp* en presencia de compuestos en forma individual, observando una completa degradación del fenol a concentraciones de 1600 mg/L en 60 h, *m*-cresol a concentraciones de 800 mg/L y 4-clorofenol a concentraciones de 1500 mg/L. En el Cuadro VIII se presentan estudios realizados con los compuestos de interés para esta tesis.

Cuadro VIII. Estudios realizados con los compuestos fenólicos de interés.

Compuesto	Inóculo	Eficiencia en oxidación fenólica	Referencia
Fenol	<i>Pseudomonas sp</i>	100%	Liu et al., 2012
<i>p</i> -cresol	Consorcio nitrificante	100%	Silva et al., 2014
<i>m</i> -cresol	<i>Pseudomonas sp</i>	100%	Liu et al., 2012
	Consorcio nitrificante	100%	Zepeda et al., 2013
<i>o</i> -cresol	Consorcio nitrificante	73%	Flyvbjerg et al., 1993

Como se puede observar existen pocos estudios que involucren al *o*-cresol tanto individual como en mezcla con sus isómeros, por lo que es necesario realizar evaluaciones con la presencia en mezclas de estos compuestos recalcitrantes para obtener datos cinéticos que nos permitan explicar el efecto en la fisiología de los microorganismos nitrificantes y con ello brindar conocimiento acerca del tratamiento de aguas residuales que presenten esta composición.

2.5.3.2.1. Características físicas y químicas de los compuestos fenólicos

Existen tres tipos de isómeros del cresol: *o*-cresol, *m*-cresol y *p*-cresol (Fig. 3). En estado puro son sólidos, mientras que en mezcla son líquidos (ATSDR., 2008). Tienen baja solubilidad acuosa, sin embargo sus sales de fosfato y sodio son más solubles (Ivanciuc et al., 2006). El cuadro IX resume las propiedades físicas y químicas de los compuestos fenólicos.

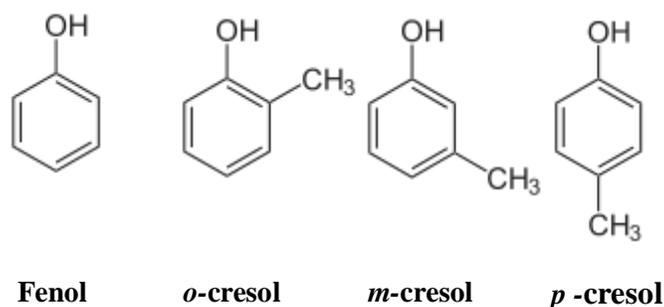


Figura II. Estructura química de los compuestos fenólicos.

Cuadro IX. Propiedades físicas y químicas de los compuestos fenólicos.

Compuesto	Punto de fusión (C°)	Densidad (gml ⁻¹)	LogK _{ow}	Log K _{oc}	Solubilidad en agua g/L	Presión de vapor	Punto de ebullición	Pka
<i>o</i>-cresol	30.9	1.047	1.95	1.03	25.950	0.299	191.04	10.316
<i>m</i>-cresol	12.22	1.034	1.96	1.54	22.700	0.138	202.32	10.09
<i>p</i>-cresol	34.73	1.0341	1.94	1.69	21.520	0.11	201.94	10.26
Fenol	41	1.0576	1.46	52	8.7	47	181.8	10

K_{ow}: coeficiente de partición octanol-agua; **K_{oc}** coeficiente de adsorción carbono orgánico; **Pka** Constante de disociación. Fuente: Olaniran e Igbinsa, 2011 ; ATSDR, 2008.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de una mezcla de fenol, *o*, *m*, y *p*-cresol sobre un consorcio microbiano nitrificante en un reactor secuencial discontinuo.

3.2 Objetivos particulares

- a) Caracterizar el proceso respiratorio del consorcio durante la nitrificación.
- b) Evaluar el efecto de la mezcla de compuestos fenólicos sobre el proceso respiratorio durante la nitrificación así como las velocidades específicas de oxidación de la mezcla fenólica.

4. REFERENCIAS

Amashta, I. A. K., y García, A. R. (2005). Diseño de reactores de polimerización. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 6(4), 299-320.

Andrew, C. R., Han, J., de Vries, S., van der Oost, J., Averill, B. A., Loehr, T. M., et al. (1994). CuA of Cytochrome c Oxidase and the A Site of N₂O Reductase Are Tetrahedrally Distorted Type 1 Cu Cysteinates. *Journal of the American Chemical Society*, 116(23), 10805-10806.

Aranda, N., Herrera H. J. A., y Comín, F. A. (2006). Nutrient water quality in a tropical coastal zone with groundwater discharge, northwest Yucatan, Mexico. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 68(3), 445-454.

Arp, D. J., Yeager, C. M., & Hyman, M. R. (2001). Molecular and cellular fundamentals of aerobic cometabolism of trichloroethylene. *Biodegradation*, 12(2), 81-103.

Arp, D. J., Chain, P. S., & Klotz, M. G. (2007). The Impact of Genome Analyses on Our Understanding of Ammonia-Oxidizing Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 61, 503-528.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry, ATSDR. (2008). Toxicological profile for cresols.

Bassin, J. P., Kleerebezem, R., Muyzer, G., Rosado, A. S., van Loosdrecht, M. C., & Dezotti, M. (2012). Effect of different salt adaptation strategies on the microbial diversity, activity, and settling of nitrifying sludge in sequencing batch reactors. *Applied microbiology and biotechnology*, 93(3), 1281-1294.

Beristain C. R., Texier, A. C., Razo F. E., Méndez P. R., & Gómez, J. (2009). Biotransformation of aromatic compounds from wastewaters containing N and/or S, by nitrification/denitrification: a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 8(4), 325-342.

Berks, B., Richardson, D., Reilly, A., Willis, A., & Ferguson, S. (1995). The napEDABC gene cluster encoding the periplasmic nitrate reductase system of *Thiosphaera pantotropha*. *Biochem. J*, 309, 983-992.

Brock, T., & Madigan, M. (1991). Microbiología. Sexta edición.

Burton, S. A., & Prosser, J. I. (2001). Autotrophic ammonia oxidation at low pH through urea hydrolysis. *Applied and environmental microbiology*, 67(7), 2952-2957.

Camargo, J., y Alonso, A. (2007). Contaminación por nitrógeno inorgánico en los ecosistemas acuáticos: problemas medioambientales, criterios de calidad del agua, e implicaciones del cambio climático. *Revista Ecosistemas*, 16(2).

Carrera, J., Lafuente, F., & Vicent, T. (2004). Tratamiento biológico de aguas residuales industriales con alta carga de nitrógeno. *Ingeniería Química-Madrid*-(409), 130-145.

Cervantes C. F., Pérez, J., & Gómez, J. (2000). Avances en la eliminación biológica del nitrógeno de las aguas residuales. *Revista Latinoamericana de Microbiología-México*-, 42(2), 73-82.

Cho, K. H., Kim, J. O., Kang, S., Park, H., Kim, S., & Kim, Y. M. (2014). Achieving enhanced nitrification in communities of nitrifying bacteria in full-scale wastewater treatment plants via optimal temperature and pH. *Separation and Purification Technology*, 132, 697-703.

Cortés L. C., Rodríguez D. M., Sipkema, D., Juárez J. B., Rodelas, B., Smidt, H. (2015). Effect of salinity on nitrification efficiency and structure of ammonia-oxidizing bacterial communities in a submerged fixed bed bioreactor. *Chemical Engineering Journal*, 266, 233-240.

Coyle, C. L., Zumft, W. G., Kroneck, P. M., Körner, H., & Jakob, W. (1985). Nitrous oxide reductase from denitrifying. *European Journal of Biochemistry*, 153(3), 459-467.

De Miguel F. C., & Vázquez T. Y. M. (2006). Origen de los nitratos (NO₃) y nitritos (NO₂) y su influencia en la potabilidad de las aguas subterráneas. *Minería & Geología*, 22(3), 9.

Demirbas, A. (2009). Agricultural based activated carbons for the removal of dyes from aqueous solutions: a review, *J. Hazard Mater.* 167, 1-9.

Dytczak, M. A., Londry, K. L., y Oleszkiewicz, J. A. (2008). Activated sludge operational regime has significant impact on the type of nitrifying community and its nitrification rates. *Water Research*, 42(8), 2320-2328.

Farhadian, M., Duchez, D., Vachelard, C., & Larroche, C. (2008). Monoaromatics removal from polluted water through bioreactors. A review. *Water research*, 42(6), 1325-1341.

Farhod Chasib, K. (2013). Extraction of phenolic pollutants (phenol and p-chlorophenol) from industrial wastewater. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 58(6), 1549-1564.

Ferguson, S. J. (1994). Denitrification and its control. *Antonie van Leeuwenhoek*, 66(1-3), 89-110.

Figuerola, E. L., y Erijman, L. (2010). Diversity of nitrifying bacteria in a full-scale petroleum refinery wastewater treatment plant experiencing unstable nitrification. *Journal of hazardous materials*, 181(1), 281-288.

Flyvbjerg, J., Arvin, E., Jensen, K., Olsen, K., (1993). Microbial degradation of phenols and aromatic hydrocarbons in cresosote-contaminated groundwater under nitrate-reducing conditions. *Journal of contaminant Hydrology*, 133-150.

Gavrilescu, M. (2010). Environmental biotechnology: achievements, opportunities and challenges. *Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology*, 4(1), 1-36.

Ge, Q., Yue, X., y Wang, G. (2015). Simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification at high initial phenol concentration by isolated bacterium *Diaphorobacter* sp. PD-7. *Chinese Journal of Chemical Engineering*.

González, F. U. T., Herrera S. J. A., y Aguirre M. M. L. (2008). Water quality variability and eutrophic trends in karstic tropical coastal lagoons of the Yucatán Peninsula. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 76(2), 418-430.

