



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

**CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE LA ELIMINACIÓN SIMULTÁNEA
DE *p*-CRESOL y AMONIO POR UN LODO DESNITRIFICANTE**

DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA

GEHOVANA GONZÁLEZ BLANCO

DIRECTOR: Dr. Gregorio Jorge Gómez Hernández

ASESORES: Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo

Dra. Flor de María Cuervo López

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), con la referencia 001466

Esta tesis se llevó a cabo en el Laboratorio de Fisiología Microbiana W-004 del Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa. Fue financiado a través de la beca número 181018 otorgada por el CONACyT.

México D.F. a 25 de Agosto 2014

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

CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE LA ELIMINACIÓN SIMULTÁNEA DE *p*-CRESOL Y AMONIO POR UN LODO DESNITRIFICANTE

Que presentó

Mtra. en B. Gehovana González Blanco

Comité tutorial

Dr. Gregorio Jorge Gómez Hernández
Director, UAM-Iztapalapa

Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo
Asesor, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT)

Dra. Flor de María Cuervo López
Asesora, UAM-Iztapalapa

H. Jurado

Presidente: Dr. Sergio Revah Mosieev

Secretario: Dr. Elías Razo Flores

Vocal: Dr. Simón González Martínez

Vocal: Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo



AGRADECIMIENTOS

Una página no alcanzaría para citar y agradecer a todos los que de forma directa o indirectamente contribuyeron en la realización y conclusión de esta meta. Para no caer en omisiones sólo diré:

¡GRACIAS A TODOS!

CON AMOR A
DARIEN Y RICARDO

A MIS PADRES
GLORIA Y JOSÉ LUIS[†]

A MIS HERMANOS Y FAMILIARES.
EN ESPECIAL A ALEJANDRA, POR SER
UNA SEGUNDA MADRE PARA MI HIJO

Y POR SUPUESTO A DIOS

RESUMEN

El presente trabajo aporta información metabólica, cinética y contribuye al entendimiento del comportamiento de un consorcio anaerobio estabilizado bajo condiciones desnitrificantes, durante la eliminación de amonio, nitrito/nitrato y *p*-cresol. El amonio es uno de los compuestos nitrogenados más frecuentes en las aguas residuales y suele oxidarse hasta N₂ por la nitrificación-desnitrificación de forma secuenciada y de modo directo por medio de la oxidación anaerobia (anammox). Actualmente, se está optando por el acoplamiento de la nitrificación-desnitrificación vía nitrito, por las posibles ventajas: 1) bajo consumo energético (baja aireación), 2) baja producción de lodos, 3) altas velocidades desnitrificantes con materia orgánica de fácil oxidación. Poco se sabe del proceso de óxido-reducción del nitrito y un compuesto fenólico, como el *p*-cresol, así como el de la oxidación anaerobia de amonio hasta N₂ bajo condiciones desnitrificantes. El proceso o los procesos respiratorios observados en este trabajo se evaluaron a través de variables de respuesta como: eficiencias de consumo, rendimientos de producto, así como las velocidades específicas tanto de consumo como de producción. Los aspectos inhibitorios se determinaron a través de la ecuación de Haldane.

En cultivos en lote, se evaluó la capacidad metabólica de un lodo desnitrificante fisiológicamente estable, para oxidar el amonio y el *p*-cresol, empleando el nitrito como aceptor final de electrones. A una concentración inicial de 50 mg N-NH₄⁺/L y 76 mg N-NO₂⁻/L, el lodo desnitrificante consumió ambos sustratos, siendo el N₂ el producto principal (Y_{N₂} de 0.88 ± 0.03). Los resultados mostraron que el lodo desnitrificante fue metabólicamente capaz de oxidar bajo condiciones anaerobias el amonio hasta N₂. Posteriormente, se evaluó el lodo en presencia de *p*-cresol, amonio y nitrito, esto es, bajo órgano-litotrofia. Los resultados experimentales indicaron que el lodo desnitrificante mineralizó el *p*-cresol, y óxido el amonio hasta N₂ acoplado a la reducción de nitrito. Este es posiblemente el primer trabajo donde se observa la oxidación simultánea de amonio y *p*-cresol con la producción de N₂, empleando un lodo bajo condiciones desnitrificantes órgano-litotróficas.

En otra etapa, con cultivos en lote, se evaluó la conducta metabólica y cinética del lodo desnitrificante en presencia de diferentes concentraciones iniciales de *p*-cresol, (10 a 65 mg/L),

con nitrito a una concentración de 85 ± 2 mg N/L como aceptor de electrones. La reducción del nitrito se acopló a la oxidación del *p*-cresol a las concentraciones de 10 a 45 mg/L, y la velocidad específica de consumo de nitrito incrementó de 3.10 ± 0.11 a 7.02 ± 0.23 mg N-NO₂⁻/g SSV h. Los productos finales fueron, CO₂ y N₂. A concentraciones mayores que 45 mg/L de *p*-cresol, se observó una inhibición que se reflejó en una disminución la velocidad específica de consumo de nitrito de 6.80 a 1.60 mg N-NO₂⁻/g SSV h. Un balance de electrones sugirió que el consumo de *p*-cresol se llevó a cabo por dos procesos biológicos: desnitrificación y fermentación, y los productos finales fueron N₂ y acetato. El perfil cinético se ajustó al modelo de Haldane, obteniéndose una constante de inhibición (*k_i*) de 35.75 mg *p*-cresol/L, una constante de afinidad (*K_s*) de 20.32 mg *p*-cresol/L y una velocidad de consumo específica de nitrito (*q_{max}*) de 9.48 mg N-NO₂⁻/g SSV h.

En una etapa final, y también con cultivos en lote, se evaluó la oxidación de *p*-cresol y amonio, en presencia de nitrato. Inicialmente el *p*-cresol se acopló a la reducción de nitrato, produciéndose transitoriamente nitrito y posibles compuestos orgánicos de tipo fenólico. Posteriormente el consorcio desnitrificante empleó el nitrito como agente oxidante para la oxidación de amonio hasta N₂. En términos globales, el *p*-cresol se consumió completamente y se mineralizó en un 65%, mientras el amonio y nitrato se consumieron en un 83 y 92%, respectivamente. Las condiciones iniciales propiciaron la acumulación transitoria de nitrito, permitiendo la oxidación anaerobia de amonio y la desnitrificación de tipo organotrófica, promoviéndose la eliminación simultánea de *p*-cresol, amonio y nitrato. Se identificó un intermediario carbonado que detuvo transitoriamente el proceso respiratorio de la desnitrificación.

Los resultados experimentales proporcionaron información relevante que debería ser considerada cuando se definan estrategias para el diseño y operación de plantas de tratamiento de aguas residuales contaminadas con amonio, nitrato/nitrito y compuestos fenólicos.

ABSTRACT

The present work provides metabolic and kinetic understanding of an anaerobic consortium under denitrifying conditions, and during ammonium, nitrite/nitrate, and *p*-cresol removal. The major nitrogenous compound in wastewaters is ammonium, and it is usually oxidized into N₂ by nitrification-denitrification, or directly by means of anaerobic ammonium oxidation (Anammox). Currently, scientific community is opting for the coupling of nitrification- denitrification via nitrite, owing to the following advantages: 1) low energy requirement (low aeration), 2) low sludge production, 3) and high denitrifying rates reported with organic matter of easily degradation. However, the understanding about the redox process of nitrite linked to *p*-cresol is scarce, as well as the anaerobic ammonium oxidation into N₂ under denitrifying conditions. The respiratory process or processes that coexisted in the batch cultures were evaluated through response variables such as; consumption efficiencies, product yields and specific rates. On the other hand, the inhibitory aspect was determined by Haldane equation; mathematical model of inhibition by substrate.

In the first part, the metabolic capability of denitrifying sludge to oxidize ammonia and *p*-cresol, using nitrite as terminal electron acceptor was evaluated in batch cultures. At initial concentration of 50 mg NH₄⁺-N/L and 76 mg NO₂⁻-N/ L, the denitrifying sludge consumed both substrates, being the main product, N₂ (Y_{N₂} of 0.88 ± 0.03). These results showed that the denitrifying sludge showed metabolic capacity to oxidize ammonium up to N₂. Subsequently, the metabolic aspect of the sludge was evaluated in presence of *p*-cresol, ammonium and nitrite. The experimental results showed that the denitrifying sludge mineralized *p*-cresol, and ammonium was biotransformed up to N₂; both substrates were coupled to nitrite reduction. This is the first study which reports the simultaneous oxidation of ammonium and *p*-cresol with the production of N₂, using a stabilized sludge under litho-organotrophic denitrifying conditions.

In another phase, in batch cultures, the metabolic and kinetic behavior of the denitrifying sludge was evaluated in presence of different initial *p*-cresol concentrations, ranging from 10 to 65 mg/L. Nitrite was used as terminal electron acceptor, at concentration of 85 ± 2 mg N/L. Over the range from 10 to 45 mg *p*-cresol-C/L tested, nitrite reduction was linked to *p*-cresol oxidation and the specific rate increased from 3.10 ± 0.11 to 7.02 ± 0.23 mg NO₂⁻-N/g VSS h, with CO₂ and N₂ as

end products. At higher initial *p*-cresol concentrations tested (above 45 mg/L), inhibition was observed, diminishing the specific rate from 6.8 to 1.60 mg NO₂⁻-N/ g VSS h. Electron balance showed that *p*-cresol consumption was carried out by two biological processes: denitrification and fermentation, and the end global products were N₂ and acetate. The kinetic profile followed the Haldane model, with inhibition constant (K_i) of 35.75 mg *p*-cresol/L, affinity constant (K_s) of 20.32 mg *p*-cresol/L and maximum specific nitrite reduction (q_{max}) of 9.48 mg NO₂⁻-N/ g VSS h.

In a final phase, also in batch cultures, the oxidation of *p*-cresol and ammonium in presence of nitrate was evaluated. At the beginning, *p*-cresol was linked to nitrate reduction, transiently producing intermediates like nitrite and phenolic compounds. Afterward, the denitrifying sludge used nitrite as oxidizing source for ammonium oxidation into N₂. In global terms, *p*-cresol was totally consumed and it was mineralized at 65%; whereas ammonium and nitrate were consumed at 83 and 92%, respectively. Initial environmental conditions promoted nitrite accumulation, allowing the anaerobic ammonium oxidation and organotrophic denitrification, with simultaneous removal of *p*-cresol, ammonium and nitrate. Phenolic intermediate was identified which stopped transiently the respiratory process of denitrification.

Finally, this research provided essential information that should be considered when defining strategies for the design and operation of wastewater treatment plants polluted with ammonium, nitrate/nitrite and phenolic compounds.

ÍNDE DE CONTENIDO

RESUMEN	1
ABSTRACT	1
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 CICLO DEL NITRÓGENO	5
1.1.1 NITRIFICACIÓN	7
1.1.2 OXIDACIÓN ANAEROBIA DEL AMONIO	10
1.1.3 DESNITRIFICACIÓN	14
1.1.3.1 Bioquímica de la desnitrificación	16
1.1.3.2 Fisiología de la desnitrificación	20
1.1.3.3 Microbiología de la desnitrificación	22
1.1.3.4 Cinética de la desnitrificación	24
1.1.3.5 Factores que afectan la desnitrificación	27
1.2 BIBLIOGRAFÍA	31
2. ANTECEDENTES	42
2.1 DESNITRIFICACIÓN CON NITRITO	42
2.2 SISTEMAS DE TRATAMIENTO PARA LA BIOTRANSFORMACIÓN DE COMPUESTOS NITROGENADOS POR DESNITRIFICACIÓN CON NITRITO	44
2.3 OXIDACIÓN DE AMONIO EN PRESENCIA DE MATERIA ORGÁNICA POR DESNITRIFICACIÓN CON NITRATO EN UN SOLO REACTOR	48
2.4 OXIDACIÓN BIOLÓGICA DEL <i>p</i> -CRESOL BAJO CONDICIONES DESNITRIFICANTES	51
2.5 BIBLIOGRAFÍA	56
3. JUSTIFICACIÓN	60
4. HIPÓTESIS	61
5. OBJETIVOS	61
5.1 GENERAL	61
5.2 ESPECÍFICOS	61
6. METODOLOGÍA	62
6.1 OPERACIÓN DEL REACTOR CONTINUO DE TANQUE AGITADO	63
6.2 MEDIO DE CULTIVO	64

6.3	CULTIVOS EN LOTE	64
6.4	EVALUACIÓN DE LOS CULTIVOS	65
6.5	MÉTODOS ANALÍTICOS	67
6.5.1	Cuantificación de iones	67
6.5.2	Cuantificación de amonio	68
6.5.3	Cuantificación del <i>p</i> -cresol e intermediarios aromáticos	69
6.5.4	Cuantificación de nitrógeno molecular, dióxido de carbono y óxido nitroso	70
6.5.5	Cuantificación de acetato	71
6.5.6	Carbono orgánico e inorgánico	72
6.5.7	Cuantificación de sólidos suspendidos volátiles (SSV)	73
6.6	BIBLIOGRAFÍA	74
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	76
7.1	CULTIVO CONTINUO	78
7.1.1	REACTOR OPERADO EN CONTINUO BAJO CONDICIONES DESNITRIFICANTES	78
7.2	CULTIVOS EN LOTE	82
7.2.1	OXIDACIÓN SIMULTÁNEA DE AMONIO Y <i>P</i> -CRESOL ACOPLADO A LA REDUCCIÓN DE NITRITO, EMPLEANDO UN LODO DESNITRIFICANTE.	83
7.2.2	NITRITO COMO PODER OXIDANTE PARA LA ELIMINACIÓN DE <i>P</i> -CRESOL EMPLEANDO UN LODO DESNITRIFICANTE: ESTUDIO CINÉTICO.	92
7.2.3	CONCURRENCIA DE LA OXIDACIÓN ANAEROBIA DEL AMONIO Y LA DESNITRIFICACIÓN ORGANOTRÓFICA EN PRESENCIA DE <i>P</i> -CRESOL.	98
8.	CONCLUSIONES GENERALES	107
9.	RECOMENDACIONES	110

1. Introducción

1. INTRODUCCIÓN

En los primeros años del siglo XX, el tratamiento biológico se concibió, y ahora es la base del tratamiento de aguas residuales en todo el mundo. Simplemente consiste en confinar microorganismos en concentraciones mucho más altas en tanques de reacción (reactores biológicos). Estos microorganismos, se denominan colectivamente como consorcios o lodos microbianos. El concepto de tratamiento es muy simple. Las bacterias eliminan moléculas de carbono orgánico, nitrógeno, azufre, fósforo, etc., y como resultado los microorganismos crecen y reducen u oxidan los contaminantes y las aguas residuales se “limpian”. Las aguas residuales o efluentes tratados a continuación pueden a continuación ser descargados a las aguas receptoras, normalmente ríos, lagos, lagunas, entre otros.

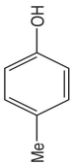
Mientras que el concepto es muy simple, el control del proceso de tratamiento es muy complejo, debido al gran número de factores que pueden afectarlo. Estos incluyen cambios en la composición de la flora microbiana, y los cambios en las aguas residuales que entran a los reactores biológicos. El influente también puede presentar variaciones en la composición química, pH, temperatura, concentración, presencia de compuestos recalcitrantes o tóxicos que podrían afectar el funcionamiento o actividad de los consorcios microbianos (Metcalf y Eddy., 2003). De ahí la necesidad de realizar estudios para evaluar y entender los efectos del metabolismo de los microorganismos y obtener un mejor funcionamiento de los sistemas biológicos en el tratamiento de las aguas residuales.

Las aguas residuales, son una mezcla compleja que contiene contaminantes orgánicos e inorgánicos, tanto en suspensión como disueltos. Se entienden como contaminantes aquellos compuestos en exceso y por un periodo de tiempo tal, que pueden afectar negativamente la salud o bienestar del hombre, a la flora y la fauna, o causar un deterioro en el ambiente. En los efluentes industriales, como los generados en refinerías del petróleo y de diferentes sectores productivos como fábricas de textiles, pieles curtidas, papel, plaguicidas, explosivos, plásticos, alimentos, entre otros, es común que la mayor cantidad de materia orgánica presente sean compuestos químicos aromáticos (fenólicos) y que la fracción de sustancias inorgánicas compuestos nitrogenados (sin que esto implique que no haya otros contaminantes, algunos de ellos altamente peligrosos como los azufrados o los fosfatos)

[Olmos *et al.*, 2004; Tallur *et al.*, 2009]. Tanto los compuestos aromáticos como los nitrogenados, por sí solos, tienen efectos negativos y podrían ser tóxicos para los humanos y para la flora y fauna de los ecosistemas. Por ejemplo, el monometilfenol o *p*-cresol es uno de los compuestos aromáticos que reporta la ATSDR (Agency for toxic substances and disease registry, por sus siglas en inglés) como de alta prioridad en su lista de sustancias peligrosas (ATSDR, 2005), debido a que es altamente tóxico (Tabla 1). De los compuestos nitrogenados, cobran relevancia el amonio (NH_4^+), nitrito (NO_2^-) y nitrato (NO_3^-), debido a que el aumento de estos compuestos en los cuerpos receptores de agua, pueden llegar a ser tóxicos para los organismos acuáticos, al afectar su capacidad de sobrevivir, crecer y reproducirse. Asimismo, la exposición directa de los seres humanos a estos compuestos por medio del agua o alimentos contaminados puede producir un deterioro de la salud e incluso la muerte. El impacto negativo que estas descargas incontroladas pueden causar sobre el ambiente, tiene implicaciones no sólo ecológicas, sino también económicas y sociales cada vez más graves (Tabla 1). Por lo que el tratamiento eficaz de los efluentes industriales, antes de ser vertidos a los cuerpos de agua, debe ser ineludible con el fin de revertir y evitar más daños al ambiente y salvaguardar la salud pública.

Si bien, estos compuestos conllevan un gran riesgo para la salud humana y el medio ambiente, en las plantas de tratamiento pueden ocasionar la pérdida de la actividad microbiana (ya sea por inhibición y/o toxicidad). La falta o baja la actividad microbiana, es la causante de muchos de los problemas de arranque y durante la operación de reactores - especialmente aquellos que tratan efluentes industriales y donde no se ha hecho un adecuado estudio a nivel de laboratorio o planta piloto - y el origen de un buen número de las fallas de los sistemas ya instalados. Es pues imperativo definir variables metabólicas, que puedan considerar los operadores de plantas de tratamiento de aguas para la puesta en marcha de sus sistemas.

Tabla 1 Efectos ecológicos y toxicológicos provocados por contaminantes nitrogenados y *p*-cresol

Compuesto	Fórmula química	Límites máximos permisibles*	Efectos adversos			Referencias
			Ambiente	Salud humana	Económicos	
Amonio	NH_4^+	0.5 mg N- NH_4^+ /L	-Acidificación de los cuerpos receptores - Eutrofización del agua dulce, estuarios y los ecosistemas marinos costeros	Su toxicidad en humanos es a partir su especie no ionizada (amoníaco) -Irritaciones de las membranas mucosas -Ulceración y problemas del tracto respiratorio.	-Disminución de la flora y fauna -Contaminación de peces y moluscos. -Quiebra o cierre de las pesquerías de importancia comercial.	Mateju <i>et al.</i> , 1992 Conrado <i>et al.</i> , 1999 Galoway <i>et al.</i> , 2004
Nitrito	NO_2^-	1 mg N- NO_2^- /L	-Disminución de la biodiversidad y el hábitat -Contaminación de las aguas subterráneas y superficiales	Puede reaccionar con aminas y amidas secundarias en el organismo y producir nitrosaminas, compuestos reportados como potencialmente cancerígenos	-Elevados costos de salud, debido a los salarios y jornadas de trabajo, y por el tratamiento médico	Camargo y Alonso 2006. Galoway <i>et al.</i> , 2008. Cervantes, 2009.
Nitrato	NO_3^-	1 mg N- NO_3^- /L	-Problemas de sabor y olor en el agua potable	Su ingesta puede inducir: -metahemoglobulemia en niños -cáncer gástrico, vejiga y de ovario Incrementa el riesgo de linfoma no- Hodgkin		
<i>p</i> -cresol		-Para compuestos fenólicos no más de 600µg/L -NOM-052, establece un límite de 200 mg <i>p</i> -Cr/L -NOM-010-5 mg LMPE-PPT	-Tóxico y/o letal en peces a concentraciones de 5 a 25 mg/L Estudios en animales han demostrado que los cresoles pueden aumentar la habilidad de otros productos químicos para producir tumores.	-Daño renal, hepático e incluso la muerte -la EPA ha determinado que los cresoles son posiblemente carcinogénicos en seres humanos.	Elevados costos en salud pública	Monma <i>et al.</i> , 2002; Schepers <i>et al.</i> , 2007. EPA 1993. NOM-052 semarnat, 2005. NOM-010 STPS, 1999.

*EPA, 1993, LMP límite máximo permisible, LMPE-PPT límite máximo permisible de exposición promedio ponderado en tiempo (concentración promedio ponderada en tiempo de un contaminante del medio ambiente laboral para una jornada de ocho horas diarias y una semana laboral de cuarenta horas, a la cual se pueden exponer la mayoría de los trabajadores sin sufrir daños a su salud. NOM-001-ECOL-1996 establece como límite máximo permisible un valor de 40 mg/L de nitrógeno total para descargas de aguas a cuerpos receptores (Diario Oficial de la Federación, 1997). Nitrógeno total (suma de las concentraciones de nitrógeno por método de Kjeldahl de nitritos y de nitratos, expresadas como mg N/L)

Actualmente para eliminar el amonio, nitrato, nitrito y compuestos fenólicos (*p*-cresol, fenol, *o*-cresol, etc.) de las aguas residuales se utilizan tanto métodos físico-químicos como biológicos, que se combinan o acoplan entre sí en trenes de tratamiento. Los métodos fisicoquímicos a pesar de tener altas eficiencias de eliminación, generalmente no resuelven el

problema, ya que en realidad trasladan la contaminación de un sitio a otro, además de tener altos costos de operación, que incluye el costo de disposición del residuo sólido generado, así como el mantenimiento del sistema. Van Dongen *et al.* (2001), estimaron un costo de 90 a 220 pesos por kg de N tratado por métodos fisicoquímicos y de 45-90 pesos por Kg de N tratado, utilizando procesos biológicos (nitrificación-desnitrificación). Los procesos biológicos como: la metanogénesis (producción de metano y CO_2), la nitrificación (la oxidación del amonio a nitrato vía nitrito), la desnitrificación (reducción biológica de nitrato a nitrógeno molecular), y más recientemente la oxidación anaerobia del amonio (anammox), se han combinado para llevar a cabo la eliminación eficiente de estos contaminantes. Sin embargo, el hecho de utilizar dos o más reactores biológicos, ha implicado altos costos de operación (principalmente energéticos) y un alta demanda de espacio para su construcción y operación (Paredes *et al.*, 2007). De tal forma que desde hace más de una década y con la finalidad de reducir costos, se han desarrollado biotecnologías que involucran el acoplamiento de una nitrificación parcial y una desnitrificación con nitrito (Figura 1) para tratar de eliminar el nitrógeno de las aguas residuales con bajo contenido de materia orgánica de forma más sostenible. Cabe señalar que, en realidad, no resuelven el problema debido principalmente a que su aplicación se limita a aguas residuales con baja carga orgánica y de fácil eliminación (acetato, metanol, etc.), de tal forma que se sigue requiriendo más de un reactor si se quiere llevar a cabo la eliminación de materia orgánica cuando ésta es de tipo fenólica.