Grady Jr, C. L., Daigger, G. T., Love, N. G., Filipe, C. D., & Leslie Grady, C. (2011). *Biological wastewater treatment*: IWA Publishing.

Heaven, M. W., Wild, K., Verheyen, V., Cruickshank, A., Watkins, M., & Nash, D. (2011). Seasonal and wastewater stream variation of trace organic compounds in a dairy processing plant aerobic bioreactor. *Bioresource technology*, 102(17), 7727-7736.

Henze, M. (2002). *Wastewater treatment: biological and chemical processes*: Springer.

Herrera, S. J., Comin, A. F., Aranda, C. N., Troccoli, L., Capurro L. (2004). Coastal water quality assessment in the Yucatan Peninsula: management implications. *Ocean and coastal management*, 47 (2004) 625-639

Hiscock, K. M., Lloyd, J. W., & Lerner, D. N. (1991). Review of natural and artificial denitrification of groundwater. *Water Research*, 25(9), 1099-1111.

Hong, Z., Hanaki, K., & Matsuo, T. (1993). Greenhouse gas N₂O production during denitrification in wastewater treatment. *Water Science & Technology*, 28(7), 203-207.

Ivanciuc, T., Ivanciuc, O., & Klein, D. J. (2006). Prediction of environmental properties for chlorophenols with posetic quantitative super-structure/property relationships (QSSPR). *International Journal of Molecular Sciences*, 7(9), 358-374.

Jaranowska, P., Cydzik-Kwiatkowska, A., & Zielińska, M. (2013). Configuration of biological wastewater treatment line and influent composition as the main factors driving bacterial community structure of activated sludge. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(7), 1145-1153.

Jetten, M. S., Logemann, S., Muyzer, G., Robertson, L. A., de Vries, S., & van Loosdrecht, M. C. (1997). Novel principles in the microbial conversion of nitrogen compounds. *Antonie van Leeuwenhoek*, 71(1-2), 75-93.

Kim, Y. M., Park, D., Lee, D. S., & Park, J. M. (2007). Instability of biological nitrogen removal in a cokes wastewater treatment facility during summer. *Journal of hazardous materials*, 141(1), 27-32.

Kim, Y. M., Park, D., Lee, D. S., & Park, J. M. (2008). Inhibitory effects of toxic compounds on nitrification process for cokes wastewater treatment. *Journal of Hazardous Materials*, 152(3), 915-921.

Knowles, R. (1982). Denitrification. *Microbiological reviews*, 46(1), 43.

Kowalchuk, G. A., & Stephen, J. R. (2001). Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology. *Annual Reviews in Microbiology*, 55(1), 485-529.

Li, H. Q., Han, H. J., Du, M. A., & Wang, W. (2011). Removal of phenols, thiocyanate and ammonium from coal gasification wastewater using moving bed biofilm reactor. *Bioresource technology*, 102(7), 4667-4673.

Liu, J., Jia, X., Wen, Z., (2012). Substrate interactions and kinetics study of phenolic compounds biodegradation by *Pseudomonas* sp. cbp1-3. *Biochemical Engineering Journal* 156-166.

Moreno Andrade, I., & Buitrón, G. (2006). Biodegradación óptima de compuestos fenólicos en un reactor discontinuo secuencial. *Tesis doctoral. Instituto de Ecología. Universidad Nacional Autónoma de México. México, Distrito Federal.*

Norma Oficial Mexicana NOM-CCA-003-ECOL/1993, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a cuerpos receptores provenientes de la industria de refinación de petróleo y petroquímica.

Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT, 1996, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales.

Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, “salud ambiental, agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización.

Okpokwasili, G., & Nweke, C. (2006). Microbial growth and substrate utilization kinetics.

Olaniran, A. O., & Igbinosa, E. O. (2011). Chlorophenols and other related derivatives of environmental concern: Properties, distribution and microbial degradation processes. *Chemosphere*, 83(10), 1297-1306.

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

Organización Mundial de la Salud, (2006). Guías para la calidad del agua potable, vol. 1: *Recomendaciones. Tercera Edición*, 329-330.

Park, H. D., & Noguera, D. R. (2004). Evaluating the effect of dissolved oxygen on ammonia-oxidizing bacterial communities in activated sludge. *Water research*, 38(14), 3275-3286.

Siddiqui, R., Warnecke E. U., Hengsberger, A., Schneider, B., Kostka, S., & Friedrich, B. (1993). Structure and function of a periplasmic nitrate reductase in *Alcaligenes eutrophus* H16. *Journal of bacteriology*, 175(18), 5867-5876.

Silva, C., Gómez, J., & Beristain C, R. (2011). Simultaneous removal of 2-chlorophenol, phenol, p-cresol and p-hydroxybenzaldehyde under nitrifying conditions: kinetic study. *Bioresource technology*, 102(11), 6464-6468.

Silva, C., Gómez, J., Houbron, E., Cuervo-López, F., & Texier, A.-C. (2009). *p*-Cresol biotransformation by a nitrifying consortium. *Chemosphere*, 75(10), 1387-1391.

Silva, C. D., Beristain-Montiel, L., de Maria Cuervo-López, F., & Texier, A.-C. (2014). *p*-Cresol mineralization and bacterial population dynamics in a nitrifying sequential batch reactor. *Journal of Environmental Sciences*, 26(9), 1885-1893.

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(1), 97-104.

Texier, A. C., y Gómez, J. (2002). Tolerance of nitrifying sludge to *p*-cresol. *Biotechnology letters*, 24(4), 321-324.

Texier, A.-C., & Gomez, J. (2004). Settleability and kinetics of a nitrifying sludge in a sequencing batch reactor. *Canadian journal of microbiology*, 50(11), 943-949.

Texier, A. C., & Gomez, J. (2007). Simultaneous nitrification and *p*-cresol oxidation in a nitrifying sequencing batch reactor. *Water research*, 41(2), 315-322.

Thomsen, J. K., Geest, T., & Cox, R. P. (1994). Mass spectrometric studies of the effect of pH on the accumulation of intermediates in denitrification by *Paracoccus denitrificans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(2), 536-541.

Tiedje, J. M. (1988). Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. *Biology of anaerobic microorganisms*, 717, 179-244.

Van Schie, P. M., & Young, L. Y. (2000). Biodegradation of phenol: mechanisms and applications. *Bioremediation Journal*, 4(1), 1-18.

Xiao, Y., De Araujo, C., Sze, C. C., y Stuckey, D. C. (2015). Toxicity measurement in biological wastewater treatment processes: A review. *Journal of hazardous materials*, 286, 15-29.

Zehr, J. P., y Ward, B. B. (2002). Nitrogen cycling in the ocean: new perspectives on processes and paradigms. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(3), 1015-1024.

Zepeda, A., Ben-Youssef, C., Rincón, S., Cuervo-López, F., & Gómez, J. (2013). Complete and simultaneous removal of ammonium and *m*-cresol in a nitrifying sequencing batch reactor. *Biodegradation*, 24(3), 377-385.

Zhang, L., Zhang, S., Han, X., Gan, Y., Wu, C., & Peng, Y. (2012). Evaluating the effects of nitrogen loading rate and substrate inhibitions on partial nitrification with FISH analysis. *Water Science & Technology*, 65(3), 513-518.

Zhao, L., Peng, Y. L., Gao, J. M., & Cai, W. M. (2014). Bioprocess intensification: an aqueous two-phase process for the purification of C-phycocyanin from dry *Spirulina platensis*. *European Food Research and Technology*, 238(3), 451-457.

5. 1ARTÍCULO

Efecto de una mezcla de fenol, *o*-cresol, *p*-cresol y *m*-cresol sobre el proceso nitrificante de un consorcio microbiano en un Reactor Secuencial Discontinuo

Adriana Sosa Farfán.¹, Diana Escalante Réndiz.¹, Alejandro Zepeda Pedreguera.¹

¹Universidad Autónoma de Yucatán, Facultad Ingeniería Química. Periférico Norte Kilómetro 33.5. Tablaje Catastral 13615. Chuburná de Hidalgo Inn C.P. 97203. Email: adri67s@hotmail.com.

Resumen

Mediante un estudio cinético se evaluó la fisiología de un consorcio microbiano nitrificante al ser expuesto a distintas concentraciones de carbono (C/L) proveniente de una mezcla equimolar de fenol, *o*-cresol, *m*-cresol y *p*-cresol (40 mg C/L y 0-320 mg C/L) en un Reactor Secuencial Discontinuo (SBR por sus siglas en inglés) alimentado con 100 mg/L de nitrógeno amoniacal (N-NH₄⁺) y una concentración inicial de 176 mg/L de nitrógeno de proteína (N-proteína) microbiana. Primeramente se realizó el estudio en ausencia de la mezcla fenólica donde se obtuvo una eficiencia ($E_{NH_4^+}$) del 100%, un rendimiento nitrificante de ($Y_{NO_3^-}$) de 0.95 ± 0.026 y velocidades específicas de consumo de amonio ($q_{N-NH_4^+}$) y formación de nitrato ($q_{N-NO_3^-}$) de 1.11 ± 0.04 y 0.67 ± 0.1 respectivamente. Durante la aclimatación del consorcio con 40 mg C/L de la mezcla fenólica se observó una disminución en las variables nitrificantes comparadas con las del control 1, sin embargo posteriormente el consorcio nitrificante fue capaz de recuperar su capacidad nitrificante total ($E_{NH_4^+} = 100\%$ y $Y_{NO_3^-} = 0.98 \pm 0.02$). Una vez aclimatado el consorcio nitrificante, fue alimentado con 10 a 320 mg C/L de la mezcla fenólica observando que de 10 a 160 mg C/L el consorcio nitrificante fue capaz de oxidar completamente al amonio con una $E_{NH_4^+}$ del 100 % y valores de $Y_{NO_3^-}$ cercanos a uno (0.98 ± 0.008), así como una disminución de las velocidades específicas nitrificantes y un incremento de las velocidades específicas de la oxidación de los compuestos fenólicos del 70 al 94%. Finalmente, en presencia de 320 mg C/L el consorcio nitrificante fue capaz de oxidar simultáneamente el amonio ($E_{NH_4^+} = 100\%$) y la mezcla fenólica (*p*-cresol>fenol>*m*-cresol>*o*-cresol) siendo el *o*-cresol el compuesto más recalcitrante. A pesar de la inhibición en el proceso nitrificante, el SBR permitió una adaptación en la respiración del consorcio a la presencia de la mezcla fenólica aunque las bacterias amonio oxidantes (BAO) fueron las más afectadas en comparación con las bacterias nitrato oxidantes (BNO).

Palabras clave: Cresoles, fenol, inhibición, nitrificación, reactor secuencial discontinuo.

¹ La escritura del artículo se basó en la guía para autores de la Revista Chemosphere.

1. Introducción

En décadas recientes, el mundo está enfrentando la generación de aguas residuales con mezclas de contaminantes recalcitrantes que pueden provocar graves efectos al medio ambiente y salud (Gavrilescu, 2010). Según Cortés et al. (2015) y Dytczak et al. (2008), uno de los principales contaminantes son los compuestos nitrogenados que causan eutrofización, reducción del oxígeno disuelto y toxicidad en los organismos acuáticos, por lo que deben ser eliminados de las aguas residuales antes de su descarga al medio ambiente. La remoción de contaminantes nitrogenados se ha realizado por más de 100 años mediante la nitrificación, proceso fisiológico aerobio donde el amonio es oxidado hasta nitrato por dos grupos de bacterias litoautotróficas gram-negativas filogenéticamente relacionadas. Las bacterias amonio oxidantes (BAO) oxidan el amonio hasta nitrito y posteriormente las bacterias nitrito oxidantes (BNO) oxidan el nitrito hasta nitrato (Arp et al., 2007; Jaranowska et al., 2013). Sin embargo, la nitrificación se ve afectada por la presencia de compuestos aromáticos que también derivan de los procesos industriales como refinación de petróleo, manufactura de fármacos, plásticos, pintura e industria de madera y papel, (Xiao et al., 2015). La presencia simultánea de altas concentraciones de compuestos nitrogenados (710-1500 mg/ L) y fenólicos (1200 mg/ L) en aguas residuales industriales ya ha sido previamente reportada por autores como Texier y Gómez (2002) y Olmos et al. (2004), por tal motivo han surgido diversos estudios en torno a la inhibición de la nitrificación por presencia de compuestos aromáticos con el objetivo de solventar y proponer diversas estrategias para resolver este tipo de problemas.

Sin embargo, la mayoría de los trabajos realizados se limitan al estudio de la presencia de compuestos fenólicos en forma individual, dejando a un lado el comportamiento fisiológico de consorcios microbianos al ser expuestos a una mezcla más compleja, así como la ruta de oxidación de los compuestos aromáticos cuando se encuentran en forma simultánea. Por tal motivo el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de una mezcla cuaternaria de compuestos fenólicos sobre el proceso nitrificante de un consorcio microbiano en un reactor secuencial discontinuo, con el fin de aportar conocimientos que en un futuro puedan ser empleados en los procesos de biorremediación de aguas contaminadas con mezclas de compuestos fenólicos y amonio.

2. Materiales y métodos.

2.1 Inóculo y composición de los medios de cultivo.

El consorcio microbiano se obtuvo de un reactor continuo nitrificante operado en régimen estacionario y estable, según la metodología de Zepeda et al. (2003). La concentración inicial de proteína total en el SBR fue de 176 mg/L.

Se utilizó una mezcla de dos medios de cultivo (A y B) para alimentar el SBR, constituidos de la siguiente manera (g/L): medio A: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.36), N_4CL (0.29), KH_2PO_4 (0.43), MgSO_4 (0.28) y NaCl (0.31). Mientras que el medio B fue compuesto por $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.22) y NaHCO_3 (3.22). Los medios se alimentaron a 126.4 mL/min (A) y a 7 mL/min (B) para obtener un volumen final de dos litros. Además, se añadió al reactor $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a una concentración de 0.01 g/L (Zepeda et al., 2013). Cuando fue necesario alimentar los compuestos fenólicos estos fueron transferidos al SBR a través de un flujo de 20 mL/min para alcanzar las concentraciones de carbono en cada uno de los estudios (10 mg C/L-320 mg C/L).

2.2 Operación del reactor secuencial discontinuo.

A través de ciclos de reacción programados mediante temporizadores en un SBR de 2 L de volumen de trabajo, se llevó a cabo el estudio del proceso nitrificante en ausencia (control) y presencia de la mezcla de compuestos fenólicos manteniendo una concentración equimolar de carbono de cada uno de los compuestos fenólicos (ejemplo: 10 mg C/L de la mezcla; 2.5 mg C/L de cada compuesto fenólico) de acuerdo al Cuadro 1. Cada ciclo de 12 horas estuvo constituido por 11 horas de reacción, sedimentación de 40 min, vaciado de 4 min y llenado de 15 min. Cuando los ciclos fueron operados a 24 h (37-42), el tiempo de reacción fue de 23 h mientras que la sedimentación, vaciado y llenado permanecieron sin cambios. El SBR fue operado con una temperatura de 30 ± 1 °C, un flujo de aire de 4 L/min, una concentración inicial de amonio de 100 mg N- NH_4^+ /L y 300 mg/L de C- NaHCO_3 .

Durante todo el estudio se tomaron muestras diariamente al inicio y final de cada ciclo. Además durante los estudios cinéticos (intervalos de 7 días) del proceso nitrificante se obtuvieron muestras a diferentes tiempos en un mismo ciclo de reacción. Las muestras

fueron centrifugadas a 1500 rpm y filtradas (0.45 μm) para posteriormente cuantificar la concentración de N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- , C-fenol, C-*o*-cresol, C-*m*-cresol, C-*p*-cresol. La eficiencia [E-NH_4^+ (g N- NH_4^+ consumido/g N- NH_4^+ alimentado x 100)], el rendimiento nitrificante [Y-NO_3^- (g N- NO_3^- producido/g N- NH_4^+ alimentado)] y velocidades específicas de consumo de amonio ($q_{\text{N-NH}_4^+}$), fenol (q_{Fenol}), cresoles ($q_{\text{o-cresol}}$, $q_{\text{m-cresol}}$, $q_{\text{p-cresol}}$) y formación de nitrato ($q_{\text{N-NO}_3^-}$) fueron determinadas para evaluar la respuesta fisiológica del consorcio microbiano al ser expuesto a la mezcla fenólica.

Asumiendo que el 16% del contenido total de proteína le corresponde al nitrógeno, las velocidades específicas nitrificantes ($q_{\text{N-NH}_4^+}$, $q_{\text{N-NO}_3^-}$) fueron calculadas y expresadas como g N/g N-proteína microbiana por h, mientras que las velocidades específicas de oxidación de la mezcla fenólica (q_{Fenol} , $q_{\text{o-cresol}}$, $q_{\text{m-cresol}}$, $q_{\text{p-cresol}}$) fueron expresadas como g C/g N-proteína microbiana por hora.

Las posibles pérdidas de los compuestos fenólicos debido a interacciones ajenas al consorcio microbiano fueron descartadas mediante una prueba abiótica.

Cuadro 1. Condiciones de operación del SBR.

Ciclos	Duración (h)	Número de ciclos/día	Concentración de mezcla fenólica (mg C/L)
1-36	12	2	0
37	24	1	40
38-42	24	1	0
43-105	12	2	0
106-135	12	2	10
136-171	12	2	20
172-201	12	2	40
202-219	12	2	80
220-245	12	2	160
246-259	12	2	320

2.3 Métodos analíticos

La cuantificación de nitrógeno amoniacal se realizó mediante el método colorimétrico basado en la reacción de Berthelot (Searle, 1984). Los nitritos y nitratos fueron medidos por HPLC (Perkin Elmer Serie 200, EE.UU) con una columna de intercambio de iones (IC-Pak Anion HC 4.6 x 150 mm) y un detector UV a 214 nm. La fase móvil estuvo compuesta por 20 mL de n-butanol, 120 mL de acetonitrilo grado HPLC, 20 mL de una solución de gluconato: borato y se le añadió agua grado HPLC hasta completar un litro (Silva et al., 2009). Los compuestos fenólicos fueron cuantificados por medio de HPLC mediante el empleo de una columna quiral analítica (cyclobond I 2000, 25 x 4.6 mm) y un detector UV a 254 nm. La fase móvil estuvo compuesta por agua y metanol a una relación de 80:20. Se determinó la materia orgánica del reactor al inicio y final de cada ciclo mediante la Demanda Química de Oxígeno (Métodos Estándar de Análisis de Aguas y Aguas residuales, 1981) con el fin de monitorear la completa oxidación de los compuestos fenólicos. La proteína total microbiana fue determinada por medio de la técnica de Lowry et al., (1951). Para prevenir interferencias de los compuestos fenólicos sobre la medición de la proteína total microbiana, las muestras (1 mL) fueron centrifugadas (13, 000 g, 10 min) y el pellet se lavó dos veces con 1 mL de solución salina (9 g/L). Todas las mediciones se realizaron por duplicado con un coeficiente de variación menor al 10%.