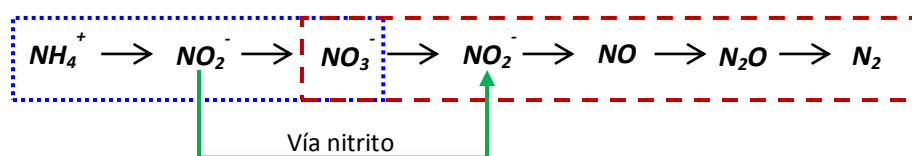


Figura 1 Nitrificación-Desnitrificación vía nitrito (Tomado de Peng y Zhu., 2007)

En la literatura, se encuentran reportes que indican que la desnitrificación presenta limitaciones técnicas para llevar a cabo el tratamiento de las aguas residuales debido a que generalmente presentan altas cargas de amonio (Paredes *et al.*, 2007). Sin embargo, en los últimos años se ha dado a conocer que la desnitrificación puede eliminar de manera simultánea compuestos nitrogenados (incluido el amonio), azufrados y carbonados y/o

fenólicos en un solo reactor (Cervantes *et al.*, 2000; Reyes-Ávila *et al.* 2005; Cardoso *et al.* 2006; Kalyuzhnyi *et al.* 2006; Beristain-Cardoso *et al.* 2006, 2008; Meza Escalante *et al.*, 2008; Cervantes *et al.*, 2009). La información sobre las rutas de eliminación por desnitrificación que acoplan la óxido-reducción de carbono-nitrógeno en presencia de nitrato es cuantiosa y se ha descrito con detalle en la literatura (Cervantes *et al.* 1999; Beristain-Cardoso *et al.* 2009; Breisha y Winter 2010). Sin embargo, sobre la interacción de carbono-nitrógeno considerando al nitrito como aceptor final de electrones, sólo existe información básica parcial que dificulta que se logre establecer el potencial del proceso desnitrificante. Por lo tanto, hace falta tener más información desde el punto de vista metabólico, cinético, bioquímico y microbiológico, con la finalidad de entender el potencial y las limitaciones del proceso desnitrificante en presencia de nitrito.

1.1 CICLO DEL NITRÓGENO

El nitrógeno es un elemento que requieren todos los organismos vivos para la síntesis de proteínas, ácidos nucleicos y otras moléculas fundamentales del metabolismo. Constituye, junto al fósforo, uno de los factores limitantes susceptibles de regular la producción primaria en los ecosistemas (Risser y Parton 1982; Vitousek y Howarth 1991; Martínez Bastida 2009). Sin embargo, a diferencia de otros constituyentes esenciales de los seres vivos, su biodisponibilidad es generalmente escasa, debido a que se encuentra disponible en la atmósfera principalmente en su forma molecular (N_2) y no puede ser utilizada directamente por la mayoría de los seres vivos (a excepción de algunas bacterias), debido al triple enlace de sus átomos (Madigan *et al.*, 2009).

El ciclo biogeoquímico del nitrógeno, incluye todos aquellos procesos naturales y antropogénicos implicados en el equilibrio dinámico de este elemento en la biósfera, propiciando su biodisponibilidad en formas químicas asimilables para los seres vivos. En la naturaleza los átomos de nitrógeno inorgánicos pueden existir en diferentes estados de oxidación de -3 (NH_4^+) a +5 (NO_3^-). La mayoría de los compuestos de nitrógeno que representan a estos estados de oxidación se pueden convertir de uno a otro a través de la actividad microbiana (Kartal *et al.*, 2008), siguiendo lo que se conoce como el ciclo biológico del nitrógeno (Figura 2). Los microorganismos, llevan a cabo reacciones anabólicas (reducción

asimilatoria del nitrato y la fijación de nitrógeno), catabólicas (nitrificación, desnitrificación, reducción desasimilativa de nitrato y la oxidación anaerobia del amonio), y la amonificación (Dapena Mora, 2007; Beristain *et al.*, 2009; Sánchez y Sanabria, 2009).

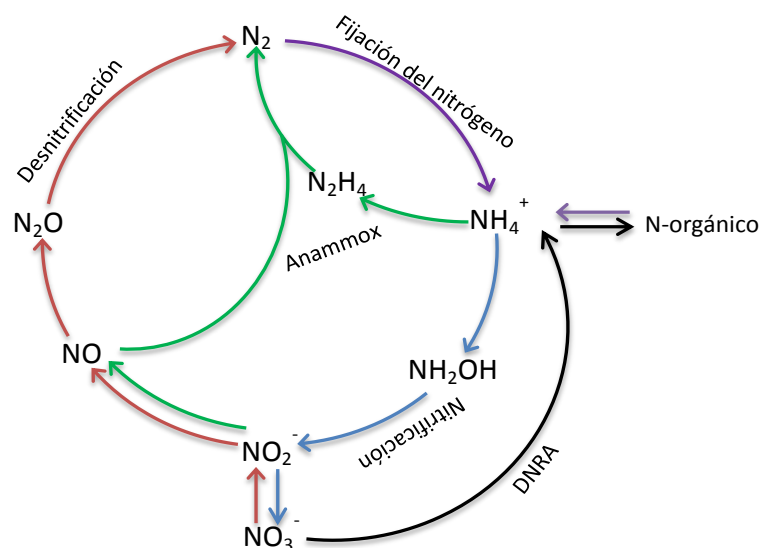


Figura 2 Ciclo del Nitrógeno (Modificado de http://en.wikipedia.org/wiki/File:The_nitrogen_cycle_Arrigo.png)

Los principales estados redox y compuestos de nitrógeno que participan son -3, -1, 0,+1, +2, +3, +5 para el amoníaco (NH_3), hidroxilamina (NH_2OH), nitrógeno molecular (N_2), óxido nitroso (N_2O), óxido nítrico (NO), nitrito (NO_2^-) y nitrato (NO_3^-), respectivamente.

La fijación de nitrógeno desde el estado gaseoso a la forma orgánica se lleva a cabo biológicamente por microorganismos especializados, a saber, cianobacterias (algas verdes-azules) y bacterias (*Rhizobium* y *Frankia*) que convierten el N_2 en formas químicas (amonio y nitratos) asimilables para otros organismos. En la amonificación, el nitrógeno orgánico es biológicamente liberado como NH_4^+ , durante la hidrolización de nucleótidos y proteínas, catabolizado por organismos heterótrofos (Canfield *et al.*, 2005). La reducción desasimilativa del nitrato a amonio (DNRA).

La nitrificación, desnitrificación y anammox, son procesos que intervienen directamente en las transformaciones del nitrógeno reactivo (Nr), regulando y dando equilibrio al ciclo biogeoquímico del nitrógeno (Galloway *et al.*, 2008). Son los principales procesos en el

tratamiento de aguas residuales que contienen nitrógeno por lo que a continuación se describen de forma más detallada, principalmente el proceso desnitrificante.

1.1.1 NITRIFICACIÓN

En el tratamiento de aguas residuales, la nitrificación es la primera etapa en varios sistemas biológicos de eliminación de nitrógeno, debido principalmente a que en las aguas residuales la mayor fracción de nitrógeno, se encuentra como N- amoniacal.

La nitrificación es un proceso redox estrictamente aerobio y es catalizado por un complejo ferro-enzimático denominado Nitrogenasa (Zehr *et al.*, 1998). Implica la oxidación quimiolitotrófica del amonio a nitrato, llevada a cabo en dos etapas como se muestra en la Figura 3 (Bernet y Spérandio, 2009). En la primera etapa, el amonio es oxidado a nitrito (amonio oxidación) por las bacterias amonio oxidantes. Posteriormente, el nitrito es oxidado a nitrato (nitrito oxidación) por las bacterias nitrito oxidantes (Prosser, 1989; Bock *et al.*, 1991). En ambas etapas, los microorganismos utilizan amonio o nitrito como fuente de energía, oxígeno molecular como aceptor final de electrones y CO₂ como fuente de carbono.

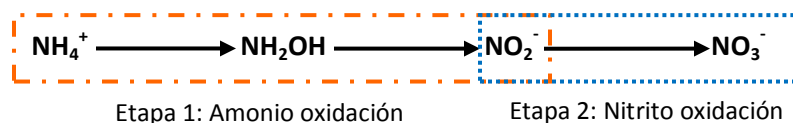
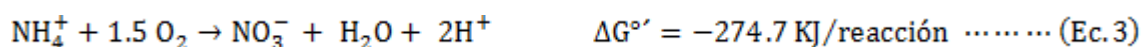
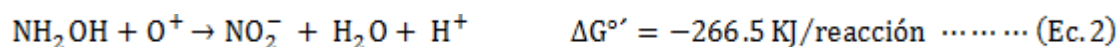


Figura 3 Ruta global del catabolismo nitrificante.

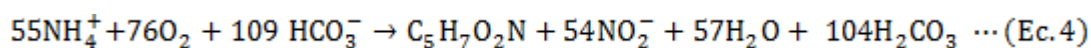
La amonio oxidación, es llevada a cabo por al menos sesenta especies conocidas de géneros pertenecientes a beta y gamma proteobacterias: *Nitrosomonas*, *Nitrospira*, *Nitrosovibrio*, *Nitrosolobus* y *Nitrosococcus* (Watson *et al.*, 1989; Madigan *et al.*, 2009), vía hidroxilamina de acuerdo con las siguientes ecuaciones:



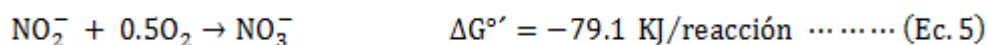
La enzima que cataliza la oxidación del amonio a hidroxilamina (Ec. 1), es la amonio monooxigenasa (AMO), mientras que la oxidación de hidroxilamina a nitrito es catalizada por

la hidroxilamina óxidoreductasa (HAO) (Ec. 2). Como se puede observar en las ecuaciones 1 y 2, en la oxidación de la NH_2OH a NO_2^- es donde las bacterias amonio oxidantes obtienen mayor energía. En la reacción global de oxidación del NH_4^+ a NO_3^- (Ec. 3), el cambio de energía libre de Gibbs (ΔG°) es bajo (-274.7 kJ/reacción), por lo que se puede pronosticar que la formación de nuevas células estará limitada por la disponibilidad energética, considerando que para fijar una mol de CO_2 se necesitan 3 moles de ATP (Gómez *et al.*, 2000). De acuerdo con Arp y Stein (2003), de la oxidación de la hidroxilamina se generan cuatro electrones, de los cuales dos regresan a la AMO para la oxidación de moléculas de amonio, mientras que los dos electrones restantes entran en la cadena respiratoria y son usados para la síntesis de ATP vía fosforilación oxidativa, así como en la fijación de CO_2 .

En esta etapa, el consumo de oxígeno, es alrededor de 3.16 mg O_2 por cada mg de N-NH_4^+ oxidado y tomando en cuenta la fórmula empírica de la célula ($\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{N}$) el rendimiento celular se puede estimar en 0.15 mg células por cada mg N-NH_4^+ oxidado (Ec. 4) [Bernet y Spérandio, 2009].

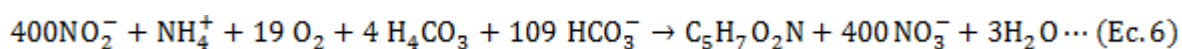


En la segunda etapa de la nitrificación, las bacterias nitrito oxidantes emplean la enzima nitrito oxidasa (NOR) como catalizador, para oxidar el nitrito a nitrato (Ec. 5). Los principales géneros microbianos que llevan a cabo esta oxidación son: *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospira* y *Nitrospina*. Los dos primeros son parte de la subclase alfa y gamma protobacteria respectivamente (Teske *et al.*, 1994), mientras que *Nitrospira* pertenece a una división llamada *Nitrospira-phylum* (Ehrich *et al.*, 1995) y del género *Nitrospina*, no se tiene clara aún su afiliación filogenética (Schramm, 2003).



Al comparar los valores de las energías libres Gibbs, de la amonio oxidación y la nitrito oxidación (Ec. 3 y Ec. 5), se puede observar que la nitrito oxidación es 3.5 veces menos exergónica que la amonio oxidación. Lo que indica que las bacterias nitrito oxidantes tienen un rendimiento de crecimiento menor que las bacterias amonio oxidantes, ya que en términos de energía el proceso de biosíntesis celular esta aún más limitado. De acuerdo con Bernet y

Spérandio (2009), el rendimiento celular de las nitrito oxidantes sería de 0.02 mg células por cada mg N-NO_2^- oxidado y el requerimiento de oxígeno estaría alrededor de 1.1 mg O_2 por cada mg de N-NO_2^- (Ec. 6). En términos del tiempo de duplicación, las bacterias amonio oxidantes presentan tiempos que oscilan entre 7 hasta 24 horas, mientras que las nitrito oxidantes los tiempos están entre 10 y 140 horas (Bock et al., 1991). Estos datos son muy relevantes principalmente cuando se quiere sólo la nitrificación (producción de nitrito).



En la Figura 4, se esquematiza la localización hipotética de las enzimas nitrificantes, así como el posible flujo de electrones (Madigan *et al.*, 2009). La AMO y la NOR estarían localizadas en la membrana citoplasmática (Bock *et al.*, 1991; McCarty, 1999) y la HAO en el espacio periplásmico (Hooper y Dispirito, 1985), entre la capa externa de la membrana citoplasmática y la superficie interna de la capa de liposacáridos en las bacterias Gram.

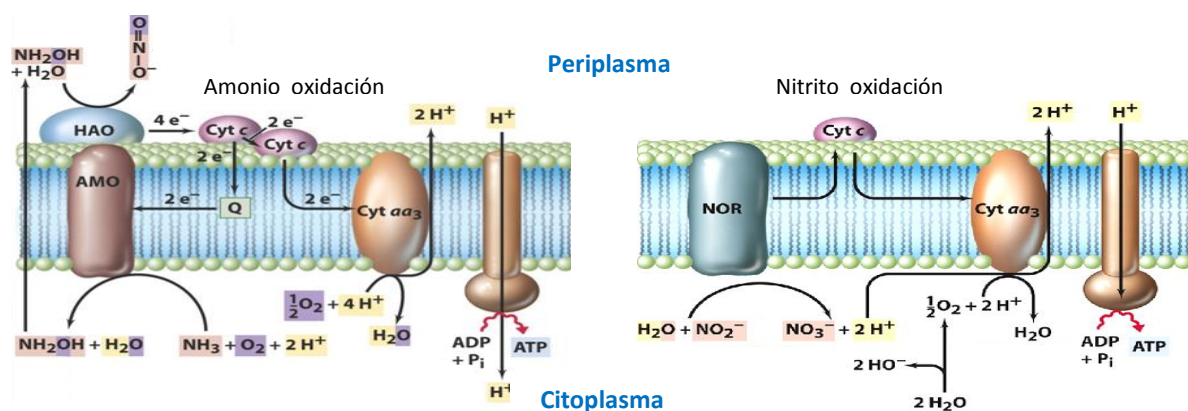


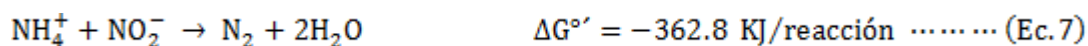
Figura 4 Modelo hipotético de la localización de las enzimas nitrificantes. Amonio monooxigenasa (AMO), Hidroxilamina óxidorreductasa (HAO) y la Nitrito óxidorreductasa (NOR). Citocromos (Cyt) (Esquema modificado de Madigan et al., 2009).

De acuerdo con Suzuki *et al.*, (1974), el efecto del pH en los valores de la constante de Michaelis-Menten (K_m) del amonio para *Nitrosomonas*, el amoniaco podría ser el verdadero sustrato de las bacterias amonio oxidantes y no el amonio. Lo anterior concuerda con el hecho de que la enzima AMO, se encuentra localizada en la membrana citoplasmática, la cual es altamente permeable al amoniaco pero no al amonio (Kleiner, 1985). Un átomo de O_2 es utilizado para formar NH_2OH mientras que el átomo restante se utiliza para producir agua. La

hidroxilamina, es posteriormente oxidada a nitrito por la enzima HAO. Cabe señalar que algunos autores (Remde y Conrad, 1990; Arp y Stein, 2003) han propuesto que algunas bacterias amonio oxidantes (*Nitrosomonas sp*, *N. europaea*, *N. eutropha* y *Nitrosovibrio*) pueden producir NO y N₂O. La producción de estos gases se ha relacionado a la oxidación de la hidroxilamina así como en la reducción del nitrito a NO y N₂O.

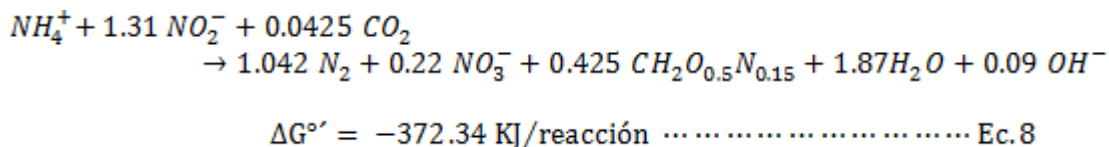
1.1.2 OXIDACIÓN ANAEROBIA DEL AMONIO

Desde la década de 1940 hasta la década de 1970, se supuso la existencia de microorganismos capaces de oxidar anaeróbicamente el amonio, con nitrato o nitrito, a nitrógeno molecular con base en observaciones de campo y cálculos termodinámicos propuestos por Broda en 1977 (van Niftrik y Jetten, 2012). En la década de 1990, se obtuvieron los primeros indicios experimentales de este proceso cuando se encontró que el amonio era convertido a N₂ en presencia de nitrato bajo condiciones anóxicas, en un biorreactor de lecho fluidizado, alimentado con agua residual proveniente de un planta productora de levadura (Fábrica de levadura Gist –Brocades, Países Bajos). En 1992, Mulder A., patentó este sistema como un nuevo proceso desnitrificante litotrófico (European patent applications EP0327184A1) y lo denominaron anammox. Tres años después dieron a conocer a la comunidad científica que habían comprobado la teoría desarrollada por Broda (1977) sobre la eliminación simultánea de amonio y nitrato, con la producción de nitrógeno molecular bajo condiciones anaerobias (Mulder *et al.*, 1995). En ese mismo año, van de Graaf *et al.* (1995) a partir de ensayos con trazadores desmostaron que el aceptor de electrones era el nitrito (Ec. 7) y no el nitrato, como inicialmente fue propuesto por Mulder (1992) y que los microorganismos responsables de llevar a cabo el proceso anammox, eran bacterias anaerobias obligadas quimioautotróficas pertenecientes al Filo Planctomycete (van de Graaf *et al.*, 1995; Strous *et al.*, 1999).



Strous *et al.* (1998), propusieron a partir de trabajos experimentales, la estequiometría del metabolismo del proceso anammox (Ec. 8), donde se puede observar que el proceso no elimina completamente el nitrógeno hasta N₂, ya que los productos de la oxidación del amonio y reducción del nitrito son: el N₂ en mayor proporción y una pequeña fracción a NO₃⁻.

Esta producción de nitrato se cree que es por la oxidación de una parte del nitrito en condiciones anaerobias (Strous *et al.*, 1998). La energía obtenida en esta reacción, en caso de que hubiera crecimiento, se utiliza para la fijación del CO₂.



La energía libre calculada para el proceso anammox (-358 KJ/reacción), indica que el proceso es exergónico, no obstante este valor ha sido relacionado con el bajo crecimiento de las bacterias anammox (Strous *et al.*, 1998). Ya que desde el punto de vista termodinámico la generación de nuevas células estaría limitada. El rendimiento de biomasa sería de 0,066 moles de C fijado por mol de NH₄⁺ oxidado. En términos de los tiempo de duplicación, se han reportado a partir de estudios experimentales tiempos que van desde 1.8 días (Isaka *et al.*, 2006) hasta 20 días (Oshiki *et al.*, 2011) y se maneja un tiempo promedio de 11 días, que se asocia con una velocidad de conversión de sustrato de baja (Strous *et al.*, 1998). La diferencia en los tiempos de duplicación está fuertemente relacionada con las condiciones de cultivo y del género bacteriano. Estas cepas se caracterizan por tener una alta afinidad por sus sustratos (K_s NH₄⁺=5 mM y K_s NO₂⁻ < 5mM). Sin embargo, la actividad metabólica es relativamente baja (15-80 μmol de N₂ formado por g peso seco de células por min), lo que también podría explicar las bajas tasas de crecimiento (Dapena-Mora *et al.*, 2007; Jetten *et al.*, 2009).

Las bacterias oxidantes de amonio anaerobias han sido clasificadas dentro del Dominio Bacteria, pertenecientes al Filo Planctomycetes y en el orden de los Planctomycetales, a partir de estudios de amplificación del ADN con PCR y posterior secuenciación (Strous *et al.*, 1999; Fuerst, 2005). Estas cepas presentan aparentemente una estructura celular dividida en tres compartimentos separados por membranas de bicapa. Del exterior al interior, la célula presenta: una pared celular proteica, un *paraphloasma*, un riboplasma (compartimento citoplásmico semejante a otras bacterias, que contiene ribosomas y nucleoide) y el anammoxosoma (que ocupa la mayor parte del volumen celular y es llamado también “organelo procariota” por su analogía con las mitocondrias de los organismos eucariotas). Diversos estudios bioquímicos sugieren que es en el anammoxosoma donde se lleva a cabo la

oxidación del amonio, y se genera la fuerza motriz de protones para la posterior síntesis de ATP (Jetten *et al.*, 2009; Fuerst y Sagulenko, 2011; van Niftrik y Jetten, 2012).