3. Resultados

3.1 Comportamiento del proceso nitrificante en ausencia de la mezcla fenólica

Como se puede observar en la Figura 1, el consorcio microbiano fue capaz de oxidar el amonio completamente después de 3 h de reacción, transformando el amonio oxidado a nitrato a partir de las 6 h, obteniendo una $E_{N-NH_4^+}$ del $100\% \pm 0.016$ y un $Y_{N-NO_3^-}$ de 0.95 ± 0.07 con una $q_{N-NH_4^+}$ de $1.11 \pm 0.04 \text{ h}^{-1}$ y una $q_{N-NO_3^-}$ de $0.67 \text{ h}^{-1} \pm 0.11$. Al final de cada ciclo de reacción no se detectó presencia de nitrito.

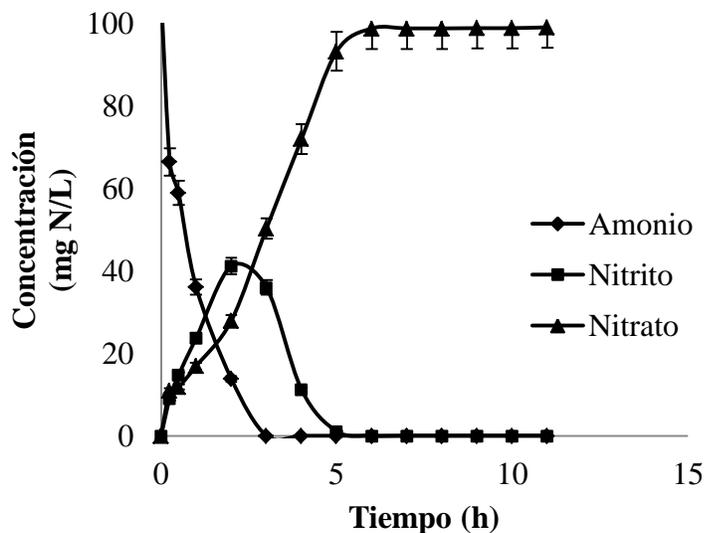


Figura 1. Caracterización del proceso nitrificante en ausencia de la mezcla cuaternaria de fenoles.

3.2 Aclimatación del consorcio microbiano a la presencia de la mezcla fenólica.

Con el objetivo de evaluar el comportamiento fisiológico del proceso nitrificante en presencia de una mezcla de compuestos fenólicos, el consorcio nitrificante fue alimentado con 40 mg C/L observando un efecto inhibitorio significativo, el cual fue reflejado con una fase de retardo en la oxidación del amonio de aproximadamente 18 h (Fig. 2), una reducción de la $E_{N-NH_4^+}$ y $Y_{N-NO_3^-}$ de un 11 y 24% respectivamente, así como una disminución en las velocidades específicas de $q_{N-NH_4^+}$, y $q_{N-NO_3^-}$ de un 89 y un 46% respectivamente (Cuadro 2). Los resultados obtenidos evidenciaron la presencia de un mayor efecto en las bacterias amonio oxidantes (BAO) que en las nitrito oxidantes (BNO).

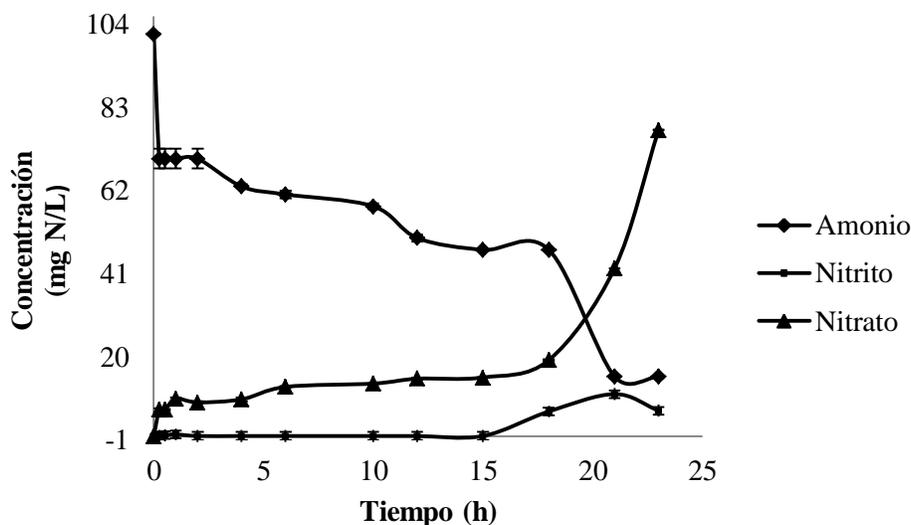


Figura 2. Efecto de la mezcla fenólica sobre el proceso nitrificante durante la aclimatación.

3.3 Recuperación del consorcio microbiano nitrificante.

Con el objetivo de evaluar el proceso de recuperación de la actividad nitrificante, después de haber estado en presencia de la mezcla de los compuestos fenólicos, el consorcio nitrificante fue alimentado sin presencia de compuestos fenólicos durante 67 ciclos, observando una completa oxidación del amonio ($E_{N-NH_4^+}$ del 100%) y una completa formación de nitrato ($Y_{N-NO_3^-}$ de 0.98 ± 0.07). Sin embargo, el contacto de la mezcla fenólica durante el periodo de aclimatación provocó una disminución de la $q_{N-NH_4^+}$ y la $q_{N-NO_3^-}$ del 40 y 50% respectivamente con respecto al proceso respiratorio nitrificante antes de la presencia de la mezcla fenólica (control 1).

3.4 Efecto de la mezcla fenólica sobre el proceso nitrificante.

Una vez re-establecido y caracterizado el proceso nitrificante control (C2) en ausencia de la mezcla de compuestos fenólicos, se añadió 10 mg C/L al SBR (Cuadro2, ciclo 106) y se observó una disminución del 18 y 36% en la eficiencia y rendimiento respectivamente, así como del 84 en $q_{N-NH_4^+}$. Mientras que $q_{N-NO_3^-}$ incrementó un 48% con respecto al C2. Después de 16 ciclos en presencia de 10 mg C/L de la mezcla fenólica (ciclo 122) el

proceso nitrificante se estabilizó logrando valores de $E_{N-NH_4^+}$ y $Y_{N-NO_3^-}$ similares al control mientras que $q_{N-NH_4^+}$ tan sólo disminuyó un 10% y $q_{N-NO_3^-}$ incrementó un 87%. Las eficiencias nitrificantes se mantuvieron altas durante todo el experimento.

La presencia de 20 mg C/L (ciclos 136-171) no tuvo un efecto inhibitorio significativo con respecto a 10 mg C/L sobre el proceso nitrificante, sin embargo cuando el SBR estuvo en contacto con 40 mg C/L durante 14 ciclos de reacción (ciclo 186) se observó una disminución cercana al 40% en ambas velocidades específicas ($q_{N-NH_4^+}$, $q_{N-NO_3^-}$) mientras que la $E_{N-NH_4^+}$ y $Y_{N-NO_3^-}$ permanecieron similares al control 2. No obstante, el efecto de 40 mg C/L sobre el consorcio microbiano estable y pre-aclimatado fue menos inhibitorio que el efecto de la misma concentración durante la pre-aclimatación (Cuadro 11, ciclo 37).

Cuadro 2. Variables respuesta del proceso nitrificante en presencia de la mezcla fenólica.

Ciclos	Concentración de mezcla fenólica (mg C/L)	$E_{N-NH_4^+}$	$Y_{N-NO_3^-}$	$q_{N-NH_4^+}$ h ⁻¹	$q_{N-NO_3^-}$ h ⁻¹	Concentración de proteína (mg/L)
1-36	0 (control 1)	100 ± 0.01	0.95	1.11 ± 0.04	0.67 ± 0.1	180
37	40	89	0.76	0.12 (-89%) ^a	0.36 (46-%) ^a	164
38-42	0	0.98	0.87	-	-	-
43-105	0 (control 2)	100	0.98	0.66	0.33	328
106*-121	10	100	0.62 (-36%) ^b	0.13 (-87%) ^b	0.49 (+48%) ^b	229
122*-135	10	100	0.97	0.59 (-10)	0.62 (+87%)	309
136*-157	20	100	0.98	0.64 (-3%)	0.48 (+45%)	327
158*-171	20	100	0.99	0.56 (-15%)	0.38 (+15%)	402
172*-185	40	100	0.98	0.50 (-24%)	0.31 (-6%)	412
186*-201	40	100	0.99	0.39 (-41%)	0.19 (-42%)	533
202*-213	80	100	0.99	0.25 (-62%)	0.19 (-42%)	636
214*-219	80	100	0.97	0.39 (-41%)	0.21 (-36%)	550
220*-231	160	100	0.98	0.26 (-60%)	0.15 (-54%)	651
232*-245	160	100	0.94 (-4%)	0.19 (-71%)	0.11 (-66%)	894
246*-257	320	100	0.91 (-7%)	0.18 (-72%)	0.10 (-69%)	918
258*	320	100	0.83 (-15%)	0.11 (-83%)	0.09 (-72%)	962

^b Porcentajes de disminución calculados con respecto a las velocidades específicas del control 1.

^a Porcentajes de disminución calculados con respecto a las velocidades específicas del control 2.

*Ciclo en el cual se realizó la cinética.

Por otro lado, cuando el consorcio nitrificante estuvo en presencia de concentraciones de 80 a 160 mg C/L, se observó una disminución de más del 50% en las velocidades específicas

nitrificantes, con una eficiencia del 100 % y rendimientos nitrificantes cercanos a uno. Además, cuando se adicionaron 320 mg C/L después de 12 ciclos de operación del SBR (ciclo 258) se obtuvo un rendimiento nitrificante de 0.83 (15 % menor al control) y una eficiencia de consumo de amonio del 100 %. También se observó una reducción en el rendimiento que continuó disminuyendo a pesar de haber transcurrido 12 ciclos bajo las mismas condiciones.

Durante todos los tratamientos se puede observar que las BAO fueron las más afectadas ya que los valores de $q_{N-NH_4^+}$ siempre fueron menores en comparación con los valores de $q_{N-NO_3^-}$ de las BNO. Así mismo se puede observar que durante la primera adición de la mezcla fenólica (Cuadro 2, ciclo 37 y ciclos 106-121) la proteína microbiana sufrió un decremento, mientras que durante el transcurso de los ciclos posteriores incrementó para finalizar con un valor de 962 mg de proteína/L.

3.5 Oxidación de la mezcla fenólica.

En la fase de aclimatación (adición de 40 mg C/L) se observó una lenta oxidación de los compuestos fenólicos (Fig. 3 a), la cual presentó una completa oxidación de la mezcla fenólica después de 10 h de reacción que se alargó hasta 10 h, observando el siguiente orden de oxidación de los compuestos: *p*-cresol > *m*-cresol > fenol > *o*-cresol, mostrando que el *p*-cresol fue más rápidamente oxidado. En el transcurso de los ciclos 37-185 (Cuadro 3) las velocidades específicas de oxidación de los compuestos fenólicos fueron incrementando a pesar del incremento en la concentración de la mezcla fenólica (40 mg C/L, 10-20 mg C/L), además de presentar el mismo orden de oxidación de los compuestos fenólicos en donde el *p*-cresol siguió siendo el compuesto más fácilmente oxidado mientras que el *o*-cresol fue el más recalcitrante. A concentraciones de 40 mg C/L (ciclos 172-185) las velocidades de consumo de la mezcla fenólica fueron mayores que durante la fase de aclimatación (ciclo 37), en este caso no se observó gran acumulación de intermediarios lo que sugiere que al paso de los ciclos el consorcio nitrificante logró adaptarse a la presencia de la mezcla fenólica oxidándola con mayor facilidad. En el ciclo 186, se observó una disminución en las velocidades de oxidación de los compuestos aromáticos a excepción del *p*-cresol que continuó incrementando hasta el ciclo 231. Además, al incrementar la concentración de la mezcla fenólica de 80 a 160 mg C/L se observó un aumento en las

velocidades de oxidación de más del 100% (ciclo 202-231), mismas que disminuyeron después de haber transcurrido 12 ciclos a 160 mg C/L (ciclo 232), así como cuando se alimentó la concentración máxima de la mezcla fenólica (320 mg C/L). A partir de la presencia de 160 mg C/L se observó un cambio en la coloración del medio del SBR durante las primeras horas de reacción (4 h) de transparente a amarillo lo que sugiere la presencia de posibles intermediarios reactivos.

Cuadro 3. Velocidades de oxidación específicas de la mezcla fenólica y porcentajes de remoción de materia orgánica.

Ciclos	Concentración de mezcla fenólica (mg C/L)	$q_{o-cresol}$ h ⁻¹	q_{fenol} h ⁻¹	$q_{m-cresol}$ h ⁻¹	$q_{p-cresol}$ h ⁻¹	*Remoción de materia orgánica (%)
1-36	0 (control 1)					
37	40	-	0.03	0.025	0.010	62
38-42	0	-	-	-	-	
43-105	0 (control 2)					
106*-121	10	0.010	0.0025	0.0029	-	70
122*-135	10	0.016	0.036	0.046	0.00086	
136*-157	20	0.064	0.059	0.085	0.037	75
158*-171	20	0.085	0.088	0.053	0.035	
172*-185	40	0.54	0.40	0.40	0.21	81
186*-201	40	0.079 (-85%) ^a	0.18 (-55%) ^a	0.12 (-70%) ^a	0.30 (42.85%) ^a	
202*-213	80	0.66	0.61	0.72	0.44	57
214*-219	80	0.47	0.62	0.64	0.51	
220*-231	160	1.47	1.43	1.47	1.10	94
232*-245	160	0.34	0.58	0.68	0.92	
246*-257	320	0.55	0.62	0.60	0.64	100
258*	320	0.45 (-70%) ^b	0.52 (-63%) ^b	0.54 (-63%) ^b	0.43 (-60%) ^b	

^a Porcentajes de disminución calculados con respecto a las velocidades específicas del ciclo *172.

^b Porcentajes de disminución calculados con respecto a las velocidades específicas del ciclo *246.

*La remoción de materia orgánica fue calculada a partir de los resultados de la DQO.

Adicionalmente, los resultados de los porcentajes de remoción de materia orgánica calculados a partir de la demanda química de oxígeno (DQO) mostraron que conforme los ciclos de reacción aumentaban, el consorcio nitrificante fue capaz de mineralizar con mayor eficiencia la mezcla fenólica independientemente de la concentración fenólica. Esto confirmó que el SBR brindó estabilidad fisiológica al consorcio microbiano a lo largo de todo el experimento volviéndolo capaz de soportar concentraciones de hasta 640 mg C/día de compuestos aromáticos en mezcla.

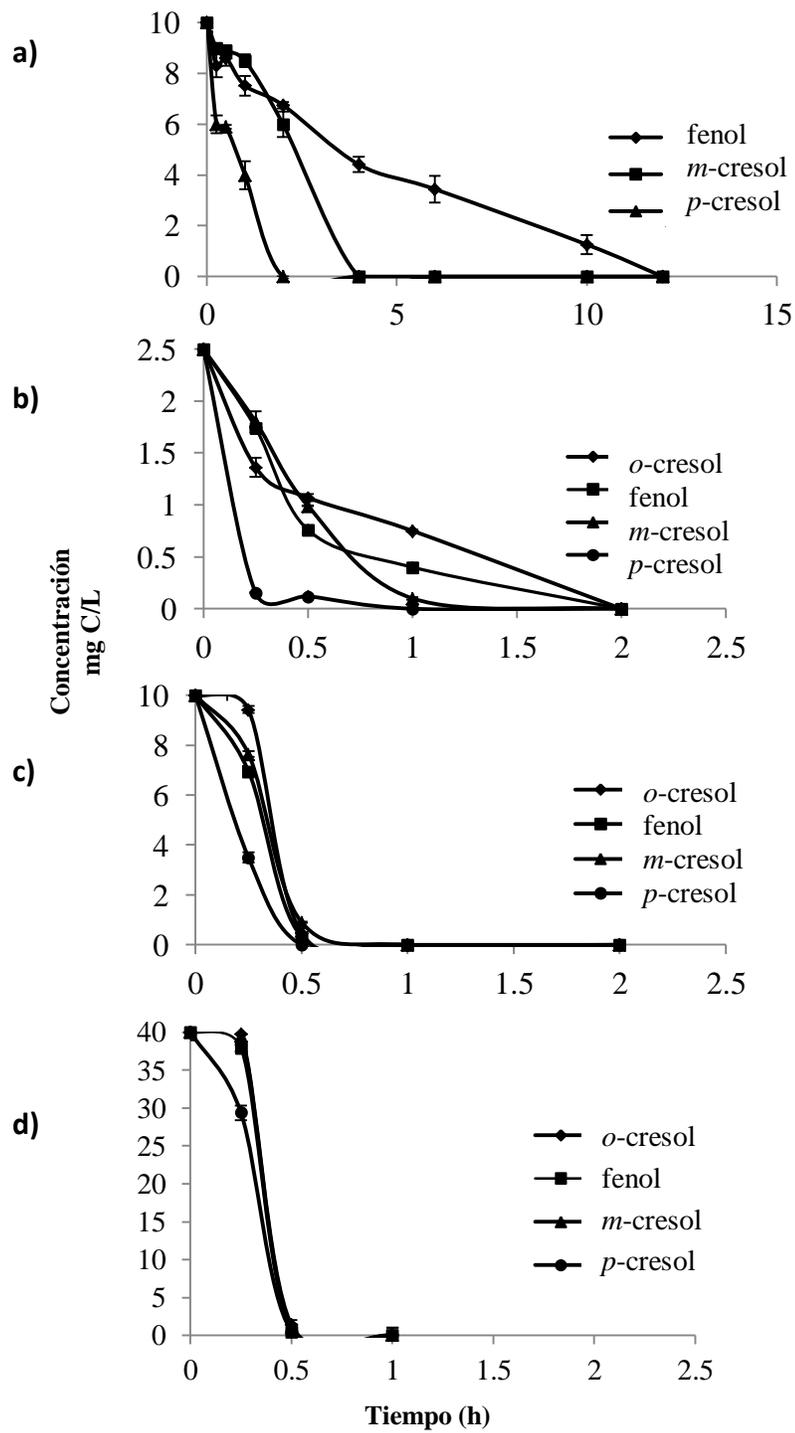


Figura 3. Cinética de oxidación de la mezcla fenólica en los distintos ciclos de operación del SBR: **a)** aclimatación (40 mg C/L), **b)** 10 mg C/L, **c)** 40 mg C/L, **d)** 160 mg C/L.

4. Discusiones

Los resultados confirmaron que en ausencia de la mezcla fenólica, el consorcio microbiano fue capaz de oxidar 100 mg/L de amonio hasta nitrato con valores altos de eficiencia y rendimiento por medio de la vía metabólica de la nitrificación, manteniéndose estable a lo largo de las 12 horas de reacción bajo un proceso desasimilativo. La presencia de la mezcla fenólica durante la aclimatación inhibió fuertemente el proceso nitrificante reduciendo en mayor medida la $q_{N-NH_4^+}$ lo que demuestra un posible daño o incluso muerte celular en las BAO como lo confirma Zhang et al., (2013) al observar que la adición de 2,6-diclorofenol provocó la desaparición de *Nitrosomonas europaea* del SBR nitrificante. Lo anterior también se confirma al comparar la reducción de la proteína microbiana del experimento control 1 con la de la fase de aclimatación con 40 mg C/L (Cuadro 11). Durante los ciclos 43-105, en ausencia de la mezcla fenólica el consorcio microbiano fue capaz de lograr nuevamente valores altos de eficiencia y rendimiento (control 2) sin embargo los valores de $q_{N-NH_4^+}$ redujeron en un 40% mientras que $q_{N-NO_3^-}$ en un 50% con respecto al control 1, es decir en ausencia de la mezcla fenólica el SBR mantuvo mayor estabilidad en las BAO que en las BNO. Estudios previos realizados por Texier y Gómez (2004) y Silva et al. (2014) han concluido que en ausencia de compuestos aromáticos el SBR brinda estabilidad a las BAO pero en presencia de compuestos aromáticos ocurre lo contrario (las BNO son más estables), este hecho respalda los resultados obtenidos en este trabajo.