Otra característica de estas cepas es que se dividen por gemación, en contraste con la división por fisión binaria de la mayoría de bacterias (van Niftrik *et al.*, 2004; Fuerst, 2005). Hasta el momento, sólo nueve especies anammox diferentes divididas en cinco géneros se han enriquecido, pero ninguna de ellas se encuentran en cultivo puro. Los cinco géneros son: *Candidatus Brocadia*, *Candidatus Kuenenia*, *Candidatus Anammoxoglobus*, *Candidatus Jettenia* y *Candidatus Scalindua*. Los tres primeros géneros fueron aislados de plantas de tratamiento de aguas residuales (Strous *et al.*, 1999; Schmidt *et al.*, 2003; Kartal *et al.*, 2004; Kartal *et al.*, 2007), el género *Jettenia*, fue aislado de un reactor operado bajo condiciones anammox alrededor de un año (Quan *et al.*, 2008), mientras que el género *Scalindua*, fue localizado en ambientes marinos (Kuypers *et al.*, 2003).

Sobre la ruta bioquímica del proceso anammox, en los últimos años se han logrado muchos avances (Jetten *et al.*, 2005, 2009; van Niftrik y Jetten, 2012; Kartal *et al.*, 2013), ya que se han identificado tanto enzimas como productos intermedios del proceso. El avance más trascendental según la literatura, ha sido el hallazgo de van de Graaf *et al.* (1997) quienes al evaluar el efecto de hidroxilamina en células anammox observaron la acumulación transitoria de hidracina (N_2H_4) y propusieron un modelo de tres pasos (Figura 5), que considera a la hidroxilamina e hidracina como productos intermedios: En el primer paso se lleva a cabo la reducción de nitrito a hidroxilamina, en el segundo el amonio y la hidroxilamina “reaccionan” para formar hidracina y por último la hidracina es oxidada para producir N_2 como producto final. Esta oxidación genera 4 electrones que son utilizados para reducir el nitrito a hidroxilamina, cabe señalar que en este trabajo la hidroxilamina es adicionada al cultivo y con base en su consumo fue que se consideró un posible intermediario.

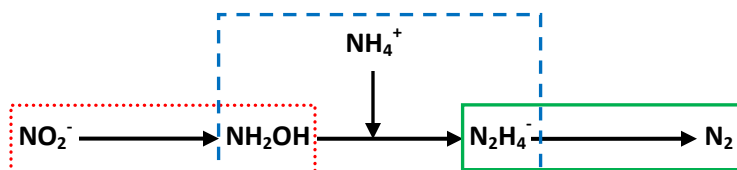


Figura 5 Primer modelo hipotético del catabolismo anammox: paso 1 (---), 2 (---) y 3 (—).

Casi una década después Strous et al. (2006), con base en experimentos fisiológicos y un análisis genómico de *K. stuttgartiensis*, propusieron un modelo hipotético que incorporó la formación de óxido nítrico (NO) y a las enzimas nitrito reductasa (Nir), hidracina hidrolasa (Hh) e hidracina deshidrogenasa (Hd) en la ruta establecida por van de Graaf *et al.* (1997). Este modelo cobró mayor fuerza cuando Kartal *et al.* (2011), presentaron resultados que incluían estudios de proteómica, purificación de enzimas y experimentos fisiológicos y bioquímicos, utilizando una cepa enriquecida de *K. stuttgartiensis*. Mediante el suministro de isótopos de N (^{14}N y ^{15}N), demostraron que la hidracina era producida durante la conversión del amonio y nitrito. Donde el NO_2^- es convertido a NO y NO_3^- por las enzimas nitrito y nitrato reductasa, respectivamente, y el NH_4^+ y el NO sirven como sustratos para la síntesis directa de hidracina por acción de las enzimas Hh y Hd. De acuerdo con los autores, las bacterias anammox aprovechan el poder oxidante del NO para activar el amonio relativamente inerte. Esta investigación es la que mayor relevancia ha cobrado ya que corrobora, amplía y proporciona evidencia experimental de la posible ruta bioquímica del proceso anammox (Figura 6).

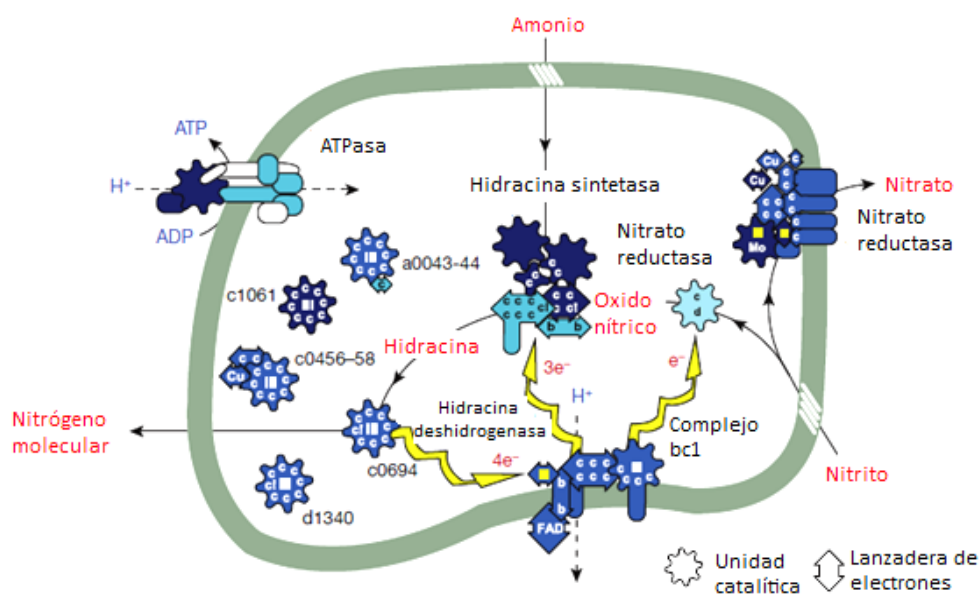


Figura 6 Modelo hipotético de la ruta bioquímica y maquinaria enzimática del proceso anammox en *K. stuttgartiensis*. El anammoxosoma (línea verde), limita el compartimento intracitoplasmático. La enzima hidracina sintetasa está representada en el centro de la figura y asociada de forma estrecha a la membrana. Las flechas amarillas, indican el flujo de electrones; los cuadrados amarillos, indican agrupaciones de hierro y azufre; b, hemo b; c, hemo C; c, atípica hemo c!; d, hemo d; Mo, molibdopterina. (Modificada de Kartal *et al.*, 2011)

En general, las investigaciones alrededor del proceso anammox, se han centrado en elucidar las propiedades básicas del proceso y en proporcionar evidencia de su naturaleza microbiana y los principios de su metabolismo.

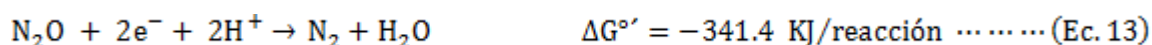
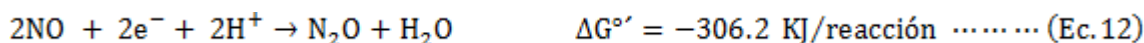
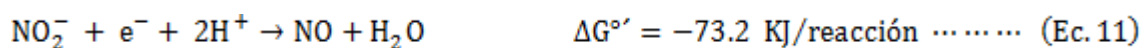
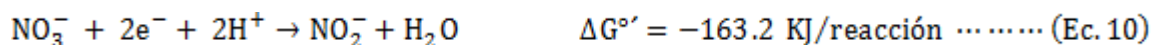
En este sentido algunos estudios demuestran de forma experimental que el proceso anammox puede ser inhibido por sus sustratos (nitrito y amonio) y por el nitrato producido. Siendo el nitrito el inhibidor más importante, debido a que se ha reportado una pérdida del 50% de la actividad específica (IC_{50}) de los cultivos a concentraciones que van desde 98 a 350 mg N- NO_2^- /L. Para el caso del amonio, el IC_{50} reportado va desde 770 hasta 980 mg N- NH_4^+ /L y para el nitrato de 630 - 980 mg N- NO_3^- /L (Strous *et al.*, 1999; Dapena-Mora *et al.*, 2007). Estas diferencias en la concentración de inhibición están fuertemente relacionadas con la concentración celular en los cultivos y a la historia del inóculo. Por otro lado, como se ha mencionado anteriormente, los microorganismos anammox fueron clasificados como anaerobios estrictos y litoautotróficos. Por lo que la presencia del oxígeno inhibe totalmente el proceso anammox (van de Graaf *et al.*, 1996), aunque la inhibición puede ser reversible cuando las concentraciones son microaerobias (0.5-2% de saturación de aire) (Strous *et al.*, 1999). Por otra parte, al ser microorganismos litoautotróficos, la presencia de materia orgánica tal como metanol y tolueno puede también causar diferentes niveles de inhibición de la actividad anammox (Güven *et al.*, 2005; Martínez *et al.*, 2013). No obstante algunos estudios muestran que algunos microorganismos anammox tienen la capacidad de degradar los compuestos orgánicos simples como acetato, propionato y formiato (Schmidt *et al.*, 2003; Guven *et al.*, 2005; Kartal *et al.*, 2007, 2008). Sin embargo, la presencia de materia orgánica en los cultivos anammox puede promover otros procesos biológicos competitivos, tales como la desnitrificación (Martínez *et al.*, 2013).

1.1.3 DESNITRIFICACIÓN

La desnitrificación es un proceso anóxico, en el que el nitrato o el nitrito se reducen a compuestos nitrogenados gaseosos, principalmente a nitrógeno molecular (N_2) (Madigan *et al.*, 2009). De acuerdo con Tandukar *et al.* (2009), la desnitrificación con nitrato puede expresarse en términos generales por la siguiente reacción redox (Ecuación 9).



No obstante, el proceso de reducción de nitrato hasta nitrógeno molecular ocurre en etapas sucesivas, catalizadas por sistemas enzimáticos diferentes, formando transitoriamente intermediarios como nitrito, óxido nítrico y óxido nitroso, de acuerdo con las siguientes ecuaciones.



La energía libre de Gibbs a partir de la reacción global de reducción del NO_3^- a N_2 (Ec. 9), habla de un proceso exergónico y con alta disponibilidad de energía. Si comparamos la energía libre del proceso desnitrificante (-1120.5 KJ/reacción) con la energía libre del proceso anammox (-362.8 kJ/reacción, Ec. 7), podemos ver que termodinámicamente es más favorable la desnitrificación que la oxidación anaerobia del amonio. Por tanto, es posible predecir que los microorganismos desnitrificantes crecerían más rápidamente que los microorganismos anammox. Ahora bien el paso limitante del proceso desnitrificante desde el punto de vista termodinámico sería la reducción del nitrito a óxido nítrico (Ec. 11) y el paso donde se obtiene mayor energía es en la reducción del óxido nitroso a nitrógeno molecular (Ec. 13). Por otra lado, las enzimas que catalizan cada paso del proceso son: la enzima nitrato reductasa (Nar), la cual cataliza la reducción del nitrato a nitrito; la nitrito reductasa (Nir) que reduce el nitrito a óxido nítrico; la óxido nítrico reductasa (Nor) que cataliza la reducción del óxido nítrico a óxido nitroso y finalmente la óxido nitroso reductasa (Nos), que reduce al óxido nitroso a nitrógeno molecular. En cada uno de estos pasos enzimáticos se da la transferencia de electrones (Figura 7).

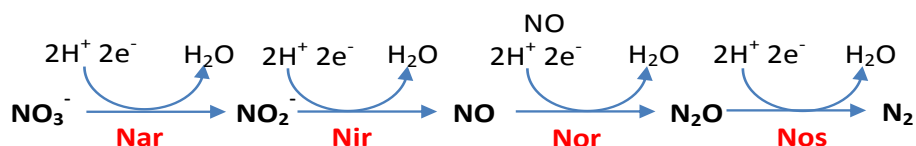


Figura 7 Ruta global del catabolismo desnitrificante

1.1.3.1 Bioquímica de la desnitrificación

La organización de las enzimas en los microorganismos desnitrificantes podría describirse como secuencial (Zumft, 1997; Cuervo-López *et al.*, 2009), aún y cuando algunos microorganismos desnitrificantes pueden carecer de algunas enzimas (Nir o Nos) [Knowles, 1982]. Su síntesis requiere de una regulación a nivel genético muy compleja. Por ejemplo, algunas de las subunidades catalíticas de estas enzimas son codificadas por distintos genes cromosómicos o bien plásmidos (narG, Napa, NIRS, nirK, PNOP, y nosZ) dependiendo del tipo de microorganismo (Braker *et al.*, 1998; Tavares *et al.*, 2006). Lalucat *et al.*, (2006), realizaron una descripción detallada de la bioquímica de *Pseudomonas stutzeri* y proponen un modelo hipotético de la vía desnitrificante, donde se muestra el arreglo de las enzimas desnitrificantes en la célula bacteriana (Figura 8).

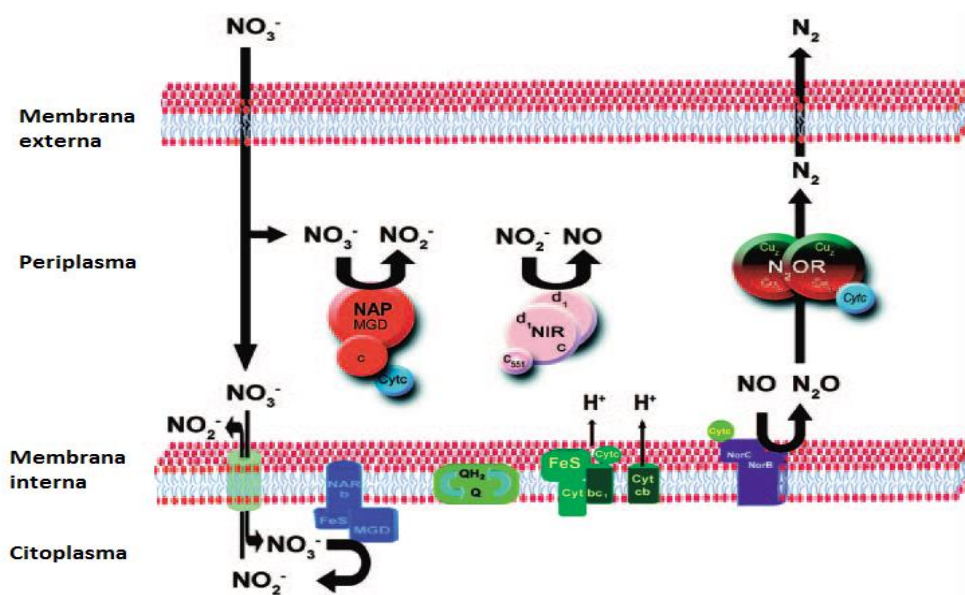


Figura 8 Modelo hipotético de la vía del arreglo de las enzimas desnitrificantes en *P. stutzeri*. Nitrato reductasa (NAR), nitrito reductasa (NIR), Óxido nítrico reductasa (NOR) y Óxido nitroso reductasa (N₂OR). Además muestra, evidencia de la presencia de un nitrato reductasa periplásmica (NAP) (Lalucat *et al.*, 2006).

De acuerdo con la literatura, algunas de las enzimas desnitrificantes pueden tener función desasimilativa -que está ligada a los sistemas respiratorios de transporte de electrones- o bien asimilativa (biosíntesis) (Knowles 1982; Rustrian *et al.*, 1997; Conrado *et al.*, 1999; Lalucat *et al.*, 2006). Algunas de las características y aspectos más relevantes de cada una de las enzimas desnitrificantes son descritas a continuación.

- I. **Nitrato reductasa (Nar)**, hasta ahora se han identificado dos tipos de Nar en bacterias capaces de desnitrificar, una localizada en el espacio membranal que se expresa sólo en condiciones anóxicas y otra en el periplasma que se ha observado tanto en condiciones aerobias como en anaerobias (Bedzyk *et al.*, 1999). La Nar membranal, utiliza al NADH como donador de electrones y se compone de tres subunidades diferentes: La subunidad NarG y NarH, que están situadas en el citoplasma ancladas a la membrana por la subunidad NarI. La subunidad codificada NarG, tiene un tamaño aproximado de entre 112-140 kDa, con un su sitio activo que incluye, un cofactor de guanilil molibdeno y otro cofactor que contiene un grupo hierro-azufre [4Fe-4S]. La subunidad codificada NarH puede tener un peso entre 52-64 kDa y contiene también grupos hierro-azufre como cofactores (uno 3Fe-4S y tres grupos 4Fe-4S) que aparentemente interviene en la transferencia de electrones entre las otras dos subunidades a través de una ubihidroquinona. De la NarI, se sabe que es una proteína integral de la membrana que se encuentran unida a la cara citosólica de las subunidades NirG y NirH conformada por una agrupación bihemo *b* (Craske y Ferguson, 1986; Ketchum *et al.*, 1991; González *et al.*, 2006). La Nar que se localiza en el periplasma, no usa el NADH como donador de electrones y está formada por dos subunidades: una de 94 KDa que contiene un cofactor de molibdeno y un grupo hierro-azufre y una subunidad de 19 KDa (Bell *et al.*, 1990; Berks, 1994). Jetten *et al.* (1997) propusieron que el mecanismo de reducción de nitrato a nitrito tiene lugar en el núcleo de molibdeno en el que cambia el estado redox de Mo (IV) a Mo (VI). Donde la enzima en su etapa reducida (Mo (IV)) podría coordinar la interacción entre el nitrato y el molibdeno (Mora y Mora, 2001). Para pasar de nitrato a nitrito se requieren dos electrones de un grupo quinona o citocromo tipo-b, más una mol de agua (Moura y Moura, 2001; Tandukar *et al.*, 2009). La constante de afinidad aparente (Km) estimada para esta enzima van desde 0.02 hasta 3.8 mM (Zumft, 1997; Yoshimatsu *et al.*, 2002), estos valores fueron obtenidos en cultivos puros y las diferencias están en función del tipo de microorganismo y de las condiciones de cultivo. La actividad de Nar puede ser inhibida por azida, tiocianato, dinitrofenol, cianuro, cloranfenicol (Wu y Knowles, 1995) y otros agentes, tales como el tungsteno,

que provoca una quelación o la competencia con molibdeno (Stewart 1988; Conrado *et al.*, 1999). El nitrito se produce en el citoplasma, ya que el sitio catalítico de Nar está ligado a la membrana (Alefounder y Ferguson, 1980).

- II. **Nitrito reductasa (Nir)**, hay dos tipos diferentes de nitrito reductasa, con base en sus grupos prostéticos: una que contiene un citocromo *cd1* (Nir-*cd1*) y una que contiene cobre (NirCu). Ambas parecen llevar a cabo la misma reacción fisiológica, pero se han considerado mutuamente excluyentes (Coyne *et al.*, 1989). Estas enzimas pueden encontrarse en la parte interna de la membrana en condiciones anaerobias y en el periplasma en presencia de oxígeno (Knowles, 1982; Mateju *et al.*, 1992., 1992 Cutruzzola *et al.*, 2001) y de acuerdo con Ye *et al.* (1993), la enzima Nir-*cd1* es más abundante que NirCu (alrededor de las tres cuartas partes de todas las Nir son: Nir-*cd1*); sin embargo, la NirCu se encuentra en una gama más amplia de nichos ecológicos. La Nir-*cd1* es un homodímero de 120 kDa, contiene una subunidad grupo hemo C y una hemo d1. La NirCu también es considerada una la proteína dimérica nativa que contiene cuatro centros metálicos. Es capaz de lograr la reducción monoelectrónica de nitrito a NO, así como la reducción electrónica del oxígeno a agua (Sivestrini *et al.*, 1990). Las constantes de afinidad aparente estimadas para la Nir-*cd1* se encuentran en un intervalo de 6-46 μM , estos valores fueron obtenidos en cultivos puros y las diferencias están en función del tipo de microorganismo, de las condiciones de cultivo, entre otros factores (Betlach y Tiedje, 1981). Las enzimas NirCu, son triméricas con dos átomos de cobre por monómero (Godden *et al.*, 1991; Pratscher *et al.*, 2009). Cada subunidad tiene un átomo de cobre tipo 1 (cobre azul) y un átomo de cobre tipo 2 (cobre no azul). El átomo de cobre tipo 1 está ligado a tres aminoácidos (Histidina, cisteína y metionina) y el cobre tipo 2 está ligado a la histidina y un solvente (H_2O , OH^-) [Suzuki *et al.*, 1999]. Los valores de K_m de NirCu, se reportan en un intervalo de 3.13-750 μM (Kakutani *et al.*, 1981; Michalski y Nicholas, 1985), al igual que para la Nir-*cd1*, las diferencias en los valores de K_m reportados pueden deber a las condiciones ambientales empleadas, así como al tipo de microorganismo. Como se ha venido describiendo ambas enzimas presenta diferencias estructurales; sin embargo, ambas pueden ser inhibidas por cianuro así como por su producto (NO) (Silvestreni *et*

al., 1994). Cabe señalar que la inhibición por NO difiere según la especie desnitrificante (Frunzke y Zumft, 1986; Carr y Ferguson, 1990). No obstante, el efecto inhibitorio del NO parece ser atribuible a los cambios de pH del medio de cultivo, la concentración de nitrito, la presencia de nitrato, las características cinéticas de las reductasas y los intermediarios de las fuentes orgánicas reductoras (Glass *et al.*, 1997). Un inhibidor diferencial de ambas enzimas es el dietilditiocarbomato que sólo inhibe a la NirCu (Sphapleigh y Payne, 1985).