La segunda adición de la mezcla fenólica (10 mg C/L) provocó nuevamente una inhibición al proceso respiratorio de las BAO mientras que las BNO se mantuvieron más estables, de igual forma el rendimiento disminuyó incluso en mayor grado que en la aclimatación, sin embargo la eficiencia fue del 100%. El bajo rendimiento en la obtención de nitrato a pesar de la alta eficiencia nitrificante se atribuye a que la materia orgánica pudo incrementar el crecimiento de microorganismos heterótrofos que pudieran formar parte del consorcio y que también son capaces de obtener energía del amonio, generando competencia con los autótrofos por el sustrato (Rostron et al., 2001; Amor et al., 2005).

La presencia de hasta 20 mg C/L (ciclos 136-171) de la mezcla fenólica no demostró tener un fuerte efecto sobre el proceso, pero al mantener una concentración de 40 mg C/L durante 14 ciclos de reacción (ciclo 172-186) se observó una mayor inhibición. La disminución en las velocidades específicas nitrificantes se atribuye a que la presencia de

materia orgánica favorece la competencia entre los microorganismos nitrificantes (quimiolitoautótrofos) y heterótrofos por el amonio y el oxígeno disuelto haciendo que el proceso nitrificante se vuelva inestable cinéticamente (Hanaki, et al., 1990; Kim et al., 2008). Por otro lado, se sabe que los microorganismos nitrificantes son capaces de adaptarse a la presencia de materia orgánica mediante la reducción del volumen de su membrana celular, lo que a su vez provoca un cambio irreversible en su permeabilidad y por consiguiente en la velocidad de transporte del amonio (Isken y de Bont, 1998; Radniecki et al, 2011).

El incremento de la mezcla fenólica hasta 160 mg C/L continuó disminuyendo las velocidades específicas pero no el rendimiento, el cual sufrió una reducción considerable al añadir 320 mg C/L y no fue capaz de recuperarse incluso después de haber transcurrido 12 ciclos de reacción bajo las mismas condiciones. La adición de hasta 640 mg C/día pudo haber promovido en mayor cantidad el crecimiento de los microorganismos heterótrofos del consorcio microbiano, provocando que el rendimiento disminuya debido al uso del amonio como posible sustrato lo que volvió el proceso asimilativo.

El retardo en la nitrificación se atribuye a que la enzima amonio oxidante (AMO) también es capaz de oxidar compuestos aromáticos sin obtener energía, dejando en segundo término la oxidación del amonio (Texier y Gómez 2007; Silva et al., 2011), aunque otros autores demuestran que la oxidación de compuestos aromáticos como el *p*-cresol no se debe a la presencia de la AMO si no a otro tipo de enzimas pertenecientes a los microorganismos nitrificantes, entonces se requieren de estudio enzimáticos para verificar la actividad de las enzimas en la oxidación fenólica. Por otro lado, se sabe que los compuestos fenólicos son capaces de acumularse en la membrana celular provocando un incremento en su permeabilidad y por ende un posible gasto energético debido a la isomerización de ácidos grasos de *cis* a *trans* para adaptarse a la presencia de compuestos recalcitrantes tales como los compuestos aromáticos (Sikkema et al., 1994; Heipieper et al., 2003), provocando una disminución de la velocidad en el transporte del sustrato a través de la membrana (Isken y Bont, 1998).

La oxidación de 40 mg C/L de la mezcla fenólica durante la fase de aclimatación (Fig. 5a) fue lenta acompañada de la formación de un intermediario reactivo que permaneció más de 12 h en la reacción al compararla con la oxidación de la misma cantidad de mezcla fenólica

después de haber aclimatado al consorcio microbiano (Fig. 5c), donde el intermediario solamente fue visible en los primeros minutos de la reacción. Silva et al. (2009) estudiaron la biotransformación del *p*-cresol por medio de un consorcio nitrificante donde observó que la presencia del intermediario *p*-hidroxibenzaldehído ejercía mayor efecto inhibitorio en la nitrificación que el compuesto inicial, en este estudio la nitrificación se recuperó después de 5 ciclos de 24 horas. Por otro lado, se sabe que la exposición de los microorganismos como *Nitrosomonas europaea* (BAO) a compuestos fenólicos induce la expresión de enzimas involucradas en la oxidación fenólica que pudieran en un futuro incrementar la velocidad en la oxidación fenólica incluso a concentraciones más elevadas. Durante el incremento de la mezcla fenólica y de los ciclos de reacción el consorcio nitrificante fue capaz de oxidar con mayor facilidad los compuestos fenólicos (Fig. 5), esto evidenció así como en otros trabajos (Texier y Gómez, 2007; Beristain et al., 2009; Silva et al., 2014) que el incremento en el número de ciclos en el SBR propicia una adaptación respiratoria de los microorganismos a la presencia de los compuestos aromáticos y por lo tanto una mayor facilidad para oxidarlos, además de que la presencia de materia orgánica promueve el crecimiento y/o activación de las bacterias heterótrofas en la oxidación de los compuestos fenólicos (Pereira et al., 2014).

El orden en la oxidación de la mezcla fenólica (*p*-cresol > *m*-cresol > fenol > *o*-cresol) demostró que el *p*-cresol fue oxidado con mayor facilidad y que el *o*-cresol fue el más recalcitrante, se sabe que el efecto inhibitorio de los compuestos fenólicos sobre los microorganismos nitrificantes depende de la estructura de la molécula. Por ejemplo Radniecki et al. (2011) en su estudio asociaron la disminución de la pared celular de *Nitrosomonas europaea* a la acumulación de compuestos fenólicos.

La disminución en las velocidades de oxidación durante el tratamiento de 160 a 320 mg C/L de la mezcla, puede ser atribuido a que algunas bacterias responsables de la oxidación fenólica ya no fueron capaces de subsistir debido a la presencia de concentraciones mayores o iguales a concentraciones de 200 mg de C/L de *p*-cresol, la cual puede provocar la ausencia de microorganismos organótrofos (*Thauera mechernichensis* y *Variovorax paradoxus*), presentes en consorcios nitrificantes y que son capaces de oxidar compuestos tales como el fenol y cresoles (Mao et al., 2010; Silva et al., 2014). El cambio de coloración del medio en el SBR a partir de concentraciones de 160 mg C/L de la mezcla, según

Hooper y Taylor (1974) indica la presencia de intermediarios reactivos que también tienen un papel importante en la inhibición de las enzimas nitrificantes así como de las enzimas involucradas en la oxidación de la mezcla fenólica (Duddleston et al., 2002).

Por ejemplo, Salas, Cuervo y Texier (2016) evaluaron la capacidad de un consorcio nitrificante para oxidar simultáneamente 138 mg N/día y hasta 90 mg C/L de una mezcla de *o*-cresol, *m*-cresol y *p*-cresol, este estudio evaluó la adición de los cresoles por fases: *m*-cresol, *m*-cresol + *o*-cresol y *m*-cresol + *o*-cresol + *p*-cresol. A pesar de que se observó la eliminación simultánea de la mezcla, solamente se logró establecer la velocidad específica del *m*-cresol a concentraciones de 60 mg C/L mientras que no se reportaron las velocidades de oxidación del *p*-cresol. En el presente trabajo se evaluó la capacidad de un consorcio microbiano para oxidar 100 mg N/L de amonio en presencia (en mezcla) de hasta 320 mg C/L de fenol, *m*-cresol, *o*-cresol y *p*-cresol verificando la oxidación de los cuatro compuestos fenólicos y demostrando que el *p*-cresol fue el compuesto más fácil de oxidar.

Los resultados de la demanda química de oxígeno evidenciaron que durante la primera adición de la mezcla (pre-aclimatación), el consorcio no fue capaz de remover toda la materia orgánica, sin embargo al paso de los ciclos la cantidad de materia orgánica remanente fue disminuyendo hasta alcanzar el 100% de remoción de 640 mg C/L al día. Los consorcios microbianos nitrificantes están conformados por bacterias autótrofas y heterótrofas, pese a que a las heterótrofas se le atribuye la oxidación de los compuestos fenólicos se sabe que existen autótrofas facultativas que también pueden oxidar la materia orgánica, por lo que se requieren de mayores estudios que puedan proporcionar mayor información al respecto.

5. Conclusiones

El consorcio microbiano en ausencia de la mezcla fenólica fue capaz de oxidar completamente 200 mg N/L al día bajo un proceso respiratorio estable y desasimilativo con valores altos de eficiencia ($E_{N-NH_4^+}$ del 100% \pm 0.016) y rendimiento ($Y_{N-NO_3^-}$ de 0.95 \pm 0.07).

El consorcio microbiano nitrificante fue capaz de oxidar completamente y en forma simultánea 200 mg N-NH₄⁺/L al día y hasta 640 mg C/L al día de la mezcla fenólica a pesar de presentar un efecto inhibitorio del 83% en las BAO y del 72% en las BNO.

Durante la mineralización de los compuestos fenólicos se observó a través de las velocidades específicas de oxidación que el orden de oxidación fue: (*p*-cresol > *m*-cresol > fenol > *o*-cresol) siendo el *o*-cresol el compuesto más recalcitrante.

6. Referencias

- Amor, L., Eiroa, M., Kennes, C., & Veiga, M. C. (2005). Phenol biodegradation and its effect on the nitrification process. *Water Research*, 39(13), 2915-2920.
- Arp, D. J., Chain, P. S., & Klotz, M. G. (2007). The Impact of Genome Analyses on Our Understanding of Ammonia-Oxidizing Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 61, 503-528.
- Beristain C. R., Texier, A. C., Razo F. E., Méndez P. R., & Gómez, J. (2009). Biotransformation of aromatic compounds from wastewaters containing N and/or S, by nitrification/denitrification: a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 8(4), 325-342.
- Cortés L. C., Rodríguez D. M., Sipkema, D., Juárez J. B., Rodelas, B., Smidt, H. 2015. Effect of salinity on nitrification efficiency and structure of ammonia-oxidizing bacterial communities in a submerged fixed bed bioreactor. *Chemical Engineering Journal*, 266, 233-240
- Duddlestone, K., Arp, D., & Bottomley, P. (2002). Biodegradation of monohalogenated alkanes by soil NH₃-oxidizing bacteria. *Applied microbiology and biotechnology*, 59(4-5), 535-539.
- Dytczak, M. A., Londry, K. L., y Oleszkiewicz, J. A. 2008. Activated sludge operational regime has significant impact on the type of nitrifying community and its nitrification rates. *Water Research*, 42(8), 2320-2328
- Gaur, R., & Khare, S. K. (2009). Cellular response mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* PseA during growth in organic solvents. *Letters in applied microbiology*, 49(3), 372-377.
- Gavrilescu, M. 2010. Environmental biotechnology: achievements, opportunities and challenges. *Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology*, 4(1), 1-36.
- Ge, Q., Yue, X., y Wang, G. 2015. Simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification at high initial phenol concentration by isolated bacterium *Diaphorobacter* sp. PD-7. *Chinese Journal of Chemical Engineering*.
- Hanaki, K., Wantawin, C., & Ohgaki, S. (1990). Effects of the activity of heterotrophs on nitrification in a suspended-growth reactor. *Water Research*, 24(3), 289-296.
- Heipieper, H. J., Meinhardt, F., & Segura, A. (2003). The cis-trans isomerase of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas* and *Vibrio*: biochemistry, molecular biology and physiological function of a unique stress adaptive mechanism. *FEMS microbiology letters*, 229(1), 1-7.
- Hopper, D. J., & Taylor, D. G. (1975). Pathways for the degradation of m-cresol and p-cresol by *Pseudomonas putida*. *Journal of bacteriology*, 122(1), 1-6.
- Isken, S., & de Bont, J. A. (1998). Bacteria tolerant to organic solvents. *Extremophiles*, 2(3), 229-238.
- Jaranowska, P., Cydzik-Kwiatkowska, A., & Zielińska, M. (2013). Configuration of biological wastewater treatment line and influent composition as the main factors driving bacterial community structure of activated sludge. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(7), 1145-1153.
- Kim, Y. M., Park, D., Lee, D. S., & Park, J. M. (2008). Inhibitory effects of toxic compounds on nitrification process for cokes wastewater treatment. *Journal of Hazardous Materials*, 152(3), 915-921.

- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193(1), 265-275.
- Mao, Y., Zhang, X., Xia, X., Zhong, H., & Zhao, L. (2010). Versatile aromatic compound-degrading capacity and microdiversity of *Thauera* strains isolated from a coking wastewater treatment bioreactor. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 37(9), 927-934.
- Métodos Estándar de Análisis de Aguas y Aguas Residuales, 1981.
- Olmos, A., Olguin, P., Fajardo, C., Razo, E., & Monroy, O. (2004). Physicochemical characterization of spent caustic from the OXIMER process and sour waters from Mexican oil refineries. *Energy & fuels*, 18(2), 302-304.
- Pereira, A. D., Leal, C. D., Dias, M. F., Etchebehere, C., Chernicharo, C. A. L., & de Araújo, J. C. (2014). Effect of phenol on the nitrogen removal performance and microbial community structure and composition of an anammox reactor. *Bioresource technology*, 166, 103-111.
- Radniecki, T. S., Gilroy, C. A., & Semprini, L. (2011). Linking NE1545 gene expression with cell volume changes in *Nitrosomonas europaea* cells exposed to aromatic hydrocarbons. *Chemosphere*, 82(4), 514-520.
- Rostron, W. M., Stuckey, D. C., & Young, A. A. (2001). Nitrification of high strength ammonia wastewaters: comparative study of immobilisation media. *Water Research*, 35(5), 1169-1178.
- Salas-Cortés, J. A., de María Cuervo-López, F., & Texier, A. C. (2016). Simultaneous oxidation of ammonium and cresol isomers in a sequencing batch reactor: physiological and kinetic study. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-9.
- Searle, P. L. (1984). The Berthelot or indophenol reaction and its use in the analytical chemistry of nitrogen. A review. *Analyst*, 109(5), 549-568.
- Silva, C., Gómez, J., Houbron, E., Cuervo-López, F., & Texier, A.-C. (2009). *p*-Cresol biotransformation by a nitrifying consortium. *Chemosphere*, 75(10), 1387-1391.
- Silva, C., Gómez, J., & Beristain C, R. (2011). Simultaneous removal of 2-chlorophenol, phenol, *p*-cresol and *p*-hydroxybenzaldehyde under nitrifying conditions: kinetic study. *Bioresource technology*, 102(11), 6464-6468.
- Silva, C. D., Beristain-Montiel, L., de Maria Cuervo-López, F., & Texier, A. C. (2014). *p*-Cresol mineralization and bacterial population dynamics in a nitrifying sequential batch reactor. *Journal of Environmental Sciences*, 26(9), 1885-1893.
- Sikkema, J., De Bont, J. A., & Poolman, B. (1994). Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 269(11), 8022-8028.
- Texier, A. C., y Gómez, J. (2002). Tolerance of nitrifying sludge to *p*-cresol. *Biotechnology letters*, 24(4), 321-324.
- Texier, A.-C., & Gomez, J. (2004). Settleability and kinetics of a nitrifying sludge in a sequencing batch reactor. *Canadian journal of microbiology*, 50(11), 943-949.
- Texier, A. C., & Gomez, J. (2007). Simultaneous nitrification and *p*-cresol oxidation in a nitrifying sequencing batch reactor. *Water research*, 41(2), 315-322.
- Xiao, Y., De Araujo, C., Sze, C. C., y Stuckey, D. C. 2015. Toxicity measurement in biological wastewater treatment processes: A review. *Journal of hazardous materials*, 286, 15-29.

- Yamagishi, T., Leite, J., Ueda, S., Yamaguchi, F., & Suwa, Y. (2001). Simultaneous removal of phenol and ammonia by an activated sludge process with cross-flow filtration. *Water Research*, 35(13), 3089-3096.
- Zepeda, A., Texier, A. C., & Gomez, J. (2003). Benzene transformation in nitrifying batch cultures. *Biotechnology progress*, 19(3), 789-793.
- Zepeda, A., Ben-Youssef, C., Rincón, S., Cuervo-López, F., & Gómez, J. (2013). Complete and simultaneous removal of ammonium and m-cresol in a nitrifying sequencing batch reactor. *Biodegradation*, 24(3), 377-385.
- Zhang, J., Tian, Y., Zuo, W., Chen, L., & Yin, L. (2013). Inhibition of nitrification by the metabolic uncoupler, 2, 6-dichlorophenol (2, 6-DCP) in a sequencing batch reactor. *Chemical engineering journal*, 233, 132-137.

6. ANEXOS

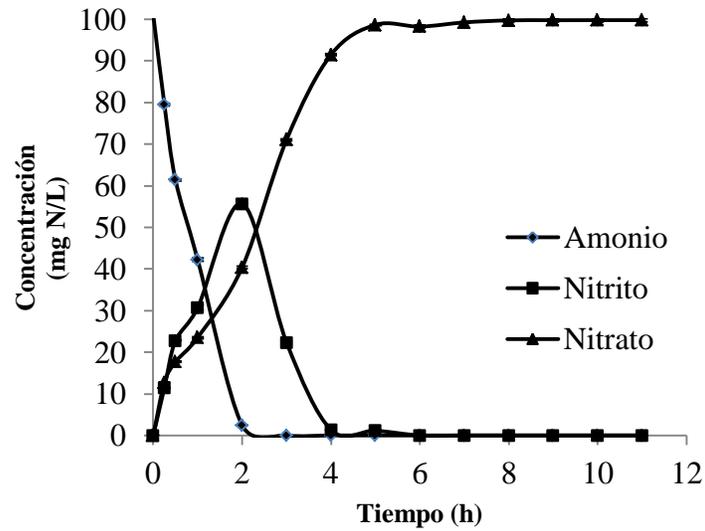


Figura 4. Comportamiento del proceso nitrificante en ausencia de la mezcla fenólica (C2) después de la aclimatación.