- III. Las enzimas **óxido nítrico reductasa (Nor)** se localizan en la membrana citoplasmática y aparentemente presenta dos centros de transferencia de electrones. Son miembros de la familia hemo-cobre oxidasa, se reportan como hemoproteínas constituidas por dos subunidades, una de 15-17 kDa (grupo hemo c) y otra de 34-53 kDa (hemo b) (Fujiwara y Fukumori, 1996; Jetten *et al.*, 1997; Richardson y Watmough, 1999; Zumft 2005). Se considera que la subunidad catalítica de la Nor es un centro binuclear de alto y bajo espín. El centro de alto-espín contiene un grupo hemo-Fe y un segundo grupo un metal nohemo. El centro de bajo espín se conforma por un grupo hemo metal y se sugiere que actúa como un centro de transferencias de electrones entre el donador y el centro binuclear (Lulucat *et al.*, 2006). Lulucat *et al.* (2006), reportaron dos tipos de Nor con base en el electrón donador; una de cadena corta (450 aminoácidos), denominada cNor dependiente de un citocromo bc1 y otro de cadena larga (cerca de 760 aminoácidos) llamada qNOR que obtienen sus electrones de hidroquinonas o menahidroquinonas. Algunos valores de Km para esta enzima van desde 0.25 a 60 μM (Carr y Ferguson, 1990; Fujiwara y Fukumori, 1996) y su actividad puede ser inhibida por Tritón X-100, ácidos grasos volátiles, ionóferos, azida y otros (Wu y Knowles, 1995; Zumft, 1997).
- IV. La enzima **óxido nitroso reductasa (Nos)** es una enzima periplásmica, su estructura consta de un dímero funcional, que contiene dos centros de cobre por monómero (CuA y CuZ). Cada monómero tiene un peso de 65 kDa y se cree que la unidad CuA es un sitio de entrada de electrones, similar a la de la citocromo c oxidasa y que la CuZ es un centro catalítico. Un análisis estructural reveló que el centro CuZ pertenece a un nuevo tipo de “clúster” de metal, en el que cuatro iones de cobre se ligan por siete

residuos de histidina. El N_2O se une a este centro a través de un único ion de cobre. Los iones de cobre restantes podrían actuar como un reservorio de electrones, asegurando una transferencia de electrones rápida (Brown *et al.*, 2000). Evidencias experimentales han demostrado que esta enzima tiene una K_m para el N_2O de entre en el 2-6 μM (SooHoo y Hollocher, 1991; Berks *et al.*, 1993) y que su actividad específica puede ser inhibida por el NO_2^- y el NO (Zumft 1986; Wu *et al.*, 1995), así como por azida, tiocianato, y cianuro, ya que posiblemente forman un ligando con el cobre (Frunzke y Zumft, 1986). También se ha descrito una inhibición reversible con acetileno (Kristjansson y Hollocher 1980). Esta enzima tiene una mayor relevancia ambiental, ya que es muy sensible al oxígeno y puede bloquear la vía desnitrificante, lo que implica la generación y una posible liberación de óxido nitroso (gas de fuerte efecto invernadero) (Tandukar *et al.*, 2009).

1.1.3.2 Fisiología de la desnitrificación

Para que se lleve a cabo la reducción de NO_3^- o NO_2^- a N_2 es necesaria la concomitante oxidación de un donador de electrones –el cual puede ser un sustrato orgánico (desnitrificación organotrófica, DO) e inorgánico (desnitrificación litotrófica, DL)– que suministre el poder reductor. También se sabe que el proceso desnitrificante puede utilizar de forma simultánea tanto sustratos orgánicos como inorgánicos como fuente de electrones y ha sido denominada como desnitrificación órgano-litotrófica (DOL).

En la DO, los microorganismos desnitrificantes utilizan como fuente de carbono y energía un sustrato orgánico (también suele ser llamada desnitrificación organoheterótrofa, cuando la materia orgánica se utiliza, tanto para el anabolismo como para el catabolismo) (Mateju *et al.*, 1992; Zumft, 1997; Cervantes-Carrillo *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2002; Beristain *et al.*, 2009). Dentro de los sustratos orgánicos más utilizados para evaluar el proceso desnitrificante se encuentran el metanol, acetato, etanol, lactato, glucosa, glicerol, ácido succínico, ácido fórmico, por mencionar algunos (Akunna *et al.*, 1993; Cuervo-López *et al.*, 1999; Cervantes *et al.*, 2001; Peng *et al.* 2007). También se han empleado compuestos aromáticos como el *m*-xileno (Evans *et al.*, 1991), *p*-xileno (Häner *et al.*, 1995), benceno (Burland y Edwards, 1999; Peña-Calva *et al.*, 2004), fenol (Heesche *et al.*, 1999; Fang y Zhou, 1999; Beristain-Cardoso *et*

al., 2009), tolueno (Evans *et al.*, 1991; Martínez *et al.*, 2007), 2-clorofenol (Martínez *et al.*, 2012) y *p*-cresol (Meza-Escalante *et al.*, 2008; Cervantes *et al.*, 2009) entre otros. El tipo de sustrato influye en la capacidad para realizar trabajo termodinámico y se refleja en los cambios en la energía libre de la reacción (ΔG°). En la Tabla 2, se presentan las reacciones globales de algunos donadores de electrones, así como su valor de ΔG° calculado. En esta Tabla se puede observar, de forma general, que independientemente del tipo de sustrato, que las reacciones son favorables desde el punto de vista termodinámico.

Tabla 2 Estequiometría y cambios en la energía libre de Gibbs en el proceso desnitrificante en presencia de diferentes donadores de electrones orgánicos e inorgánicos. (Tabla modificada de González-Blanco *et al.*, 2011)

Donador	Reacción	ΔG° (kJ/reacción)
Sustratos Orgánicos		
Metanol	$\text{CH}_4\text{O} + 1.2 \text{NO}_3^- + 0.2\text{H}^+ \rightarrow 0.6\text{N}_2 + \text{HCO}_3^- + 1.6\text{H}_2\text{O}$	-649
Ácido acético	$\text{CH}_3\text{COOH} + 1.6 \text{NO}_3^- \rightarrow 2\text{CO}_2 + 0.8\text{N}_2 + 1.6\text{OH}^- + 1.2\text{H}_2\text{O}$	-843
Metano	$\text{CH}_4 + \text{NO}_3^- \rightarrow 0.5\text{N}_2 + 2\text{HCO}_3^- + \text{H}_2$	-849.3
Etanol	$\text{C}_2\text{H}_6\text{O} + 2.4\text{NO}_3^- + 0.4\text{H}^+ \rightarrow 1.2\text{N}_2 + 2\text{HCO}_3^- + 2.2\text{H}_2\text{O}$	-1230
Glucosa	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 4.8\text{NO}_3^- \rightarrow 2.4\text{N}_2 + 6\text{HCO}_3^- + 1.2\text{H}^+ + 2.4\text{H}_2\text{O}$	-2686
2-clorofenol	$\text{C}_6\text{H}_5\text{ClO} + 5.2\text{NO}_3^- + 1.4\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2.6\text{N}_2 + 6\text{HCO}_3^- + 1.8\text{H}^+ + \text{Cl}^-$	-2742
Benceno	$\text{C}_6\text{H}_6 + 6\text{NO}_3^- \rightarrow 3\text{N}_2 + 6\text{HCO}_3^-$	-2977
Fenol	$\text{C}_6\text{H}_6\text{O} + 5.6\text{NO}_3^- + 0.2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2.8\text{N}_2 + 6\text{HCO}_3^- + 0.4\text{H}^+$	-2818
<i>p</i> -cresol	$\text{C}_7\text{H}_8\text{O} + 6.8\text{NO}_3^- \rightarrow 3.4\text{N}_2 + 7\text{HCO}_3^- + 0.2\text{H}^+ + 0.4\text{H}_2\text{O}$	-3422
Tolueno	$\text{C}_7\text{H}_8 + 7.2\text{NO}_3^- + 0.2\text{H}^+ \rightarrow 3.6\text{N}_2 + 7\text{HCO}_3^- + 0.6\text{H}_2\text{O}$	-3524
Xileno	$\text{C}_8\text{H}_{10} + 8.4\text{NO}_3^- + 0.4\text{H}^+ \rightarrow 4.2\text{N}_2 + 8\text{HCO}_3^- + 1.2\text{H}_2\text{O}$	-4136
Sustratos Inorgánicos		
Hidrógeno	$\text{H}_2 + 0.4 \text{NO}_3^- + \text{OH}^- + 1.4\text{H}^+ \rightarrow 0.2\text{N}_2 + 2.2\text{H}_2\text{O}$	-222
Sulfuro	$\text{S}^{2-} + 1.6\text{NO}_3^- + 1.6\text{H}^+ \rightarrow \text{SO}_4^{2-} + 0.8\text{N}_2 + 0.8\text{H}_2\text{O}$	-743
Tiosulfato	$\text{S}_2\text{O}_3^{2-} + 1.6\text{NO}_3^- + 0.26\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{SO}_4^{2-} + 0.8\text{N}_2 + \text{H}^+$	-765
Azufre elemental	$\text{S}^0 + 1.2\text{NO}_3^- + 0.4\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{SO}_4^{2-} + 0.6\text{N}_2 + 0.8 \text{H}_2\text{O}$	-547

En la DL, los microorganismos desnitrificantes utilizan CO_2 o HCO_3^- como fuente carbono el cual parece ser fijado por medio del ciclo de Benson Calvin (Madigan *et al.*, 2009) y como fuente de energía compuestos reducidos de azufre [sulfuro (S^{2-}), azufre elemental (S^0), tiosulfato ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) y sulfito (SO_3^{2-})], hidrógeno e incluso metales como el hierro ferroso (Sierra-

Álvarez *et al.*, 2005; Fernández-Polanco *et al.*, 2006; Beristain *et al.*, 2009; Cervantes *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010). Al igual que en la DO, la energía libre también se ve modificada por el tipo de sustrato inorgánico (Tabla 2). Al comparar los ΔG° de la DO y DL, se puede observar de forma general que el proceso organotrófico es más exergónico con respecto al litotrófico.

Por otro lado, en la última década se ha observado la simultaneidad de la DO y DL en una única unidad experimental y al proceso se le ha llamado Desnitrificación organolitotrófica (DOL), en la cual tanto compuestos orgánicos como inorgánicos se utilizan como fuente de energía (Oh *et al.*, 2001; Reyes Ávila *et al.*, 2004; Beristain-Cardoso *et al.*, 2008; Meza-Escalante *et al.*, 2008; Cervantes *et al.*, 2009; Beristain *et al.*, 2009). Los electrones que se liberan de la oxidación de la materia orgánica y la oxidación de compuestos reducidos de azufre se transfieren al nitrato y se crea una fuerza motriz de protones que podrían emplearse para la regeneración de ATP (Schmidt *et al.*, 2003).

1.1.3.3 Microbiología de la desnitrificación

La desnitrificación puede llevarse a cabo por una amplia variedad de cepas facultativas con bioquímica y taxonomía muy diversa que incluyen géneros de todas las clases de proteobacterias y arqueobacterias (Zumft, 1997). Pueden ser organotróficas, litotróficas, fototróficas, diazótrofos, entre otros (Tabla 3). Aunque algunas bacterias capaces de desnitrificar son quimioautótrofos que pueden usar hidrógeno o compuestos de azufre reducido como fuentes de energía, y otros más son fotosintetizadores, la mayoría de estos organismos generalmente obtienen su energía de la oxidación de compuestos carbonados y son en su mayoría Gram negativos (Tabla 4). No obstante, para que un microorganismo sea clasificado como desnitrificante debe cumplir con los siguientes criterios: (i) Al menos el 80% del nitrato o nitrito reducido por el microorganismo debe estar en forma de óxido nitroso y nitrógeno molecular, (ii) Debe haber un aumento en el rendimiento celular asociado a la reducción de nitrato y nitrito, (iii) La conversión del nitrato o nitrito debe ocurrir a una tasa alta, es decir, el proceso debe ser central en el metabolismo intermediario celular, (iv) La presencia de citocromos cd o la enzima nitrito reductasa debe ser demostrable en las células microbianas (Tate, 2000; Lin *et al.*, 2009), ya que existen microorganismos no desnitrificantes como *Escherichia coli*, que llevan a cabo respiración con nitrito (Madigan *et al.*, 2009).

Tabla 3 Géneros microbianos con la capacidad metabólica para la desnitrificación (Modificado de González-Blanco *et al.*, 2011)

Dominio	Tipo	Género	Especie	
Archaea	Organotróficos	<i>Haloarcula</i>	<i>marismortui</i>	
		<i>Halobacterium</i>	<i>denitrificans</i>	
		<i>Haloferax</i>	<i>denitrificans</i>	
		<i>Pyrobaculum</i>	<i>aerophilum sp</i>	
Bacteria (Gram +)	Organotróficos	<i>Bacillus</i>		
		<i>Jonesia</i> (antes <i>Listeria</i>)		
Bacteria (Gram -)	Litotróficos	<i>Beggiatoa</i>		
		<i>Thiobacillus</i>	<i>denitrificans</i>	
		<i>Thioploca</i>		
		<i>Paracoccus</i>	<i>denitrificans</i>	
		<i>Thiosphaera</i>	<i>panotropha y denitrificans</i>	
		<i>Paracoccuss</i>	<i>stutzeri</i>	
		<i>Pseudomonas</i>	<i>eutropha</i>	
		<i>Ralstonia</i>		
		<i>Thermothrix</i>	<i>thiopara</i>	
		Organotrófico	<i>Alteromonas</i>	<i>nigrifaciens</i>
			<i>Pseudomonas</i>	
			<i>Pseudovibrio</i>	<i>denitrificans</i>
			<i>Paracoccus</i>	<i>denitrificans</i>
			<i>Alcaligenes</i>	<i>faecalis</i>
	<i>Aquifex</i>		<i>pyrophilus</i>	
	<i>Bacillus</i>		<i>infernus</i>	
	<i>Aquaspirillum</i>			
	<i>Tahuera</i>		<i>aromatica</i>	
	<i>Azoarcus</i>		<i>buckelii</i>	
	<i>Halomonas</i>		<i>nitroreducens</i>	
	<i>Bacillus</i>		<i>Desnitrificans</i>	
	<i>Hyphomicrobium</i>			
	<i>Chromobacterium</i>	<i>denitrificans sp. nov</i>		
	<i>Flavobacterium</i>			
	<i>Pseudomonas</i>			
	<i>Aquaspirillum</i>			
	Fototróficos	<i>Rhodobacter</i>	<i>Halophilic</i>	
<i>Rhodopseudomonas</i>				
<i>Rhodoplanes</i>				
Diazótroficos	<i>Aquaspirillum</i>			
	<i>Azospirillum</i>			
	<i>Sinorhizodium</i>			

Las bacterias capaces de desnitrificar si bien tienen la capacidad de utilizar los óxidos de nitrógeno como aceptores terminales de electrones en condiciones anaerobias principalmente, también se ha descrito su actividad en condiciones microaerófilas y aerobias (Betlach, 1981; Bothe *et al.*, 2000). La actividad desnitrificante también ha sido sugerida en algunas Archaea, Eukarya (Thorndycroft *et al.*, 2007; Hayatsu *et al.*, 2008) y hongos, como los del género *Fusarium* (Kobadayasi y Shoun, 1995; Takaya 2002).

Por otro lado, algunos microorganismos que han sido identificados en reactores operados bajo condiciones de DOL son: *Thiosphaera panthotropha*, *Thauera aromatica* y *Thiobacillus denitrificans*. La primera fue identificada por Gommers *et al.* (1988), en un reactor de lecho granular expandido (EGSB) alimentado con sulfuro, acetato y nitrato. *Thauera aromatica* y *Thiobacillus denitrificans* fueron identificadas en un reactor de lecho fluidizado inverso (LFI) alimentado con sulfuro, fenol y nitrato (Beristain-Cardoso *et al.*, 2009).

1.1.3.4 Cinética de la desnitrificación

La velocidad específica de crecimiento (μ) de las bacterias capaces de desnitrificar está controlada por el tipo y concentración tanto del donador como del aceptor de electrones (nitrato o nitrito) y puede ser calculada a través de la ecuación de Monod (Ec. 14). La velocidad específica de consumo de sustratos (q_s) y de formación de productos (q_p), también pueden ser calculadas a partir de la ecuación de Monod pero con una modificación (Ec. 15), está ecuación no considera el crecimiento microbiano (Beccari *et al.*, 1983; Wiesmann, 1994; Cervantes *et al.*, 2000).

$$\mu = \mu_{\max} \frac{[S]}{K_s + [S]} \quad \dots \dots \dots \text{(Ec. 14)}$$

$$q_s = q_{\max} \frac{[S]}{K_s + [S]} \quad \dots \dots \dots \text{(Ec. 15)}$$

Donde,

μ = Velocidad específica de crecimiento

q_s = Velocidad de consumo de sustrato o de formación de producto (q_p)

μ_{\max} = Velocidad específica de crecimiento máxima

q_{\max} = Velocidad específica de consumo de sustratos

K_s = Constante de saturación del aceptor de electrones

S = Concentración de sustrato

Las velocidades de utilización del sustrato pueden reducirse por la presencia de compuestos inhibitorios. La variedad de posibles inhibidores y sus diferentes efectos sobre los microorganismos puede convertir la inhibición en un concepto difuso (Gódia *et al.*, 1998; Ritman y McCarty, 2001). La sustancia inhibitoria puede ser algún sustrato o componente del medio del cultivo e incluso algún producto del metabolismo de los microorganismos. En la inhibición por sustrato, el consumo del sustrato puede disminuir cuando se incrementa su concentración. La mayoría de las veces ésta inhibición se debe a que los complejos enzima – sustrato que se forman ya no sufren posterior desunión para formar enzima libre y producto (Autenrieth *et al.*, 1991). Los efectos inhibitorios por altas concentraciones de sustrato suelen representarse con el modelo de Haldane-Andrews, el cual relaciona la velocidad de consumo con la concentración del sustrato inhibitor, donde conforme aumenta la concentración del sustrato, aumenta el consumo del mismo hasta un valor máximo, luego del cual la inhibición se hace evidente y la velocidad de consumo comienza a disminuir (Figura 1.3) (Buitrón *et al.*, 2005; Linares-García 2007).

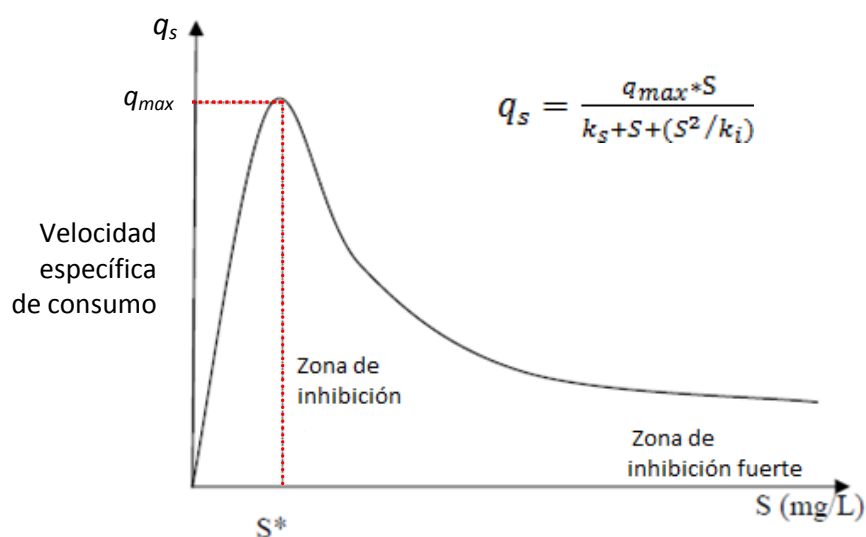


Figura 9 Dependencia de la rapidez de consumo de sustrato con respecto a la concentración del mismo, modelo de Haldane-Andrews (Buitrón *et al.*, 2005; Linares-García 2007).

En la Tabla 4, se muestran algunos de los valores cinéticos reportados para microorganismos desnitrificantes. Estos valores pueden variar, dependiendo del tipo y concentración de sustrato, así como de las condiciones ambientales como temperatura, pH, etc. Al evaluar la

cinética de la desnitrificación, se intenta entender cuáles son los factores que pueden afectar las velocidades de reacción.

Tabla 4 Datos cinéticos del proceso desnitrificante

Parámetro cinético	Símbolo y unidades	Valor	Referencia
Máxima velocidad específica de crecimiento	μ_{\max} (1/h)	0.15-1.5	Murray <i>et al.</i> , 1990; Mokhayeri <i>et al.</i> , 2006.
Tiempo de duplicación	td (h)	0.18-1.5	Carlson y Ingraham, 1983.
Velocidad específica de producción de nitrógeno (q)	q_{N_2} (mg N ₂ /gSSV h)	0.012 ^β	Reyes-Ávila <i>et al.</i> , 2004.
Velocidad específica de consumo de nitrato (acetato)	$q_{NO_3^-}$ (mg NO ₃ ⁻ /g SSV h)	8.76X10 ⁻³ -177	Bilanovic <i>et al.</i> , 1999; Reyes-Ávila <i>et al.</i> , 2004, Rodríguez <i>et al.</i> , 2007; Meza-Escalante <i>et al.</i> , 2008; Liwarska-Bizukojc <i>et al.</i> , 2012.
Velocidad específica de consumo de nitrato (p-cresol)	$q_{NO_3^-}$ (mg NO ₃ ⁻ /g SSV h)	1.98	Meza-Escalante <i>et al.</i> , 2008.
Velocidad específica de consumo de acetato	$q_{CH_3COO^-}$ (mg C-CH ₃ COO ⁻ /g SSV h)	79	Reyes-Ávila <i>et al.</i> , 2004.
Constante de afinidad (K _s)	K _s (mg N-NO ₃ ⁻ /L)	0.07-2.05	Orhon and Artan, 1994; Liwarska-Bizukojc <i>et al.</i> , 2012.
Constante de inhibición (K _i) por nitrito	mg N-NO ₂ ⁻ /L	60	Almeida <i>et al.</i> , 1994.

^α Fuente de carbono acetato a 19°C; ^β Acetato como fuente de carbono 30°C; SSV, sólidos suspendidos volátiles

De acuerdo con la literatura cuando se utiliza al nitrito como aceptor de electrones, la velocidad máxima de crecimiento (μ_{\max}) puede ser menor que cuando se utiliza nitrato (alrededor de 1.5 y 2.6 1/d, respectivamente, pero depende de las condiciones ambientales), lo que implica una menor producción de biomasa (Wiesmann, 1994). En términos del aceptor de electrones, en cultivos con biomasa suspendida se han descrito constantes de saturación (k_s) para el nitrato de 0.07 a 0.14 mg/L, mientras que para el nitrito de 0.08 mg/L (Glass *et al.*, 1997). Lo que sugiere que la desnitrificación parece ser independiente de la concentración del sustrato nitrogenado, es decir que sigue una cinética de orden cero. Por otro lado, Beccari *et al.* (1983) observaron que la velocidad de desnitrificación empleando al nitrito fue 2 veces más rápida con respecto a las velocidades de consumo de nitrato. Sin embargo, hay que resaltar

que la relación sustrato/biomasa, así como la concentración inicial del aceptor de electrones, fue diferente en los ensayos.

1.1.3.5 Factores que afectan la desnitrificación

En general, el proceso desnitrificante puede ser afectado por varios factores, generando productos indeseables por su toxicidad ya sea para el cultivo o para el ambiente. Algunos factores que promueven la acumulación de intermediarios podrían ser la concentración de oxígeno, relación C/N o S/N, la temperatura, el pH y algunos reductores orgánicos e inorgánicos (Tabla 5).

La síntesis de las enzimas que participan en el proceso de desnitrificación puede ser afectada por la presencia de oxígeno. El efecto del oxígeno varía de una especie bacteriana a otra, y principalmente de la concentración de oxígeno disuelto (Knowles, 1982; Bonin *et al.*, 1989; Zennaro *et al.*, 1993). La información en la literatura indica que el oxígeno tiene un efecto inhibitorio reversible y que más que afectar la actividad de las reductasas, afecta su síntesis, debido posiblemente a una competencia por los electrones. Seitzinger (1988), indica que para que se lleve a cabo la desnitrificación de forma eficiente, la concentración de oxígeno disuelto debe ser menor a 0.2 mg/L.

La relación C/N se establece a partir de la estequiometría. Por lo que el desbalance de la C/N por arriba o por debajo de la estequiometría puede modificar el metabolismo desnitrificante. Cuando la C/N es menor que el valor estequiométrico, es decir que hay limitación del donador de electrones, el proceso suele ser incompleto, quedando un residual de nitrato. Mientras que cuando la C/N es mayor al valor estequiométrico, es probable que ocurran otros procesos (metanogénesis) (Lin y Chen, 1995). La relación S/N tiene un efecto importante en la desnitrificación litotrófica, ya que el producto final de la oxidación del compuesto azufrado puede ser sulfato o azufre elemental (Beristain-Cardoso *et al.*, 2006).

El pH pudiera parecer un factor no limitante en la desnitrificación pues se puede llevar a cabo en un intervalo amplio de 3.9-9, (Lin *et al.*, 2009) pero la máxima velocidad de consumo de nitrato se lleva a cabo a pH de 7.0 a 8.0 (Wu *et al.*, 1995; Wicht 1996; Lin *et al.*, 2009). Algunos investigadores han sugerido que la inhibición de la desnitrificación a pH ácido es debido a la toxicidad del ácido nitroso, la forma no ionizada del nitrito (Glass y Silverstein, 1998; Almeida

et al., 1995). Este fenómeno se asocia también a que a valores de pH por debajo de la neutralidad, las enzimas como la Nir y la Nor pueden ser inhibidas (Wu *et al.*, 1995), provocando la acumulación de intermediarios como el óxido nitroso (Thomsen *et al.*, 1994, Li *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2009).

La temperatura es un factor relevante, ya que incide en la velocidad específica de consumo de los sustratos y en la velocidad específica de crecimiento de los microorganismos. De acuerdo con Lalucat *et al.* (2006), la desnitrificación puede llevarse a cabo en un intervalo de temperatura entre 5 y 35 °C; sin embargo, se ha observado que, a bajas temperaturas (<20°C), se incrementan las emisiones de N₂O y NO (Dobbie y Smith, 2001).

Por otra parte, se ha reportado que la presencia de nitrito puede inhibir o disminuir la actividad desnitrificante tanto en cultivos puros como en consorcios bacterianos (Phillips *et al.*, 2003). Las concentraciones reportadas en cultivos axénicos (*Pseudomonas denitrificans* y *Ps. fluorescens*) van desde 90 hasta 140 mg N-NO₂⁻/L (Almeida *et al.*, 1995; Kornaros y Lyberatos 1997). En consorcios microbianos, el intervalo de concentración es de 120 a 310 mg N-NO₂⁻/L (Shimizu *et al.* 1978; Almeida *et al.*, 1995; Glass *et al.* 1997; Holub *et al.*, 2000). Las diferencias en la concentración del nitrito tanto en cultivos axénicos como en consorcios, están asociadas con el tipo de microorganismo (en los cultivos axénicos), concentración de biomasa, y con las condiciones de cultivo (principalmente pH).

El efecto inhibitorio del NO₂⁻ ha sido relacionado con el pH del medio. Debido a que a valores de pH por debajo de la neutralidad el equilibrio químico se desplaza hacia la formación de ácido nitroso [HNO₂, ácido débil con una constante de ionización (pKa) de 3.34 a 25°C (Whitten *et al.*, 2008)], el cual sería el verdadero inhibidor y no el NO₂⁻ (Anthonisen *et al.*, 1976; Philips *et al.*, 2002; Sinha y Annachhatre, 2007; Park y Bae, 2009).

De acuerdo con Philips *et al.*, (2002) el HNO₂ actúa como un protonóforo, es decir, un desacoplador -agente que estimula el transporte de electrones basal, inhibe la síntesis de ATP e inhibe reacciones de intercambio catalizadas por la ATP sintetasa (Rottenberg 1990)- que aumenta la permeabilidad de las membranas. El efecto inhibitorio por la presencia de nitrito, no sólo ha sido reportado en el proceso desnitrificante, sino en otros procesos biológicos como se aprecia en la Tabla 6.

Tabla 5 Factores físicos y químicos que influyen en la cinética desnitrificante (Tabla modificada de González-Blanco *et al.*, 2011).

Parámetro	Desnitrificación organotrófica			Desnitrificación litotrófica (con sulfuro)		
	Intervalo	Efecto fuera de Intervalo	Referencia	Intervalo	Efecto fuera de intervalo	Referencia
OD	Cerca de cero OD <0.08 mg/L	Inhibición reversible La sensibilidad al OD está relacionada con el género microbiano. Aparentemente inhibe la reducción del nitrito debido a la competencia por los electrones entre la oxidasa y la nitrito reductasa.	Alefunder <i>et al.</i> 1983; Cuervo-López <i>et al.</i> 2009	La mayoría de los estudios se han realizado en condiciones anóxicas	En la literatura no se documenta el efecto del OD en la desnitrificación litotrófica.	-
Nitrito	Concentraciones >120 mg/L (consorcios)	El NO ₂ ⁻ induce y/o regula la síntesis la Nar y Nir. De tal forma que la acumulación del nitrito limita la expresión de las enzimas y por tanto su actividad, que afecta el rendimiento de desnitrificación	van Verseveld <i>et al.</i> , 1978 Glass <i>et al.</i> , 1997; Korner y Zumft 1989 Oh y Silverstein 1999; Holub <i>et al.</i> , 2000	-	-	-
Relación Fuente reductora/ Nitrato	C/N Cercana al valor estequiométrico	C/N altos predomina la formación de amonio vía RDNA. debido al exceso de poder reductor C/N altos la metalogénesis podría competir con la desnitrificación	Akunna <i>et al.</i> 1994; Cervantes <i>et al.</i> 1999, 2001; Chen y Lin 1993; Cuervo <i>et al.</i> 1999; Peña-Calva <i>et al.</i> 2004; Sobieszuk y Szewczyk 2006.	S/N cercana al valor estequiométrico	Determina el producto final azufrado (S ⁰ o SO ₄ ²⁻) Afectar la tasa de oxidación de sulfuros	Wang <i>et al.</i> 2005 Beristan-Cardoso <i>et al.</i> 2008 Chen <i>et al.</i> 2008
pH	6-9	El pH ácido disminuye la actividad desnitrificante debido a la posible formación de ácido nitroso (PH<5) Afecta a las enzimas Nir y Nor de la ruta desnitrificante	Thomsen <i>et al.</i> 1994; Wu <i>et al.</i> 1995; Li <i>et al.</i> , 2008	7.0-9.6	A pH por debajo del intervalo la especie azufrada es H ₂ S y puede atravesar la membrana celular.	Fernández-Polanco y García 2006.
Temperatura	5- 35 °C	Altas y bajas temperaturas podrían provocar cambios físico-químicos en las estructuras de la membrana celular, en los lípidos o proteínas.	Metcalf y Eddy, 2003; Lalucat <i>et al.</i> 2006; Lin <i>et al.</i> , 2009;	25-35°C condiciones mesofílicas	En la literatura no se documenta el efecto de la temperatura en la desnitrificación litotrófica.	Amatya <i>et al.</i> , 2009; Mathioudakis y Aivasidis, 2009.

Tabla 6 Procesos biológicos inhibidos por nitrito (Modificada de Philips *et al.*, 2002)

Proceso biológico	Concentración de nitrito (mg N/L)	Inhibición (%)	Referencias
Desnitrificación	308	100	Almedida <i>et al.</i> , 1995
Desnitrificación a pH 6	250	100	Glass <i>et al.</i> , 1997
Oxidación del amonio	280	60	Stein y Arp, 1998.
Oxidación del amonio	80-3000	0-80	Groeneweg <i>et al.</i> , 1994
Oxidación del amonio	42-70	50	Muller <i>et al.</i> , 1995b
Anammox	>280	100	Jetten <i>et al.</i> , 1999
Nitrificación	100	40	Dahl <i>et al.</i> , 1997
Metanogénesis	70	100	Klüber y Conrad 1998

1.2 BIBLIOGRAFÍA

1. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (1990) Toxicological Profile for Cresols. Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA.
2. Akunna JC, Bizeau C, Moletta R (1993) Nitrate and nitrite reductions with anaerobic sludge using various carbon sources: glucose, glycerol, acetic acid, lactic acid and methanol. *Water Res.* 27: 1303–1312.
3. Akunna JC, Bizeau C, Molleta R (1994) Nitrate reduction by anaerobic sludge using glucose at various nitrate concentrations: ammonification, denitrification and methanogenic activities. *Environ. Technol.* 15:41–49.
4. Alefounder PR, Ferguson SJ (1980) The location of the dissimilatory nitrite reductase and the control of dissimilatory nitrate reductase in *Paracoccus denitrificans*. *Biochem. J.* 192: 231–240.
5. Almeida, J. S., Júlio, S. M., Reis, M. A. M., Carrondo M. J. T. (1995) Nitrite inhibition of denitrification by *Pseudomonas fluorescens*. *Biotechnol Bioeng.* 46:194–201.
6. Amatya IM, Kansakar BR, Tare V, Fiksdal L (2007) Impact of temperature on biological denitrification process. *Journal of Institute of Engineering.* 7:1–6.
7. Arp, D., Stein, L.Y. (2003) Metabolism of inorganic N compounds by ammonia-oxidizing bacteria. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology.* 38: 471–495.
8. Beccari M., Passion R., Ramadori R., Tandoi V. (1983) Kinetics of dissimilatory nitrate and nitrite reduction in suspended growth culture. *J. Wat. Pollut. Control Fed.* 55:58–64
9. Betlach MR, Tiedje JM (1981) Kinetic explanation for accumulation of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide during bacterial denitrification. *Appl Environ Microbiol.* 42: 1074–1084.
10. Bell LC, Richardson DJ, Ferguson S J (1990) Periplasmic and membrane-bound respiratory nitrate reductases in *Thiosphaera pantotropha*: The periplasmic enzyme catalyzes the first step in aerobic denitrification. *FEBS Letters*, 265:85–87.
11. Bernet N, Spérandio M (2009). Principles of nitrifying processes. En: Environmental technologies to treat nitrogen pollution. 1ra ed. Editorial: IWA Publishing, London. pp. 23–39.
12. Beristain-Cardoso R, Sierra-Alvarez R, Rowlette P, Razo-Flores E, Gomez J, Field JA (2006) Sulfide oxidation under chemolithoautotrophic denitrifying conditions. *Biotechnol. Bioeng.* 95: 1148–1157.
13. Beristain-Cardoso R, Texier AC, Sierra-Alvarez R, Field JA, Razo-Flores E, Gómez J (2008) Simultaneous sulfide and acetate oxidation under denitrifying conditions using an inverse fluidized bed reactor. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 83:1197–1203.
14. Beristain-Cardoso R, Texier AC, Razo-Flores E, Méndez-Pampín R, Gómez J (2009) Biotransformation of aromatic compounds from wastewaters containing N and/or S by nitrification/denitrification: a review. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 8:325–342.
15. Berks BC, Baratta D, Richardson DJ, Ferguson SJ (1993) Purification and characterization of a nitrous oxide reductase from *Thiosphaera pantotropha*. *Eur. J. Biochem.* 212:467–476.
16. Berks BC, Richardson DJ, Robinson C, Reilly A, Aplin RT, Ferguson SJ (1994) Purification and characterization of the periplasmic nitrate reductase from *Thiosphaera panthotropha*. *Eur. J. Biochem.* 220:117–124.
17. Berks B.C., Ferguson S.J., Moir J.W.B., Richardson D.J. (1995) Enzymes and associated electron transport systems that catalyse the respiratory reduction of nitrogen en nitrogen oxides and oxyanions. *Biochim Biophys Acta.* 1232:97–173.
18. Betlach MR, Tiedje JM (1981) Kinetic explanation for accumulation of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide during bacterial denitrification. *Appl. Environ. Microbiol.* 42: 1074–1084.

19. Bedzyk L, Wang T, Ye RW (1999) The periplasmic nitrate reductase in *Pseudomonas* sp. strain G-179 catalyzes the first step of denitrification. *J Bacteriol*, 181:2802–2806.
20. Bilanovic D, Battistoni P, Cecchi F, Pavan P, Mata-Alvarez J (1999) Denitrification under high nitrate concentration and alternating anoxic conditions. *Water Res.* 33(15): 3311–3320.
21. Bock E, Koops HP, Harms H, Ahler B (1991) The biochemistry of nitrifying organisms. Variations in autotrophic life. Editorial: *Academic Press*, San Diego. pp 171-200.
22. Bonin P, Gilewicz M, Bertrand JC (1989) Effects of oxygen on each step of denitrification on *Pseudomonas nautica*. *Can J Microbiol.* 35:1061–1064.
23. Bothe H, Jost G, Schloter M, Ward BB, Witzel KP (2000), Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments. *FEMS Microbio Rev.* 24:673–690.
24. Braker G, Fesefeldt A, Witzel KP (1998) Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. *Appl Environ Microbiol.* 64:3769–3775.
25. Breisha GZ, Winter J (2010) Bio-removal of nitrogen from wastewaters- A review. *Am J Sci.* 6(12):508–528.
26. Bryan BA (1981) Physiology and biochemistry of denitrification. In C.C. Delwiche (ed.) Denitrification, nitrification, and atmospheric nitrous oxide. *John Wiley & Sons*, New York, NY.
27. Broda E (1977) Two kinds of lithotrophs missing in nature. *Z. Allg. Mikrobiol.* 17 (6):491–493.
28. Brown K, Tegoni M, Prudencio M, Pereira AS, Besson S, Moura JGG, Moura I, Cambillau C (2000) A novel type of catalytic copper cluster in nitrous oxide reductase. *Nat Struct Biol.* 7:191–195.
29. Burland SM, Edwards EA (1999) Anaerobic benzene biodegradation linked to nitrate reduction. *App Environ Microbiol.* 65:529-533.
30. Buitrón G, Schoeb ME, Moreno-Andrade I, Moreno JA (2005) Evaluation of Two Control Strategies for a Sequencing Batch Reactor Degrading High Concentration Peaks of 4 -chlorophenol, *Water Res.* 39: 1015–1024.
31. Camargo A, Alonso A (2006) Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. *Environ Int.* 32 (6):831–849.
32. Canfield DE, Kristensen E, Thamdrup B (2005) The nitrogen Cycle. *Adv Mar Biol.* 48:205–267
33. Carlson CA, Ingraham JL (1983) Comparison of denitrification by *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Paracoccus denitrificans*. *Appl Environ Microbiol* 45: 1247–1253.
34. Carr GC, Ferguson SJ (1990) The nitric oxide reductase of *Paracoccus denitrificans*. *Biochem. J.* 269: 423–429.
35. Cervantes F, Monroy O, Gómez J (1999) Influence of ammonium on the performance of a denitrifying culture under heterotrophic conditions. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 81:13–21.
36. Cervantes-Carrillo F, Pérez J, Gómez J (2000) Avances en la Eliminación Biológica del Nitrógeno de las Aguas Residuales. *Rev Latinoam Microbiol.* 42:73–82.
37. Cervantes FJ, De la Rosa DA, Gomez J (2001) Nitrogen removal from wastewaters at low C/N ratios with ammonium and acetate as electron donors. *Biores. Technol.* 79:165–170.
38. Cervantes FJ (2009) Anthropogenic sources of N-pollutants and their impact on the environment and on public health. In Environmental technologies to treat nitrogen pollution. Ed. Francisco J. Cervantes. *IWA publishing London-New York.*
39. Chen KC, Lin YF (1993) The relationship between denitrifying bacteria and methanogenic bacteria in a mixed culture of acclimated sludges. *Water Res.* 27:1749–1759.
40. Chen C, Ren N, Wang A, Yu Z, Lee DJ (2008) Simultaneous biological removal of sulfur, nitrogen and carbon using EGSB reactor. *Appl Microbiol Biotechnol.* 78:1057–1063.

41. Conrado MV, Cabello P, Manuel ML, Blasco R, Castillo F (1999) Prokaryotic nitrate reduction: molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases. *J. Bacteriol.* 181: 6573–6584.
42. Coyne MS, Arunakumari A, Pankratz HS, Tiedje JM (1989) Localization of cytochrome cd1 and copper nitrite reductase in denitrifying bacteria. *J Bacteriol.* 172:2558–2562.
43. Craske A, Ferguson, SJ (1986) The respiratory nitrate reductase from *Paracoccus denitrificans*: molecular characterization and kinetic properties. *Eur J Biochem.* 158:429–436.
44. Cuervo-López FM, Martínez F, Gutierrez-Rojas M, Noyola RA, Gomez J (1999). Effect of volumetric loading rate and carbon source on denitrification and sludge settleability in UASB reactors. *Water Sc. Technol.* 40:123–130.
45. Cuervo-López F, Martínez Hernández S, Texier AC, Gómez J (2009). Denitrification for Wastewater Treatment, in *Environmental Technologies to Treat Nitrogen Pollution*. Ed. Francisco J. Cervantes. IWA publishing London-New York
46. Cutruzzolà F, Brown K, Wilson EK, Bellelli A, Arese M, Tegoni M, Cambillau C, Brunori M (2001) The nitrite reductase from *Pseudomonas aeruginosa*: essential role of two active-site histidines in the catalytic and structural properties. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98:2232–2237.
47. Dahl C, Sund C, Kristensen GH, Vredendregt L (1997) Combined biological nitrification and denitrification of highsalinity wastewater *Wat Sci Tech.* 36(2-3): 345-352
48. Dapena-Mora A, Fernández I, Campos JL, Mosquera-Corral A, Méndez R, Jetten MSM (2007). Evaluation of activity and inhibition effects on anammox process by batch tests based on the nitrogen gas production. *Enzyme and Microbial Technol.* 40 (4):859–865.
49. Dobbie KE, Smith KA (2001) The effects of temperature, water-filled pore space and land use on N₂O emissions from an imperfectly drained gleysol. *European J Soil Sci.* 52: 667-673.
50. Ehrich S, Behrens D, Lebedeva E, Ludwig W, Bock E (1995) A new obligately chemolithoautotrophic, nitrite-oxidizing bacterium, *Nitrospira moscoviensis* nov and its phylogenetic relationship. *Archives of Microbiol.* 164:16–23.
51. EPA, 1993. Nitrogen control. In: EPA, U.S. (Ed.), Washington, D.C
52. Evans PJ, Mang DT, Young LY (1991) Degradation of toluene and m-xylene and transformation of o-xylene by denitrifying enrichment cultures. *Appl Environ Microbiol.* 57:450–454
53. Evans PJ, Mang DT, Kim KS, Young LY (1991) Anaerobic degradation of toluene by a denitrifying bacterium. *Appl. Env. Microbiol.* 57:1139–1145.
54. Fang H, Zhou G (1999) Interactions of Methanogens and Denitrifiers in Degradation of Phenols. *J Environ Eng.* 125(1):57–63.
55. Fernández-Polanco M, García-Encina, PA (2006) Application of biological treatment for sulfate-rich wastewaters. In *Advanced Biological Treatment Processes for Industrial Wastewaters: Principles and Applications*. Cervantes, F.J., Pavlostathis, S.G. and Van Haandel, A.C. (Eds.). London, IWA Publishing.
56. Frunzke K, Zumft WG (1986) Inhibition of nitrous-oxide respiration by nitric oxide in the denitrifying bacterium *Pseudomonas perfoetomarina*. *Biochim Biophys Acta.* 852:119–125.
57. Fuerst, J.A. (2005) Intracellular compartmentation in planctomycetes. *Annu Rev Microbiol.* 59:299–328.
58. Fuerst, J.A., Sagulenko, E. (2011) Beyond the bacterium: planctomycetes challenge our concepts of microbial structure and function. *Nature Rev Microbiol.* 9:403-413.
59. Fujiwara T, Fukumori Y (1996) Cytochrome cb-type nitric oxide reductase with cytochrome c oxidase activity from *Paracoccus denitrificans* ATCC 35512. *J Bacteriol.* 178:1866–1871.
60. Galloway JN, Townsend AR, Erismann JW, Bekunda M, Cai Z, Freney JR, Martinelli LA, Seitzinger SP, Sutton MA (2008) Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions. *Science* 320:889–892.