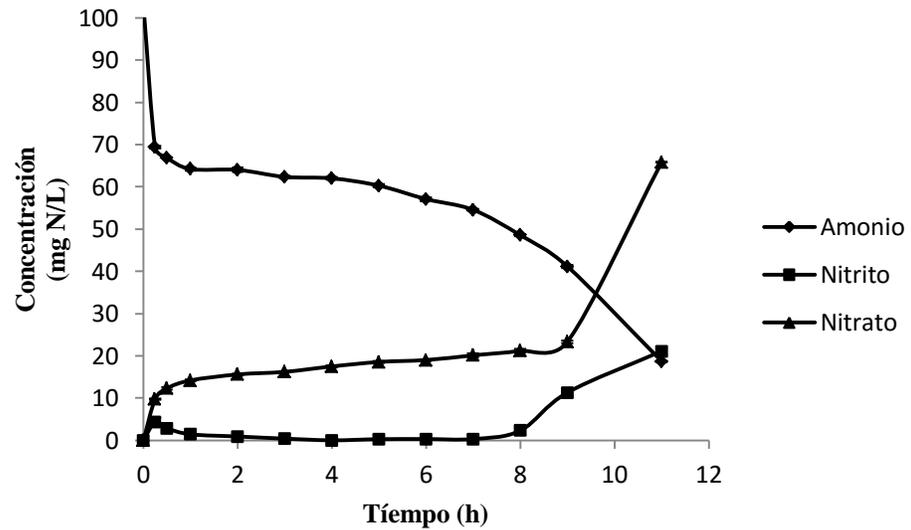


Figura 5. Comportamiento del proceso nitrificante durante la adición de 10 mg C/L de la mezcla fenólica.

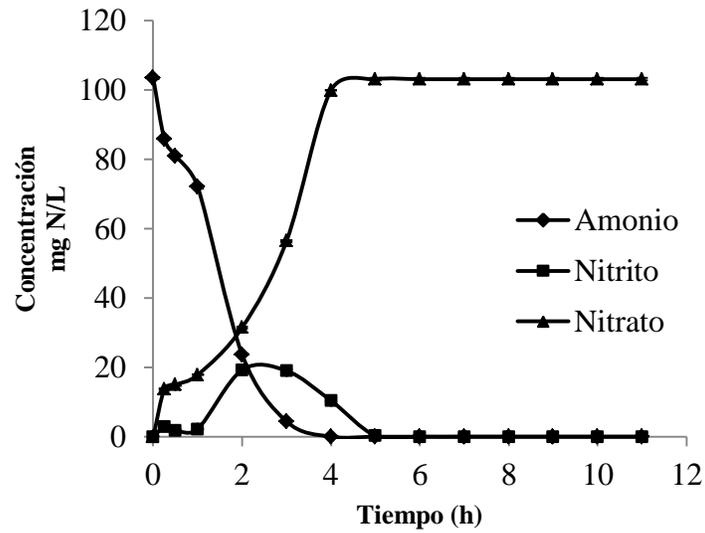


Figura 6. Comportamiento del proceso nitrificante después de 16 ciclos con 10 mg C/_L de la mezcla fenólica.

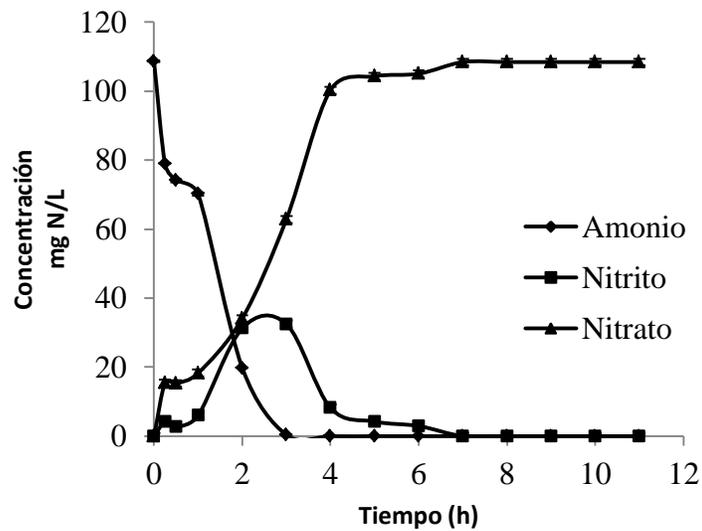


Figura 7. Comportamiento del proceso nitrificante en presencia de 20 mg C/L de la mezcla fenólica.

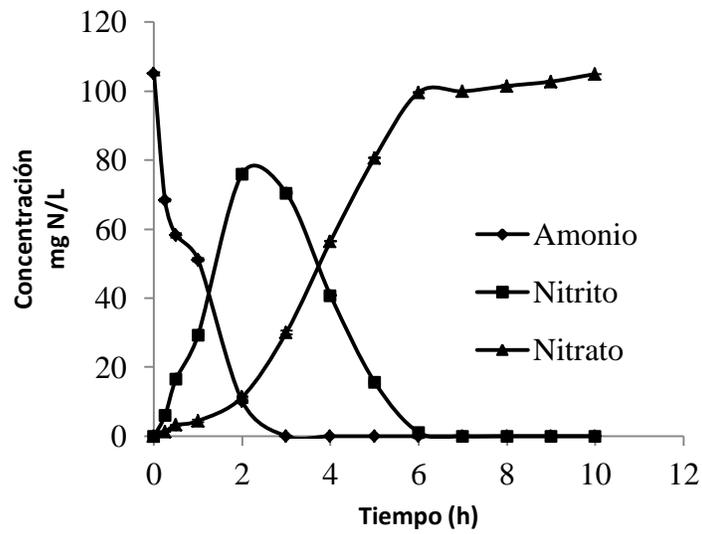


Figura 8. Comportamiento del proceso nitrificante en presencia por vez primera de 40 mg C/L de la mezcla fenólica.

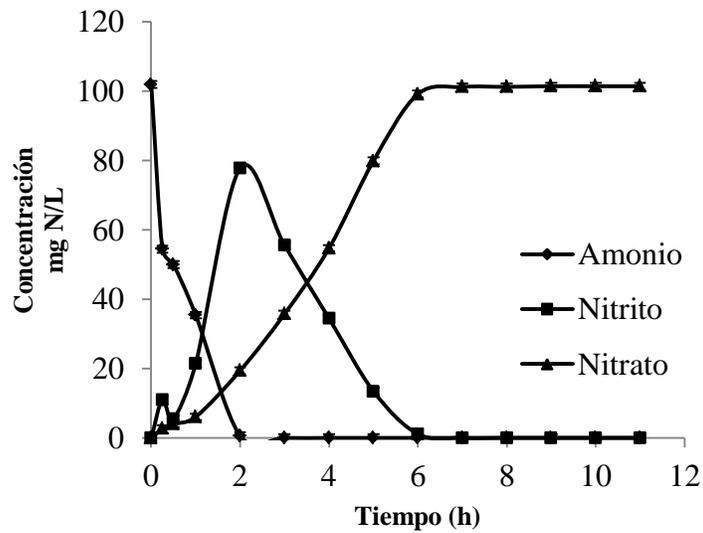


Figura 9. Comportamiento del proceso nitrificante en presencia por vez primera de 80 mg C/L de la mezcla fenólica.

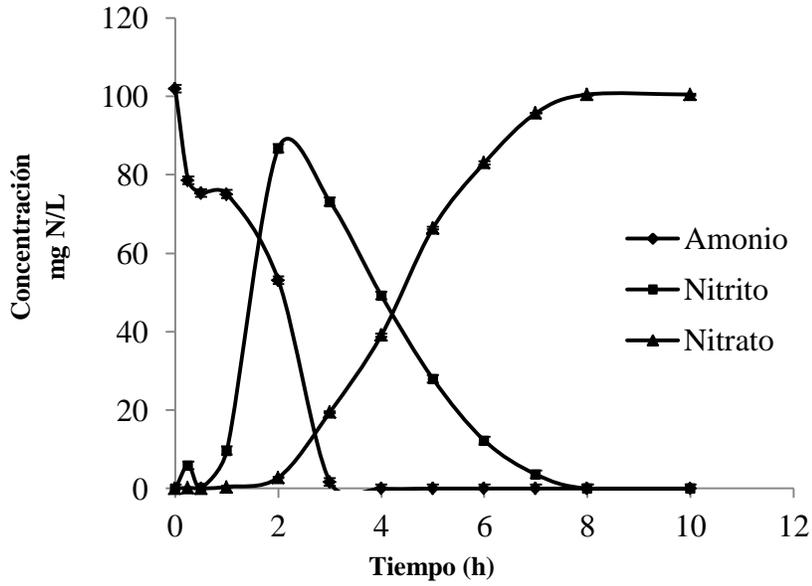


Figura 10. Comportamiento del proceso nitrificante en presencia por vez primera de 160 mg C/L de la mezcla fenólica.

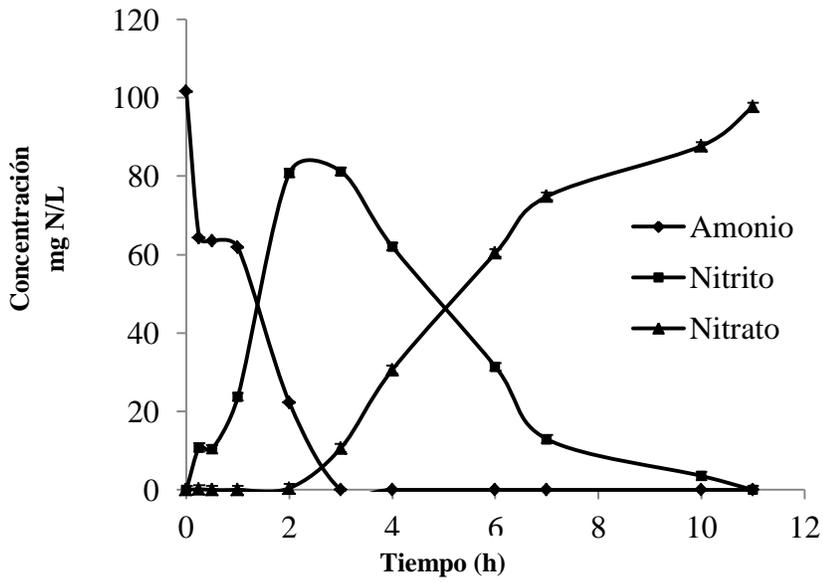


Figura 11. Comportamiento del proceso nitrificante en presencia de 320 mg C/L de la mezcla fenólica.