61. Glass C, Silverstein J (1998) Denitrification kinetics of high nitrate concentration water: pH Effect on inhibition and nitrite accumulation. *Water Res.* 32: 831–839.
62. Glass C, Silverstein J, Oh J (1997) Inhibition of denitrification in activated sludge by nitrite. *Wat. Environ. Res.* 69(6):1086–1093.
63. Godden JW, Turley S, Teller DC, Adman MYET, Liu MY, Payne WG, LeGall J. (1991). The 2.3 Angstrom X-ray structure of nitrite reductase from *Achromobacter cycloclastes*. *Science.* 253, 438–442.
64. Gómez J, Mendez JR, Lema JM (2000) Kinetic study of addition of volatile organic compounds to a nitrifying sludge. *Appl Biochem Biotechnol.* 88:1–12.
65. González-Blanco, G., R. Beristain-Cardoso, F. Cuervo-López, F. J. Cervantes & J. Gómez (2011) Denitrification applied to wastewater treatment: processes, regulation and ecological aspects. In: Nicolo Savaglio and Raul Puopolo (Eds) Denitrification: Processes, Regulation and Ecological Significance. *Nova Science Publishers, Inc.*, Reino Unido, Cap. 7: 211–232.
66. Gonzalez PJ, Correia C, Moura I, Brondino CD, Moura JJ (2006) Bacterial nitrate reductases: Molecular and biological aspects of nitrate reduction. *J Inorg Biochem.* 100(5-6):1015–23
67. Groeneweg J, Sellner B, Tappe W (1994) Ammonia oxidation in *Nitrosomonas* at NH_3 concentrations near K_m : Effects of pH and temperature. *Water Res.* 28:2561–2566
68. Güven D, Dapena A, Kartal B, Schmid MC, Maas B, van de Pas-Schoonen K, Sozen S, Mendez R, den Camp HJMO, Jetten MCM, Strous M, Schmidt I (2005) Propionate oxidation by and methanol inhibition of anaerobic ammoniumoxidizing bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 71(2):1066–1071.
69. Hayatsu M, Tago K, Saito M (2008) Various players in the nitrogen cycle: Diversity and functions of microorganisms involved in nitrification and denitrification. *Soil Science and Plant Nutrition.* 54:33–45
70. Häner A, Höhener P, Zeyer J (1995) Degradation of p-xylene by a denitrifying enrichment culture. *Appl Env Microbiol.* 61:3185–3188.
71. Heesche-Wagner K, Schwarz T, Kaufmann M, (1999) Phenol degradation by an enterobacterium: a *Klebsiella* strain carries a TOL-like plasmid and a gene encoding a novel phenol hydroxylase. *Can J Microbiol.* 45:162–171.
72. Holub W, Przytocka-Jusiak M, Blaszczyk M, Mycielski R (2000) Nitrite as agent selecting anaerobic phenol-degrading microflora in petroleum refining sediments. *Water Res.* 34(4):1354–1358
73. Hooper AB, Dispirito AA (1985) In Bacteria Which Grow on Simple Reductants, Generation of a Proton Gradient Involves Extracytoplasmic Oxidation of Substrate. *Micro Rev.* 49(2):140–157.
74. Isaka K, Date Y, Sumino T, Yoshie S, Tsuneda S (2006) Growth characteristic of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in an anaerobic biological filtrated reactor. *Appl Microbiol Biot.* 70(1): 47–52.
75. Jetten M, Logemann S, Muyzer G, Robertson L, de Vries S, van Loosdrecht M, Kuenen J (1997) Novel principles in the microbial conversion of nitrogen compounds. *A. van Leeuwenhoek.* 71:75–93.
76. Jetten MSM, Strous M, van de Pas-Schoonen KT, Schalk J, van Dongen L, van de Graaf AA, Logemann S, Muyzer G, van Loosdrecht MCM, Kuenen JG (1999) The anaerobic oxidation of ammonium. *FEMS Microbiol. Rev.* 22:421–437
77. Jetten MSM, Cirpus I, Kartal B, Van Niftrik L, Van de Pas-Schoonen KT, Slijkers O, Haaijer S, Van der Star W, Schmid M, Van de Vossenberg J, Schmidt I, Harhangi H, Van Loosdrecht MCM, Kuenen JG, Op den Camp H, Strous M (2005) 1994- 2004:10 years of research on the anaerobic oxidation of ammonium. *Bioch Soc Transac.* 33 (1):119–123.
78. Jetten MSM, Niftrik L, Strous M, Kartal B, Keltjens JT, Op den Camp HJ (2009) Biochemistry and molecular biology of anammox bacteria. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 44:65–84
79. Kakutani T, Watanabe H, Arima K, Beppu T (1981) Purification and properties of copper-containing nitrite reductase from a denitrifying bacterium, *Alcaligenes faecalis* strain S-6. *J. Biochem.* 89:453–451

80. Kalyuzhnyia S, Gladchenko M, Mulderb A, Versprillec B (2006) DEAMOX—New biological nitrogen removal process based on anaerobic ammonia oxidation coupled to sulphide-driven conversion of nitrate into nitrite. *Water Res.* 40 (19):3637–3645.
81. Kartal B, Van Niftrik L, Sliemers O, Schmid MC, Schmidt I, van de Pas-Schoonen K, Cirpus I, Van der Star W, Van Loosdrecht M, Abma W, Kuenen JG, Mulder JW, Jetten MSM, Op Den Camp H, Strous M, Van de Vossenberg J (2004) Application, eco-physiology and biodiversity of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria. *Re/View Environ Sci Bio/Technol.* 3: 255–264.
82. Kartal B, Rattray J, Van Niftrik LA, Van de Vossenberg J, Schmid MC, Webb RI, Schouten S, Fuerst JA, Damsté JS, Jetten MSM, Strous M (2007) *Candidatus Anammoxoglobus propionicus* a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *Syst Appl Microbiol.* 30(1): 39–49.
83. Kartal B, Van Niftrik L, Rattray J, Van De Vossenberg JLCM, Schmid MC, Sinninghe-Damste J, Jetten MSM, Strous M (2008) *Candidatus Brocadia fulgida*: An autofluorescent anaerobic ammonium oxidizing bacterium. *FEMS Microbiol Ecol.* 63: 46–55
84. Kartal B, Maalcke WJ, de Almeida NM *et al.* (2011) Molecular mechanism of anaerobic ammonium oxidation. *Nature.* 479:127–130.
85. Kartal B, de Almeida NM, Maalcke WJ, Op den Camp HJM, Jetten MSM, Keltjens JT (2013) How to make a living from anaerobic ammonium oxidation. *FEMS Microbiol Rev.* 37:428–461.
86. Ketchum PA, Dnariatz G, LeGall J, Payne W (1991) Menaquinol-nitrate reductase of *Bacillus halodenitrificans*. *J Bacteriol.* 173:2498-2505.
87. Kleiner, D. (1985). Bacterial ammonium transport. *FEMS Microbiol Rew.* 32(2): 87-100.
88. Knowles R (1982) Denitrification. *Microbiol. Rev.* 46(1): 43–70
89. Kobayashi M, Shoun H (1995) The copper-containing dissimilatory nitrite reductase involved in the denitrifying system of the fungus *Fusarium oxysporum*. *J Biol Chem.* 270: 4146–4151.
90. Kristjansson JK, Hollocher TC (1980) First practical assay for soluble nitrous oxide reductase of denitrifying bacteria and a partial kinetic characterization. *J Biol Chem.* 255:704–707.
91. Kornaros M, Lyberatos G (1997) Kinetics of Aerobic Growth of a Denitrifying Bacterium, *Pseudomonas Denitrificans*, in the presence of Nitrates and/or Nitrites. *Water Res.* 31(3):479–488.
92. Körner H, Zumft WG (1989) Expression of denitrification enzymes in response to the dissolved oxygen level and respiratory substrate in continuous culture of *Pseudomonas stutzeri*. *Appl Environ Microbiol.* 55:1670–1676.
93. Klüber HD, Conrad R (1998) Inhibitory effects of nitrate, nitrite, NO and N₂O on methanogenesis and other redox processes in anoxic rice field soil. *FEMS Microbiol Ecol.* 25:301–318
94. Kuypers, M.M.M., Sliemers, A.O., Lavik, G., Schmid, M., Jørgensen, B.B., Kuenen, J.G., Sinninghe-Damste, J.S., Strous, M., Jetten, M.S.M. (2003) Anaerobic ammonium oxidation by Anammox bacteria in the *Black Sea Nature.* 422:608–611
95. Lalucat J, Bennisar A, Bosch R, García-Valdés E, Palleroni NJ (2006) Biology of *Pseudomonas stutzeri*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 70(2): 510–547.
96. Li YM, Li J, Zheng GH, Luan JF, Fu QS, Gu GW (2008) Effects of the COD/NO₃⁻-N ratio and pH on the accumulation of denitrification intermediates with available pyridine as a sole electron donor and carbon source. *Environl Technol.* 29:1297–1306.
97. Lin YF, Chen KC (1995). Denitrification and methanogenesis in a co-immobilized mixed culture system. *Water Res.* 29:35–43.
98. Lin YM, Tay JH, Liu Y, Hung TS (2009) Biological Nitrification and Denitrification Processes. *Handbook of Environmental Engineering.* 8:539-588
99. Linares-García JA (2007) Operación de un biorreactor aerobio discontinuo bajo una estrategia de control óptima. Tesis de maestría, Instituto de ingeniería, UNAM.

100. Liwarska-Bizukojc E, Bizukojc M, Ledakowicz S (2012) Denitrification in the activated sludge systems: study of the kinetics. *ACEE*. 2: 101–108.
101. Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP (2009) Brock Biología de los microorganismos 12 ed., Pearson Prentice Hall, Pearson Education S.A.
102. Martínez Bastida JJ (2009) El nitrógeno en las aguas subterráneas de la comunidad de Madrid: descripción de los procesos de contaminación y desarrollo de herramientas para la designación de zonas vulnerable. Tesis Doctoral Cambio Global y Desarrollo Sostenible Departamento Interuniversitario de Ecología, Universidad de Alcalá de Henares.
103. Martínez-Gutiérrez E, González-Márquez H, Martínez-Hernández S, Texier AC, Cuervo-López FM, Gómez J (2012). Effect of phenol and acetate addition on 2-chlorophenol consumption by a denitrifying sludge. *Environ Technol*. 33:1375–1382
104. Martínez S, Cuervo-López FM, Gomez J (2007) Toluene mineralization by denitrification in an up flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. *Bioresour Technol*. 98(9): 1717-1723.
105. Martínez HS, Sun W, Sierra-Alvarez R, Field JA (2013) Toluene-nitrite inhibition synergy of anaerobic ammonium oxidizing (anammox) activity. *Process Biochem*. 48:926-930
106. Mateju V, Cizinska S, Krejci J, Janoch T (1992) Biological water denitrification. A review. *Enzyme Microb. Technol*. 14: 170–183.
107. McCarty GW (1999) Modes of action of nitrification inhibitors. *Biol Fert Soils*. 29:1-9.
108. McKenneya DJ, Drury CF, Wanga SW (2001) Effects of Oxygen on Denitrification Inhibition, Repression, and Derepression in Soil Columns. *Soil Sci. Soc. Am. J*. 65: 126–132.
109. Meza-Escalante E, Texier AC, Cuervo-Lopez F, Gomez J, Cervantes FJ (2008) Inhibition of sulphide on the simultaneous removal of nitrate and p-cresol by a denitrifying sludge. *J Chem Technol. Biotechnol*. 83: 372–377
110. Metcalf and Eddy (2003) Wastewater Engineering Treatment and Reuse. Fourth Ed. McGraw-Hill Intl. Ed. New York, NY.
111. Mathioudakis VL, Aivasidis A (2009) Effect of temperature on anoxic sulfide oxidation and denitrification in the bulk wastewater phase of sewer networks. *Wat Sci Technol*. 59:705–712.
112. Michalski W, Nicholas DJ (1985) Molecular characterization of copper containing nitrite reductase from *Rhodospirillum rubrum* sp. denitrificans. *Biochim. Biophys. Acta*. 828:130–137.
113. Mokhayeri Y, Nichols A, Murthy S, Riffat R, Dold P, Takacs I (2006) Examining the influence of substrates and temperature on maximum specific growth rate of denitrifiers. *Water Sci Technol*. 54(8):155–162.
114. Monma-Ohtaki J, Maeno Y, Nagao M, Iwasa M, Koyama H, Isobe I, Seko-Nakamura Y, Tsuchimochi T, Matsumoto T (2002) An autopsy case of poisoning by massive absorption of cresol a short time before death. *Forensic Sci Int*. 126:77–81.
115. Moura I, Moura JGG (2001) Structural aspects of denitrifying enzymes. *Curr. Opin. Chem. Biol*. 5, 168–175.
116. Mulder, A. (1992) Anoxic Ammonium Oxidation US patent 427849 (5078884)
117. Mulder A, Van de Graff AA, Robertson LA, Kuenen JG (1995) Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiol Ecol*. 16:177–184.
118. Muller EB, Stouthamer AH, van Verseveld HW (1995) A novel method to determine maximal nitrification rates by sewage sludge at a non-inhibitory nitrite concentration applied to determine maximal rates as a function of the nitrogen load. *Water Res*. 29(4):1191–1197
119. Murray RE, Parsons LL, Smith MS (1990) Aerobic and anaerobic growth of rifampin-resistant denitrifying bacteria in soil. *Appl Environ Microbiol*. 56(2): 323–328.

120. Norma oficial mexicana NOM-001-ECOL-1996, Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales.
121. Norma oficial mexicana, NOM-010 STPS, 1999. sistema para la identificación y comunicación de peligros y riesgos por sustancias químicas peligrosas en los centros de trabajo.
122. NORMA Oficial Mexicana NOM-052-SEMARNAT-2005, Que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos.
123. Oh J, Silverstein J (1999) Acetate limitation and nitrite accumulation during denitrification. *J. Environ. Eng.* 125(3):234–242.
124. Olmos A, Olguin P, Fajardo C, Razo-Flores E, Monroy O (2004) Physicochemical characterization of spent caustic from the OXIMER process and sour water from mexican oil refineries. *Energ Fuel.* 18:302-304.
125. Orhon D, Artan N (1994) Modelling of Activated Sludge Systems, Technomic Publishing Company, Inc., Lancaster, PA, USA.
126. Oshiki M, Shimokawa M, Fujii N, Satoh H, Okabe S (2011) Physiological characteristics of the anaerobic ammoniumoxidizing bacterium *Candidatus Brocadia sinica*. *Microbiology.* 157:1706–1713
127. Paredes D, Kuschk P, Mbwette TSA, Stange F, Müller RA, Köser H (2007) New Aspects of Microbial Nitrogen Transformations in the Context of Wastewater Treatment – A Review. *Eng. Life Sci.* 7(1):13–25.
128. Park S, Bae W (2009) Modeling kinetics of ammonium oxidation and nitrite oxidation under simultaneous inhibition by free ammonia and free nitrous acid. *Process Biochem.* 44(6): 631–640
129. Peng Y, Zhu G (2006) Biological nitrogen removal with nitrification and denitrification via nitrite pathway. *Appl Microbiol Biotechnol.* 73(1):15–26.
130. Peng YZ, Yong MA, Wang SY (2007) Denitrification potential enhancement by addition of external carbon sources in a pre-denitrification process. *J. Environ. Sciences.* 19:284–289.
131. Peña-Calva A, Olmos DA, Viniestra-Gonzalez G, Cuervo-Lopez FM, Gomez J (2004) Denitrification in presence of toluene, *m*-xylene and benzene by denitrification: kinetics mass balance and yields. *Appl Biochem Biotech.* 119:195–208.
132. Philips S, Laanbroek HJ, Verstraete W (2002) Origin, causes and effects of increased nitrite concentrations in aquatic environments. *Rev Environ Sci Biotechnol.* 1:115–141.
133. Pratscher J, Stichternoth C, Fichtl K, Schleifer KH, Braker G (2009) Application of Recognition of Individual Genes-Fluorescence In Situ Hybridization (RING-FISH) To Detect Nitrite Reductase Genes (*nirK*) of Denitrifiers in Pure Cultures and Environmental Samples. *Appl Environ Microbiol.* 75:802-810
134. Prosser JI (1989) Autotrophic nitrification in bacteria. *Adv Microb Physiol.* 30: 125–181.
135. Quan ZX, Rhee SK, Zuo JE, Yang Y, Bae JW, Park JR, Lee ST, Park YH (2008) Diversity of ammonium-oxidizing bacteria in a granular sludge anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) reactor. *Environ Microbiol.* 10:3130–3139
136. Remde A, Conrad F (1990). Production of nitric oxide in *Nitrosomonas europaea* by reduction of nitrite. *Archiv of Microbiol.* 154:187–191
137. Risser PG, Parton WJ (1982). Ecosystem analysis of the tallgrass prairie: nitrogen cycle. *Ecology*, 62: 1342–1351.
138. Reyes-Avila J, Razo-Flores E, Gomez J (2004) Simultaneous biological removal of nitrogen, carbon and sulfur by denitrification. *Water Res.* 38:3313–3321.
139. Richardson DJ, Watmough NJ (1999) Inorganic nitrogen metabolism in bacteria. *Curr Opin Chem Biol.* 3: 207–219.

140. Rustrian E, Delgenes JP, Bernett N, Moletta R (1997) Nitrate reduction in acidogenic reactor: Influence of wastewater COD/N-NO₃ ratio on denitrification and acidogenic activity. *Environ Technol.* 18: 309-315.
141. Sánchez J, Sanabria J (2009) Microbial metabolisms over advanced processes for Nitrogen removal, a prospective review. *Rev Colomb Biotecnol.* 11(1): 114-124
142. Schmidt I, Sliemers O, Schmid M, Bock E, Fuerst J, Kuenen JG, Jetten MSM, Strous M (2003) New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater. *FEMS Microbiol Rev.* 27: 481-492
143. Schramm A (2003) In situ analysis of structure and activity of the nitrifying community in biofilms, aggregates, and sediments. *Geomicrobiol J.* 20: 313-333.
144. Schepers E, Meert N, Glorieux G, Goeman J, Van der Eycken J, Vanholder R (2007) *p*-cresylsulphate, the main in vivo metabolite of *p*-cresol, activates leucocyte free radical production. *Nephrol Dial Transplant.* 22:592-596
145. Seitzinger SP (1988) Denitrification in fresh water and coastal marine ecosystems: Ecological and geochemical significance. *Limno Oceanogr.* 33:702-724
146. Shimizu T, Furuki T, Waki T, Ichikawa K (1978) Metabolic characteristics of denitrification by *Paracoccus denitrificans*. *J. Ferment. Technol.* 56:207-213.
147. Sierra-Alvarez R, Beristain-Cardoso R, Salazar M, Gómez J, Razo-Flores E, Field JA (2007) Chemolithotrophic denitrification with elemental sulfur for groundwater treatment. *Water Res.* 41: 1253-1262.
148. Silvestrini MC, Tordi MG, Musci G, Brunori M (1990) The reaction of *Pseudomonas* nitrite reductase and nitrite. *J Biol Chem.* 265:11783-11787.
149. Sinha B, Annachatre AP (2007) Assessment of partial nitrification reactor performance through microbial population shift using quinone profile, FISH and SEM. *Bioresour Technol.* 98(18): 3602-3610
150. SooHoo CK, Hollocher TC (1991) Purification and characterization of nitrous oxide reductase from *Pseudomonas aeruginosa* strain P2. *J. Biol. Chem.* 266:2203-2209.
151. Sobieszuk P, Szewczyk KW (2006) Estimation of (C/N) ratio for microbial denitrification. *Environ Technol.* 27:103-108.
152. Sphapleigh JP, Payne WJ (1985) Differentiation of *c*,*d*1 cytochrome and copper nitrite reductase production in denitrifiers. *FEMS Microbiol Lett.* 26:275-279.
153. Stein LY, Arp DJ (1998) Loss of ammonia monooxygenase activity in *Nitrosomonas europaea* upon exposure to nitrite. *Appl Environ Microb.* 64(10): 4098-4102
154. Stewart V (1988) Nitrate respiration in relation to facultative metabolism in enterobacteria. *Microbiol. Rev.* 52:190-232.
155. Strous M, Heijnen JJ, Kuenen JG, Jetten MSM (1998) The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotech.* 50 (5):589-596.
156. Strous M, Fuerst JA, Kramer EHM, Logemann S, Muyzer G, Van de Pas-Schoonen KT, Webb R, Kuenen JG, Jetten MSM (1999) Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature.* 400 (6743):446-449.
157. Strous M, Kuenen JG, Fuerst JA, Wagner M, Jetten MSM (2002) The anammox case—a new experimental manifesto for microbiological eco-physiology. *Ant. van Leeuwen.* 81: 693-702
158. Strous M, Pelletier E, Mangenot S *et al.* (2006) Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome. *Nature* 440: 790-794.
159. Suzuki I, Dular U, Kwok SC (1974) Ammonia or ammonium ion as substrate for oxidation by *Nitrosomonas europaea* cell and extracts. *J Bacteriol.* 120(1): 556-558.

160. Suzuki S, Kataoka K, Yamaguchi K, Inoue T, Kai Y (1999). Structure-function relationships of copper-containing nitrite reductases. *Coord. Chem. Rev.* 190-192, 245–265.
161. Takaya N. (2002) Dissimilatory nitrate reduction metabolisms and their control in fungi. *J Biosci Bioeng.* 94(6): 506–510.
162. Tallur PN, Megadi VB, Ninnekar HZ (2009) Biodegradation of *p*-cresol by immobilized cells of *Bacillus sp.* strain PHN 1. *Biodegradation.* 20: 79-83.
163. Tandukar M, Pavlostathis SG, Cervantes FJ (2009) Autotrophic denitrification for the removal of nitrogenous and sulphurous contaminants from wastewaters. In: Cervantes FJ (Ed) Environmental technologies to treat nitrogen pollution: principles and engineering. IWA, London, pp 324–377.
164. Tate (Ed.), Soil microbiology. John Wiley & Sons, Inc., New York, USA (2000).
165. Tavares P, Pereira AS, Moura JGG, Moura I (2006) Metalloenzymes of the denitrification pathway. *J Inorg Biochem.* 100: 2087–2100.
166. Teske A, Alm E, Reagan JM, Toze S, Rittmann BE, Stahl DA (1994) Evolutionary relationships among ammonia and nitrite oxidizing bacteria. *J Bacteriol.* 176(21): 6623–6630.
167. Thomsen JK, Geest T, Cox RP (1994). Mass spectrometric studies of the effect of pH on the accumulation of intermediates in denitrification by *Paracoccus denitrificans*. *Appl Environ Microbiol.* 60: 536–541.
168. Tiedje JM (1988) In Biology of anaerobic microorganisms. Zehnder A.J.B. (Ed.). Chap. 4th Wiley, New York. 717: 179–244.
169. Thorndycroft FH, Butland G, Richardson DJ, Watmough NJ (2007) A new assay for nitric oxide reductase reveals two conserved glutamate residues form the entrance to a proton-conducting channel in the bacterial enzyme. *Biochem. J.* 401:111–119.
170. Van Dongen U, Jetten MSM, Loosdrecht MCM (2001). The SHARON-Anammox process for treatment of ammonium rich wastewater. *Wat Sci Tech.* 44 (1): 153–160.
171. Van de Graaf AA, Mulder P, de Bruijn P, Jetten MSM, Robertson LA, Kuenen JG (1995) Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process. *Appl Environ Microbiol.* 61: 1246–1251
172. Van de Graaf AA, de Bruijn P, Robertson LA, Jetten MSM, Kuenen JG (1996) Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms in a fluidized bed reactor. *Microbiology.* 142:2187–2196.
173. Van de Graaf AA, De Bruijn P, Robertson LA, Jetten MSM, Kuenen JG (1997) Metabolic pathway of anaerobic ammonium oxidation on the basis of ¹⁵N studies in a fluidized bed reactor. *Microbiology,* 143: 2415–2421.
174. van Niftrik L.A, Fuerst JA, Sinninghe-Damste JS, Kuenen JG, Jetten MSM, Strous M (2004) The anammoxosome: an intracytoplasmic compartment in anammox bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 233: 7–13
175. van Niftrik L, Jetten MSM (2012) Anaerobic Ammonium Oxidizing Bacteria: Unique Microorganisms with Exceptional Properties. *Microbiol Mol Biol Rev.* 76(3): 585–96.
176. Van Verseveld HW, Stouthamer AH (1978) Electron-transport chain and coupled oxidative phosphorylation in methanol-grown *Paracoccus denitrificans*. *Arch Microbiol.* 118:13–20.
177. Vitousek PM, Howarth RW (1991) Nitrogen limitation on land and in the sea: how can it occur? *Biogeochemistry.* 13:87–115.
178. Vobwinkel R, Neidt I, Bothe H (1991) The production and utilization of nitric oxide by a new denitrifying strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch. Microbiol.* 156:62–69.
179. Watson SW, Bock E, Koops HP, Hooper A (1989) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volumen 3. Editorial: The Williams and Wilkins, Baltimore. pp 1808-1834.

180. Wicht H (1996) A model for predicting nitrous oxide production during denitrification in activated sludge. *Water Sci Technol.* 34:99–106.
181. Wiesmann U (1994) Biological nitrogen removal from wastewater. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 51: 113–54.
182. Wu Q, Knowles R (1994) Cellular regulation of nitrate uptake in denitrifying *Flexibacter canadensis*. *Can. J. Microbiol.* 40:576–582
183. Wu Q, Knowles R, Niven DF (1995) Effect of ionophores on denitrification in *Flexibacter canadensis*. *Can. J. Microbiol.* 41:221–234.
184. Ye RW, Fries MR, Bezborodnikov GS, Averill BA, Tiedje JM (1993) Characterization of the structural gene encoding a copper-containing nitrite reductase and homology of this gene to DNA of other denitrifiers. *Appl Environ Microbiol.* 59(1): 250–254
185. Yoshimatsu K, Sakurai T, Fujiwara T (2000) Purification and characterization of dissimilatory nitrate reductase from a denitrifying halophilic archaeon, *Haloarcula marismortui*. *FEBS Lett.* 470:216–220.
186. Zehr JP, Paerl HW (1998) Nitrogen fixation in the marine environment: Genetic potential and nitrogenase expression. In: Cooksey KE (Ed.), *Molecular Approaches to the Study of the Ocean*. Chapman and Hall, London. p. 285–302.
187. Zumft WG (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* 61: 533–561.
188. Zumft WG (2005) Nitric oxide reductases of prokaryotes with emphasis on the respiratory, heme-copper oxidase type. *J Inorg Biochem.* 99:194–215.
189. http://en.wikipedia.org/wiki/File:The_nitrogen_cycle_Arrigo.png

UNA VERSIÓN MODIFICADA DE ESTE CAPÍTULO FUE PUBLICADA EN: NOVA SCIENCE PUBLISHERS, INC., REINO UNIDO

González-Blanco, G., R. Beristain-Cardoso, F. Cuervo-López, F. J. Cervantes & J. Gómez (2011) Denitrification applied to wastewater treatment: processes, regulation and ecological aspects. In: Nicolo Savaglio and Raul Puopolo (Eds) *Denitrification: Processes, Regulation and Ecological Significance*. Nova Science Publishers, Inc., Reino Unido, Cap. 7, pp. 211-232.

2. Antecedentes

2. ANTECEDENTES

La desnitrificación se acompaña con frecuencia de la acumulación transitoria o permanente del nitrito (Holub *et al.*, 2000), lo que podría ocurrir cuando el donador de electrones está limitado y/o cuando la velocidad de reducción de NO_3^- a NO_2^- es mayor con respecto a la reducción de NO_2^- a NO o por un desequilibrio entre las enzimas nitrato y nitrito reductasas (Betlach y Tiedje, 1981; Glass *et al.*, 1997). Cuando el nitrito se acumula puede inhibirse el consumo de nitrato, ya que parece ser que actúa como un desacoplador del proceso respiratorio (Betlach y Tiedje, 1981; Sijbesma *et al.*, 1996; Cervantes *et al.*, 2009), debido a que el nitrito es un regulador de la síntesis de la nitrato y nitrito reductasa (van Verseveld *et al.*, 1978; Körner y Zumft 1989).

2.1 DESNITRIFICACIÓN CON NITRITO

La desnitrificación con nitrito, no sólo es una etapa consecutiva en la reducción de nitrato, es también un proceso independiente, llevado a cabo tanto con cultivos axénicos (*Pseudomonas denitrificans* y *fluorescens*, *Paracoccus denitrificans*) como por consorcios bacterianos (Błaszczuk *et al.*, 1980; Almeida *et al.*, 1995; Kornaros y Lyberatos 1997; Glass *et al.* 1997; Holub *et al.*, 2000; Adav *et al.*, 2010). Sin embargo, el uso de la desnitrificación con nitrito, suele estar limitada debido a su efecto inhibitorio (Beccari *et al.*, 1983; Philips *et al.*, 2002).

Beccari *et al.* (1983), empleando un consorcio microbiano (proveniente de un sistema de lodos activados) estabilizado bajo condiciones desnitrificantes, evaluaron el efecto del pH y concentración de sólidos suspendidos volátiles (SSV). En un intervalo de 20 a 25 mg N- NO_2^- /L, utilizando licor mezclado (como donador de electrones), pH de 7-8 y una concentración celular de 500 y 1000 mg SSV/L, los autores observaron una desnitrificación completa. Sin embargo, observaron una inhibición de la desnitrificación cuando disminuyeron la concentración celular (100 a 150 mg SSV/L), manteniendo los demás factores constantes. Lo que indicaría que el desbalance en la relación sustrato-biomasa podría estar limitando el proceso desnitrificante.

Glass *et al.* (1997) evaluaron el efecto del pH en presencia de nitrito, utilizando lodos previamente expuestos a un agua residual con una concentración de nitrato de 1350 mg N/L

y una salinidad de 40 000 mg de sólidos disueltos/L. Después del periodo de adaptación (no indican el tiempo), se utilizó el lodo para estudiar el efecto del pH (6 a 8) en presencia de nitrito (15 a 2100 mg N/L) y acetato como donador de electrones a una relación 1.5:1 carbono:nitrito. Empleando un modelo de orden cero, los autores observaron que el incremento de pH de 6 a 8, provocó un aumento en la velocidad de desnitrificación de 0.001 hasta 0.02 mg N/mg SS h, cuando se evaluó una concentración de 250 mg N-NO₂⁻/L. La inhibición de la desnitrificación se observó a un pH de 6, el cual se asoció a la formación de ácido nitroso. Estos autores reportaron que la concentración inhibitoria del ácido nitroso fue alrededor de 0.02 mg/L a pH de 6. El ácido nitroso es relativamente un ácido débil, con un valor de pKa de 3.17, a 25°C. Por ejemplo, a un pH de 7 el 0.01% del nitrito se encuentra como ácido nitroso, lo que explicaría una mayor inhibición por debajo de la neutralidad.

En estudios realizados con cultivos puros de *Paracoccus denitrificans*, *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas stutzeri*, y utilizando acetato y butirato como donadores de electrones, se observó que, cuando en el cultivo están presentes el nitrato y el nitrito, se genera una competencia por el donador de electrones entre las enzimas nitrato y la nitrito reductasas. Los resultados mostraron que el nitrato puede ser el aceptor de electrones preferido, en comparación con nitrito, ya que se observó la reducción del nitrato a nitrito y una vez que el nitrato se redujo, inició la reducción del nitrito (Kornaros *et al.*, 1996; Thomsen *et al.*, 1994, Almeida *et al.*, 1995). Esto pudo deberse a que la enzima nitrito reductasa es regulada por la concentración de nitrito (Zumft, 1997).

Adav *et al.* (2010) realizaron estudios en lote para evaluar el efecto de diferentes fuentes de carbono de fácil asimilación (acetato, etanol y metano) en el proceso desnitrificante con nitrito. El inóculo provino de un reactor de lotes secuenciados (SBR), alimentado con acetato y amonio, con ciclos aerobios/anóxicos. Los ensayos se realizaron en botellas serológicas de 200 mL, a 25 °C y 150 rpm, con una concentración de N-NO₂⁻ de 200 mg/L en todos los ensayos y diferentes concentraciones (100-3000 mg/L) de acetato, etanol y metano. De acuerdo con los autores, para garantizar la actividad del proceso desnitrificante adicionaron 50 mg/L de alilltiurea para inhibir la actividad de los microorganismos nitrificantes. Cabe señalar que en el documento, no se indica la concentración celular del inóculo y no se mide la formación de N₂. Para evaluar el proceso, los autores miden el consumo de nitrito y la actividad de la enzima

nitrito reductasa. Los resultados experimentales muestran una disminución en la concentración de N-NO_2^- , en todas las concentraciones evaluadas y para los tres sustratos orgánicos e indican que el consumo de acetato > etanol > metanol, a partir de las velocidades específicas de consumo de nitrito (2.07, 1.20 y 160 $\text{mg N-NO}_2^-/\text{g SSV h}$ respectivamente). Los autores indicaron que existió una correlación lineal entre las velocidades de consumo y la actividad de la Nir. Sin embargo, al no evaluar el consumo de los sustratos orgánicos así como la formación de N_2 , es riesgoso indicar que se dio el proceso desnitrificante debido principalmente al origen del inóculo (nitrificante).

El tipo de donador de electrones en la desnitrificación con nitrito influye en el metabolismo. Con compuestos de fácil oxidación (acetato, butirato, etanol, etc.) la desnitrificación se ha llevado a cabo satisfactoriamente. No obstante, cuando el donador de electrones es de tipo fenólico, el proceso desnitrificante se ve afectado. Holub *et al.*, (2000) utilizando sedimentos marinos evaluaron el proceso desnitrificante, en presencia de fenol (187 mg C/L) como donador de electrones, y nitrito (de 114 a 280 mg N/L), en cultivos lote. Observaron que la oxidación del fenol se acopló a la reducción de nitrito, cuando la concentración del nitrito fue menor que 185 mg N/L en los cultivos, y a concentraciones mayores el proceso fue inhibido. Los autores asociaron este fenómeno a un efecto combinado de dos compuestos tóxicos, el fenol y nitrito.

2.2 SISTEMAS DE TRATAMIENTO PARA LA BIOTRANSFORMACIÓN DE COMPUESTOS NITROGENADOS POR DESNITRIFICACIÓN CON NITRITO

Las aguas residuales presentan generalmente concentraciones altas de amonio, por lo que el proceso de tratamiento convencional se ha realizado integrando la nitrificación-desnitrificación vía nitrato (Figura 10a). No obstante, desde hace algunos años, es a través del nitrito (nitritación) que se ha propuesto el tratamiento (Figura 10b).

Debido a que la eliminación biológica del nitrógeno vía nitrito ofrece ventajas como tener bajos costos de operación, menor requerimiento de oxígeno, baja producción de lodos, así como menores requerimientos de donador de electrones y mayores velocidades de consumo en la etapa de desnitrificación y una alta eficiencia (Peng y Zhu, 2006; Paredes *et al.*, 2007; Torá *et al.*, 2011), ha sido ampliamente adoptada sobre el tratamiento convencional de

eliminación biológica. En la primera etapa, la nitrificación contribuye con la oxidación del amonio a nitrito y posteriormente, la desnitrificación reduce el nitrito a nitrógeno (N_2).

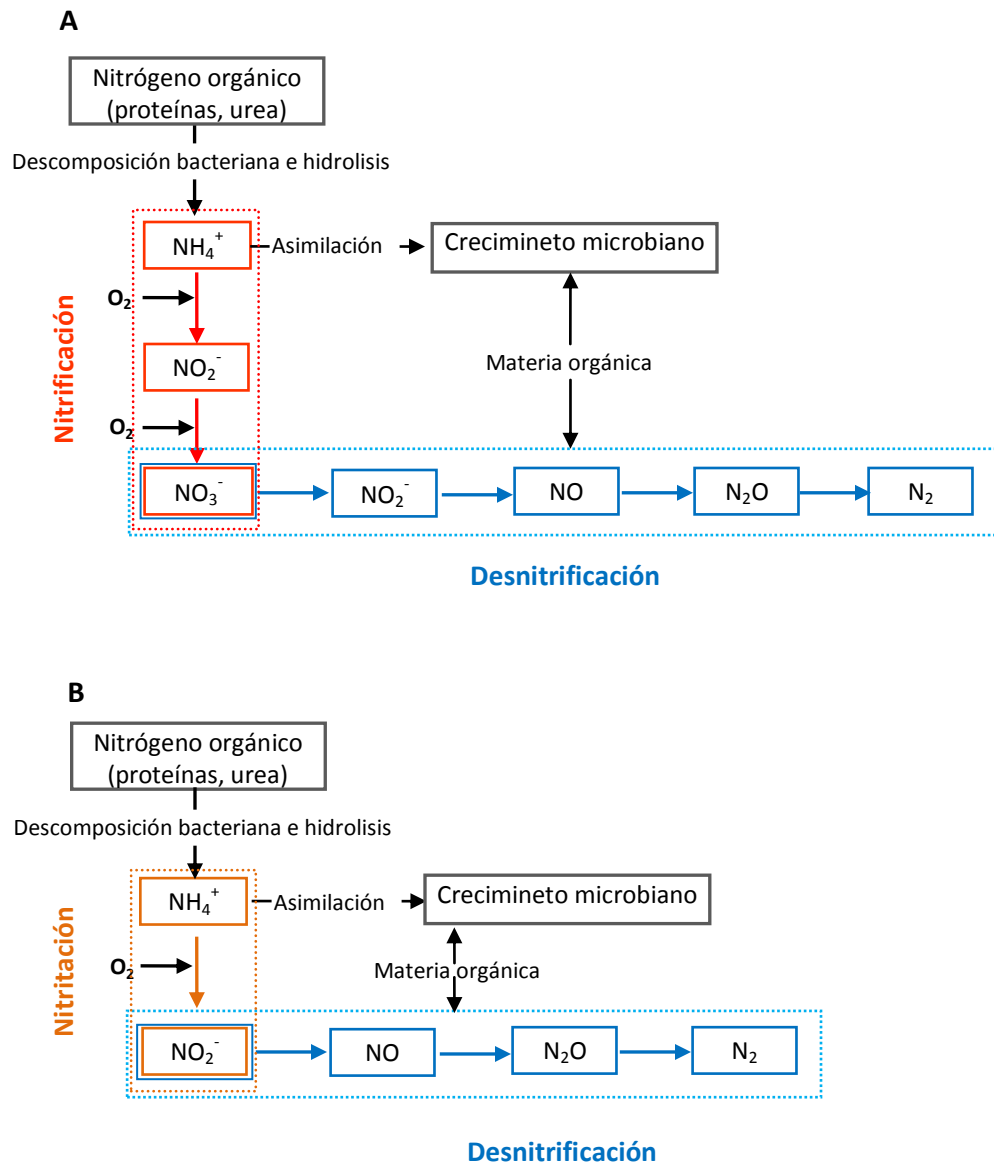


Figura 10 Rutas de los procesos para el tratamiento de aguas residuales con alto contenido de compuestos nitrogenados (A) proceso convencional y (B) proceso vía nitrito (nitritación). (Modificado de Metcalf y Eddy., 2003)

A continuación se describen los principales tratamientos biológicos desarrollados en torno al nitrito: 1) el sistema NDS (simultaneous nitrification-denitrification), 2) el sistema SHARON (single reactor system for high ammonia removal over nitrite), 3) el sistema OLAND (oxygen-limit autotrophic nitrification-denitrification) y 4) el sistema SAND (Simultaneous partial

nitritation, anammox, and denitrification) (Hellings *et al.*, 1998; Kuai y Verstraete 1998; Khin y Annachhatre, 2004; Paredes *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2009).

La NDS, en la mayoría de las veces, se lleva a cabo en un solo reactor. Este sistema trata aguas residuales con alto contenido de compuestos nitrogenados, baja carga orgánica y con limitación de oxígeno para promover la formación de nitrito (Pochana y Keller, 1999; Chiu *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2009). Se han propuesto dos mecanismos para tratar de explicar este proceso, uno de carácter físico y otro de carácter biológico (Robertson y Kuenen, 1984; Münch *et al.*, 1996; Hibiya *et al.*, 2003).

La explicación física es que la NDS ocurre como una consecuencia de un gradiente en la concentración de oxígeno disuelto (OD) entre los flóculos microbianos o biopelícula y el seno del fluido. Apuntando la existencia de dos zonas una aerobia y otra anaerobia dentro del mismo flóculo. Así las bacterias nitrificantes se distribuirían sobre la periferia del flóculo, en donde las concentraciones de oxígeno se encuentran por encima de 1-2 mg O₂/L, mientras que las bacterias capaces de desnitrificar se ubican en el interior del flóculo, en donde la concentración de oxígeno sería baja, formando un consorcio simbiótico similar al de los gránulos anaerobios (Munch *et al.*, 1996; Zhu *et al.*, 2008). Se han realizado estudios que muestran evidencia experimental sobre el gradiente OD en flóculos y gránulos utilizando incluso microelectrodos de OD y microscopia conofocal de barrido láser (Pochana y Keller, 1999; Zhu *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2014). Generalmente se excluye información sobre el o los procesos biológicos (ya que sólo se evalúa el consumo de sustratos y no se aportan datos microbiológicos).

La explicación biológica, asume que el proceso se lleva a cabo debido al metabolismo facultativo de las bacterias capaces de desnitrificar, así como en la capacidad de algunas bacterias capaces de desnitrificar de nitrificar en condiciones aerobias, como las del género *Pseudomonas*, *Paracoccus denitrificans*, *Thiosphaera pantotropha* (Robertson y Kuenen, 1984; Robertson *et al.*, 1988). Sin embargo, los estudios alrededor de este proceso, por lo general, se hacen de manera global (sólo se calculan eficiencias y no se sigue el destino de los compuestos), y generalmente se da mayor seguimiento al proceso nitrificante que al desnitrificante.

Algunos de los factores que afectan este proceso son: 1) la concentración de carbono orgánico. Una concentración alta de materia orgánica provoca la inhibición de las bacterias autótrofas nitrificantes, mientras que una concentración baja conduce al déficit del donador de electrones para la desnitrificación (Tam *et al.*, 1992), 2) la concentración de oxígeno disuelto; ya que a concentraciones de OD < 0.5 mg/L no se lleva a cabo el proceso nitrificante, y a concentraciones de OD > 2 mg/L se inhibe el proceso desnitrificante en este tipo de sistemas (Münch *et al.*, 1996).

El proceso SHARON es un sistema continuo de nitrificación que fue diseñado para tratar un efluente proveniente de una planta de digestión de lodos. El sistema se concibió inicialmente para acoplar la nitrificación parcial a la desnitrificación en dos unidades de reacción; sin embargo a partir de que se da a conocer el proceso anammox, se ha preferido la integración de la nitrificación parcial a este proceso (SHARON-Anammox) (Van Dongen *et al.*, 2001; Khin y Annachhatre, 2004; Paredes *et al.*, 2007). El proceso acoplado es llevado a cabo mediante la alternancia de condiciones aerobias y anóxicas. Existen reportes que indican que el proceso de nitrificación parcial vía nitrito es técnicamente factible y económicamente favorable, cuando se tratan aguas residuales con alta concentración de amonio o baja relación C/N (Turk y Mavinic, 1989; Jetten *et al.*, 2002).

El proceso CANON y OLAND, utilizan en general el mismo principio: combinan la nitrificación parcial a la desnitrificación y/o anammox, se llevan a cabo en ausencia o baja concentración de carbono orgánico y bajo condiciones de oxígeno limitado en un solo reactor o biopelícula. Estos dos procesos difieren entre sí únicamente en la configuración del reactor (Kuai y Verstraete, 1998; Paredes *et al.*, 2007).

En el 2006, se dio a conocer un proceso que combina la desnitrificación litotrófica y el proceso anammox para la eliminación de compuestos nitrogenados y azufrados, dicho proceso fue denominado DEAMOX (denitrifying ammonium oxidation), y consiste en dirigir la desnitrificación litotrófica para la acumulación transitoria de nitrito (Kalyuzhnyi *et al.*, 2006).

El sistema SNAD (Simultaneous partial nitritation, anammox, and denitrification), se lleva a cabo en un sólo reactor alternando el suministro de oxígeno, para promover la nitrificación parcial, el proceso anammox y la desnitrificación organotrófica, para eliminar de forma

simultánea los compuestos nitrogenados y materia orgánica (Chen *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011). Generalmente, el sistema SNAD se evalúa con gránulos y en reactores SBR. El reactor SBR se opera mediante ciclos (llenado, reacción, sedimentación y vaciado), lo que permite alternar condiciones aerobias y anóxicas durante el ciclo de reacción o el cambio de ciclo. Otras de las ventajas de sistema es que permite el desarrollo de los microorganismos de crecimiento lento, tales como bacterias nitrificantes y anammox (Strous *et al.*, 1998; De Kreuk y Van de Loosdrecht, 2004; Li *et al.*, 2011). Al igual que los otros procesos, el principio del sistema SNAD es promover la producción de nitrito por el proceso nitrificante.

De acuerdo con lo descrito, se puede observar que estos sistemas ofrecen una gran promesa para la eliminación de nitrógeno de las aguas residuales, que contienen altas concentraciones de amonio, pero se limitan a aguas residuales con baja o nula carga orgánica. Sin embargo, la mayor parte de las aguas residuales contienen un alto contenido de carbono orgánico, además de que depende del proceso nitrificante y del suministro de oxígeno (Kumar y Lin 2010). Los reportes indican que la desnitrificación con nitrito se logra en la mayoría de los sistemas descritos, aunque las vías de eliminación de nitrógeno no se comprenden bien.

2.3 OXIDACIÓN DE AMONIO EN PRESENCIA DE MATERIA ORGÁNICA POR DESNITRIFICACIÓN CON NITRATO EN UN SOLO REACTOR

Estrictamente hablando, la primera evidencia experimental de la eliminación de materia orgánica, amonio y nitrato por desnitrificación fue presentada por 1995, cuando se descubrió el proceso anammox. Mulder *et al.* (1995) observaron el consumo de amonio y carbono orgánico, así como la reducción de nitrato. Al operar un reactor de lecho fluidizado de 21 L a una temperatura de 35 °C y un pH 7. El reactor fue alimentado con agua residual (tratada previamente bajo condiciones metanogénicas) proveniente de una fábrica productora de levadura que presentaba una composición promedio de carbono orgánico de 165-190 mg/L y de amonio 90-130 mg N-NH₄⁺/L y era suplementada con 1200 mg N-NO₃⁻/L. Los autores observaron que el consumo de amonio y nitrato incrementaban la producción de N₂. Sin embargo y debido a la relevancia de la oxidación anaerobia de amonio, se minimizó la importancia de la oxidación de la materia orgánica. Además, tiempo después se reportó que los microorganismos anammox eran litoautotróficos (Van de Graaf *et al.*, 1995; Strous *et al.*,

1999) por lo que las investigaciones sobre la eliminación simultánea de amonio, nitrato y materia orgánica fueron escasas.

Cervantes *et al.*, (1999), evaluaron la eliminación de amonio, nitrato y materia orgánica en un solo reactor, bajo condiciones anóxicas. El estudio consistió en evaluar el efecto de la concentración de amonio en el proceso desnitrificante. Los experimentos se llevaron a cabo en un reactor de flujo ascendente (UASB), con una velocidad de carga constante de nitrato (2500 mg $\text{NO}_3^-/\text{L d}$) como aceptor de electrones, y como fuente reductora utilizaron acetato a una relación C/N- NO_3^- de 1.23. Las velocidades de carga de amonio probadas fueron: 25, 250 y 500 mg $\text{NH}_4^+/\text{L d}$. Se observó que al incrementar las velocidades de carga de amonio había un incremento en la producción de N_2 por arriba del teórico esperado. La sobre producción de N_2 coincidió con la oxidación del amonio. Los autores sugieren que el proceso involucrado en la sobre producción de N_2 pudo ser el proceso anammox o una vía distinta: Esta investigación abre la posibilidad de que se pueda llevar a cabo la oxidación del amonio y materia orgánica por desnitrificación en un solo reactor.

Sabumon (2007) llevó a cabo estudios en lote para evaluar la eliminación de materia orgánica y amonio en condiciones anaerobias. Los estudios fueron llevados a cabo en botellas serológicas de 500 mL. La biomasa utilizada fue obtenida de ecosistemas que contenían amoníaco y materia orgánica (estiércol de vaca y lodos de curtiduría). El sistema se evaluó con 150 mg NH_4^+/L ; 782 mg NO_3^-/L y 564 mg DQO/L (sacarosa como donador de electrones) a un pH 7,5 y temperatura de $30\pm 2^\circ \text{C}$. La eficiencia de eliminación de los sustratos fue de 44, 93 y 82% para el NH_4^+ , NO_3^- y la DQO respectivamente y no se reportan rendimientos, así como el destino final de los sustratos. De acuerdo con los autores la sacarosa promovió la desnitrificación heterótrofa y el principal producto del proceso anammox en presencia de materia orgánica fue el NO_3^- y no el N_2 como se esperaba. Por lo que los autores sugieren que pudo ser debido a un mecanismo distinto al proceso Anammox informado.

Beristain-Cardoso *et al.* (2011), evaluaron el comportamiento metabólico y cinético de un lodo granular desnitrificante expuesto a diferentes velocidades de carga de sulfuro (55, 128, 225 y 295 mg $\text{S}^{-2}/\text{L d}$) en un reactor UASB, que fue alimentado con acetato (440 ± 6 mg C/L d), amonio (36 ± 1 mg N/L) y nitrato (630 ± 6 mg N/L). Los autores observaron que a velocidades

de carga de sulfuro < 128 mg/L d, el amonio fue asimilado, mientras que a velocidades de carga mayores el amonio fue oxidado a N_2 , con eficiencias de consumo de amonio, acetato y sulfuro mayores a 95%, mientras que la eficiencia de consumo de nitrato fue de 72%, siendo los productos finales N_2 , CO_2 y S^0 .

Torà *et al.* (2011) llevaron a cabo la desnitrificación utilizando nitrito como aceptor de electrones. El objetivo de este estudio fue comparar la eficacia de la denitrificación utilizando diferentes fuentes de carbono orgánico (Tabla 7), y empleando reactores SBR sin control del pH. Los ciclos en los reactores fueron de: 23 h de tiempo de reacción anóxica, 40 min de sedimentación, 13 min de lavado y 7 min de inactividad. La concentración de nitrito para los reactores alimentados con etanol y fermentado de lodo primario fue en promedio de 1000 mg N- NO_2^- /L, y para las demás fuentes orgánicas evaluadas la concentración de N- NO_2^- no se especificó con claridad en el documento.

Tabla 7 Tipo de sustrato y velocidades de eliminación de nitrito obtenidas (q_{N-NO_2}) por Torà *et al.*

Fuente de carbono	Tiempo de cultivo (d)	* NO_2^- (mg N/L)	DQO (mg O_2 /L)	* NH_4^+ (mg N/L)	*SSV (mg/L)	** q_{N-NO_2} (g N/g SSV d)
Etanol al 70%	54	350-500	1700 ± 600		900-1500	0.17 ± 0.03
Glicerol	20	100	1450 ± 200		500-600	0.25 ± 0.05
Fermentado lodo primario	26	100-550	700 ± 200	240	600-1600	0.13 ± 0.02
Lixiviados de vertedero	20	100-650	2750 ± 250	120 ± 20	600-2700	0.16 ± 0.04

*Valores aproximados, **Promedio

Las velocidades específicas de consumo de nitrito presentaron el siguiente orden: glicerol > etanol > lixiviados vertedero > fermentado lodo primario (Tabla 7). Empleando los lixiviados de vertedero los autores reportaron un aumento en la fracción inorgánica de la biomasa. Cabe señalar que en este trabajo no se cuantificó la producción de nitrógeno molecular, y las relaciones DQO/N sugieren que los sustratos fueron destinados a la producción de biomasa más que al proceso catabólico.

Los trabajos descritos, muestran la posibilidad de oxidar el amonio a N_2 , en presencia de materia orgánica simple con un lodo desnitrificante. Kumar y Lin (2010), sugirieron que el proceso desnitrificante y anammox podrían coexistir para llevar a cabo la eliminación de

materia orgánica y compuestos nitrogenados de forma anóxica y sin requerir al proceso nitrificante y oxígeno. La coexistencia que menciona Kumar y Lin (2010), se basa principalmente en que en ambientes marinos y en sistemas ricos en NO_3^- , se ha encontrado actividad anammox y desnitrificante (Dalsgaard *et al.*, 2005). El proceso anammox dependería de otros procesos para reducir NO_3^- a NO_2^- . En condiciones anóxicas, el NO_3^- puede reducirse por bacterias capaces de desnitrificar u otras especies que promueven la reducción desasimilatoria del NO_3^- a NH_4^+ (DNRA) y la liberación de NO_2^- como un intermediario libre. Posteriormente, NO_2^- podría ser utilizado por las bacterias anammox para la oxidación de NH_4^+ . Sin embargo, la interacción de los organismos anammox con bacterias capaces de desnitrificar y el papel de los compuestos orgánicos aún no están claros.

2.4 OXIDACIÓN BIOLÓGICA DEL *p*-CRESOL BAJO CONDICIONES DESNITRIFICANTES

La oxidación de compuestos aromáticos, tanto en procesos aerobios como anaerobios, se efectúa a través de una gran variedad de rutas periféricas mediante la activación de moléculas de diferente estructura que convergen en una serie limitada de metabolitos intermediarios, que a su vez se canalizan hacia el metabolismo central (encargadas de la apertura del anillo), conocido también con el nombre de “embudo catabólico” (Harayama y Timmis, 1989. Harwood *et al.*, 1999).

La ruta central más estudiada es la que llega a benzoil-CoA (Breese *et al.*, 1998; Harwood *et al.*, 1999; Shinoda *et al.*, 2004), ya que en él convergen diferentes rutas periféricas a través de las cuales son oxidados una gran variedad de compuestos como el *p*-cresol, fenol, bencilalcohol, etilbenceno, tolueno, fenilacetato, fenilpropionato, fenilalanina, vanilina, anilina, benzoato, y sus derivados hidroxilados o aminados, así como moléculas aromáticas halogenadas (Heider y Fuchs, 1997; Schink *et al.*, 2000). Las rutas de oxidación menos estudiadas son la del 3-hidroxibenzoil-CoA, 2-aminobenzoil-CoA, resorcinol (1,3-dihidroxibenceno), floroglucinol (1,3,5-trihidroxibenceno), hidroxihidroquinona (1,3,4-trihidroxibenceno), y 6-hidronicotinato (Heider *et al.*, 1998; Harwood *et al.*, 1999; Boll, 2005; Wöhlbrand *et al.*, 2008).

De acuerdo con la literatura, la principal vía periférica por la cual las bacterias desnitrificantes transforman una gran variedad compuestos aromáticos es la de benzoil-CoA. La oxidación

anaerobia del *p*-cresol en presencia del nitrato fue reportada por primera vez en 1977 por Backker, quien propuso que el *p*-cresol fue oxidado al ácido 4-metil caproico. Casi una década más tarde, Brossert *et al.* (1986), propusieron la ruta de oxidación del *p*-cresol (*p*-Cr) en presencia de nitrato (Figura 11). La ruta consiste en la formación inicial de una quinona, para después incorporar el oxígeno del agua, reacción catalizada por la enzima metilhidrolasa para formar el *p*-OH-bencilalcohol (*p*-OHBzalc), seguido de una deshidrogenación para formar el *p*-OH benzaldehído (*p*-OHBzald), y por último se lleva a cabo una nueva deshidrogenación para producir el *p*-OHbenzoato (*p*-OHBato). El nitrato actúa como aceptor de electrones externo y se reduce a N₂.

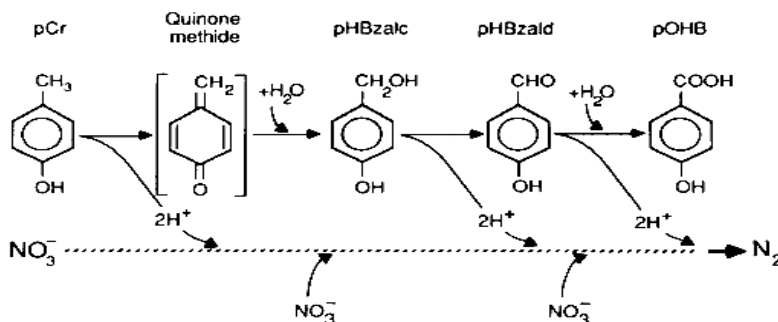


Figura 11 Modelo hipotético de la oxidación del *p*-cresol en condiciones Desnitrificantes (Brossert *et al.*, 1986)

Rudolphi *et al.* (1991), reportaron que tanto *Paracoccus sp.*, como una cepa de *Pseudomonas*, fueron capaces de oxidar el *p*-Cr hasta CO₂, utilizando al nitrato como aceptor final de electrones con la formación de N₂. A través de la detección de intermediarios y medición de actividades enzimáticas, se sugirió una ruta metabólica de la oxidación del *p*-Cr, que excluye al *p*-OHBzalc (Brossert *et al.*, 1986) e incorpora al *p*-OHBenzoil-CoA y al benzoil-CoA (Figura 12). Un mismo compuesto aromático puede ser metabolizado por diferentes rutas catabólicas en función de la cepa bacteriana y del tipo de respiración que esté utilizando (Schink *et al.*, 2000).

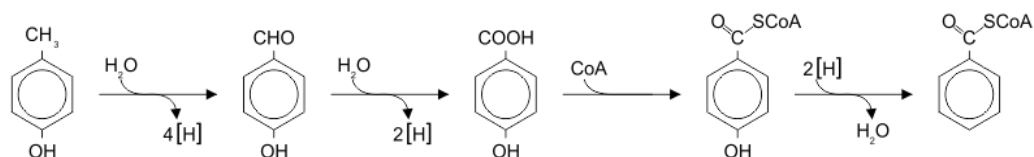


Figura 12 Ruta de la oxidación del *p*-cresol por bacterias capaces de desnitrificar: *Paracoccus Sp* y *Pseudomonas* (Rudolphi *et al.*, 1991)

En 1992, Khoury *et al.*, evaluaron la eliminación anaerobia del *p*-Cr por un consorcio con capacidad de desnitrificar, en cultivos en lote. Con concentraciones desde 1 hasta 5 mM de *p*-Cr, y una concentración constante la de nitrato de 20 mM. Se observó que hasta a una concentración de 3 mM, la oxidación del *p*-Cr estuvo acoplada a la reducción del nitrato, y reportaron la identificación de los tres intermediarios (*p*-OHBzalc, *p*-OHBzido y *p*-OHBato) sugeridos por Brossert *et al.* (1986). A las concentraciones más altas observaron un bajo o nulo consumo del *p*-Cr, y lo asociaron a la acumulación de nitrito en el cultivo. Sin embargo, en todos los ensayos estuvo en exceso el nitrato, por lo que la presencia de nitrito pudo estar asociada a una inhibición de la enzima nitrito reductasa.

O'Connor y Young (1996), también realizaron estudios en lote con un consorcio desnitrificante, con la finalidad de evaluar el efecto de los cresoles, en condiciones anóxicas desnitrificantes. Los estudios se llevaron a cabo con *o*-, *m*- y *p*-cresol, utilizando una concentración inicial de 0.5 mM del sustrato aromático y 30 mM de KNO₃. Los autores observaron que cuando se llevó a cabo la reducción del nitrato con el *m* y *p*-Cr, se tuvo una recuperación de nitrógeno molecular mayor que el 100% en relación al valor teórico esperado, y mientras que con *o*-cresol, la recuperación fue del 56%. Estos autores también proponen un periodo de aclimatación en función de la fase de retardo del cultivo de 5, 14 y 21 semanas para cada uno de los isómeros de cresol, siendo el *p*-Cr el que presentó el tiempo más corto y *o*-Cr el más largo. En términos de las velocidades volumétricas de consumo de sustratos, el comportamiento siguió el mismo orden *p*-Cr >>> *m*-Cr > *o*-Cr con valores de 97, 5.70 y 5.49 μmol/L-d. Los tres isómeros del cresol fueron consumidos en su totalidad en 31, 34 y 42 semanas de cultivo, respectivamente.

La eliminación del *p*-Cr también ha sido valorada bajo condiciones desnitrificantes organo-litotróficas. Sierra *et al.* (2005), llevaron a cabo la eliminación simultánea de *p*-Cr, sulfuro y nitrato en un reactor UASB, evaluando dos velocidades de carga sulfuro (0.18-0.39 mg/L d), *p*-Cr (0.39-0.84 mg/L d) y N-NO₃⁻ (0.16-0.28 mg/L d). A la menor velocidad de carga evaluada, las eficiencias de consumo fueron de 93.9, 83.1 y 79.3%, para sulfuro, *p*-Cr y N-NO₃⁻, respectivamente. Al incrementar la velocidad de carga, las eficiencias de consumo de los tres

sustratos fueron cercanas al 100%. Para ambas velocidades de carga los productos finales fueron N_2 , SO_4^{2-} y S^0 .

Meza-Escalante *et al.* (2008) también estudió la oxidación simultánea de *p*-Cr y sulfuro en condiciones desnitrificantes, en cultivos en lote. Los experimentos en lote fueron llevados a cabo con concentraciones estequiométricas entre la fuente oxidante y la fuente reductora. En el cultivo organotrófico la concentración de *p*-Cr fue de 44 mg C/L y de nitrato de 50 mg N/L. El principal producto de la oxidación del *p*-Cr fue el bicarbonato y de la reducción del nitrato el N_2 , con rendimiento $Y_{HCO_3^-}$ de $0,77 \pm 0,02$ y de Y_{N_2} de $0,66 \pm 0,01$. El bajo rendimiento desnitrificante fue atribuido a la formación transitoria de nitrito. En los cultivos organolitotróficos se evaluaron con 44 mg C-*p* Cr/L, 65 mg N- NO_3^- /L y 20 mg S^2- /L. En este caso, los productos principales fueron el HCO_3^- , N_2 y azufre elemental (cuando estuvo presente el nitrito en el cultivo) o sulfato. El rendimiento $Y_{HCO_3^-}$ fue de 0,7 y de Y_{N_2} fue de 0,62, por lo que los autores sugirieron que el metabolismo no fue afectado. Sin embargo, indican que la cinética del proceso en presencia de sulfuro, sí se vio afectada al compararla con el proceso organotrófico (Tabla 8). Tanto el efecto negativo del sulfuro, como la acumulación de nitrito en el cultivo fue atribuida a una posible precipitación de metales (Fe y Cu) esenciales para la nitrito reductasa. No obstante, en el cultivo organotrófico en ausencia de sulfuro, también se observó la acumulación de nitrito. Es posible pensar que el *p*-Cr también pudo ejercer un efecto negativo en la enzima mencionada.

Tabla 8 Velocidades específicas (mg N o mg C/g SSV d) utilizando *p*-Cr como fuente de electrones en ausencia y presencia de sulfuro. (Meza-Escalante *et al.*, 2008)

Condiciones	$q_{NO_3^-}$	$q_{NO_2^-}$	q_{N_2}	q_{COT}^*	$q_{HCO_3^-}$
Nitrato + <i>p</i>-cresol	47.6 ± 6 (129 ± 5.6)	35.4 ± 0.4 (21 ± 1.0)	5.9 ± 1.6 (50 ± 1.0)	32.7 ± 2.0 (40.7 ± 0.5)	22.9 ± 0.6 (57.4 ± 2.3)
Nitrato + <i>p</i>-cresol + sulfuro	26 ± 6.0 (93 ± 2.0)	21.6 ± 5.6 (11 ± 1.0)	8.4 ± 0.9 (32 ± 2.4)	9.3 ± 1.0 (46.7 ± 0.8)	19.7 ± 2.3 (29.6 ± 2.1)

*las q_{COT} en términos de *p*-cresol (q_{p-cres}) son: 28.6 ± 0.8 (118 ± 2.0) en condiciones organotróficas y 19.1 ± 1.7 (66.5 ± 0.9) en condiciones organolitotróficas. Las velocidades específicas son el valor promedio de experimentos por duplicado \pm desviación estándar.

Por otro lado, Cervantes *et al.* (2009) llevaron a cabo experimentos en lote para evaluar la capacidad de eliminación simultánea de nitrato, sulfuro y *p*-cresol. Se mantuvo constante la

concentración de *p*-Cr y variaron la concentración de nitrato (64, 85 y 120 mg N-NO₃⁻/L) y de sulfuro (25, 50 y 100 mg S²⁻/L) de forma paralela, para balancear estequiométricamente la concentración de nitrato, con respecto al sulfuro y *p*-cresol. Los resultados mostraron que para las concentraciones de 20 y 50 mg S²⁻/L, la velocidad de oxidación de *p*-cresol fue mayor (hasta 2.6 veces más alta en términos equivalentes de reducción) que la observada para el sulfuro hasta sulfato, y que a la concentración más alta (100 mg S²⁻/L) las velocidades de consumo se invirtieron, es decir la velocidad de oxidación de sulfuro ahora fue más rápida (1.4 veces en términos de equivalentes de reducción) que la del *p*-Cr. Los autores sugirieron que el proceso de eliminación de las dos fuentes reductoras se llevó a cabo en dos fases respiratorias: en la primera fase, el nitrato se reduce más rápidamente por la presencia de ambas fuentes reductoras, mientras que en la segunda fase la reducción ocurre más lento debido a que la reducción ocurre a partir de los intermediarios de la oxidación de sulfuro y *p*-cresol.

2.5 BIBLIOGRAFÍA

- 1 Adav SS, Lee DJ, Lee Lai JY (2010) Enhanced biological denitrification of high concentration of nitrite with supplementary carbon source. *Appl Microbiol Biotechnol.* 85:773–778.
- 2 Almeida JS, Júlio SM, Reis MAM, Carrondo MJT (1995) Nitrite inhibition of denitrification by *Pseudomonas fluorescens*. *Biotechnol. Bioeng.* 46, 194–201.
- 3 Beccari M, Passion R, Ramadori R, Tandoi V (1983) Kinetics of dissimilatory nitrate and nitrite reduction in suspended growth culture. *J Wat Pollut Control Fed.* 55:58–64.
- 4 Bakker G (1977) Anaerobic degradation of aromatic compounds in the presence of nitrate. *FEMS Microbiol Lett.* 1:103–108
- 5 Beristain-Cardoso R, Gómez J, Mendéz-Pampín R (2011) Sulfide and ammonium oxidation, acetate mineralization by denitrification in a multipurpose UASB reactor. *Bioresour Technol.* 102, :2549–2554
- 6 Betlach MR, Tiedje JM (1981) Kinetic explanation for accumulation of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide during bacterial denitrification. *Appl. Environ. Microbiol.* 42:1074–1084.
- 7 Blaszczyk M, Mycielski R, Jaworowska-Deptuch H, Brzostek K (1980) Effect of various sources of organic carbon and high nitrite and nitrate concentrations on the selection of denitrifying bacteria. I. Stationary cultures. *Acta Microbiol Polon.* 29:397–406.
- 8 Breese K, Boll M, Alt-Mörbe J, Schägger H, Fuchs G (1998) Genes coding for the benzoyl-CoA pathway of anaerobic aromatic metabolism in the bacterium *Thauera aromatica*. *Eur J Biochem.* 256:148-154.
- 9 Boll M (2005) Key enzymes in the anaerobic aromatic metabolism catalysing Birchlike reductions. *Biochim Biophys Acta.* 1707:34–50.
- 10 Bossert ID, Rivera MD, Young LY (1986) p-Cresol biodegradation under denitrifying conditions: isolation of abacterial coculture. *FEMS Microbiol. Ecol.* 38:313–319.
- 11 Cervantes F, Monroy O, Gómez J (1999) Influence of ammonium on the performance of a denitrifying culture under heterotrophic conditions. *Appl Biochem Biotechnol.* 81, 13–21.
- 12 Cervantes F, Meza-Escalante E, Texier AC, Gómez J (2009). Kinetic limitations during the simultaneous removal of p-cresol and sulfide in a denitrifying process. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 36:1417–1424.
- 13 Chan YJ, Chong MF, Law ChL, Hassell DG (2009) A review on anaerobic–aerobic treatment of industrial and municipal wastewater. *Chem Eng J.* 155: 1–18
- 14 Chen H, Liu S, Yang F, Xue Y, Wang T (2009) The development of simultaneous partial nitrification, ANAMMOX and denitrification (SNAD) process in a single reactor for nitrogen removal. *Bioresour. Technol.* 100:1548–54
- 15 Chiu YC, Lee LL, Chang CN, Chao AC (2007) Control of carbon and ammonium ratio for simultaneous nitrification and denitrification in a sequencing batch bioreactor. *International Biodeterioration & Biodegradation.* 59: 1–7
- 16 De Kreuk MK, Van Loosdrecht MCM (2004) Selection of slow growing organisms as a means for improving aerobic granular sludge stability. *Water Sci. Technol.* 49, 9–17.
- 17 Glass C, Silverstein J, Oh J (1997) Inhibition of denitrification in activated sludge by nitrite. *Wat. Environ. Res.* 69(6):1086–1093
- 18 Harayama S, Rekik M (1989) Bacterial aromatic ring-cleavage enzymes are classified into two different gene families. *J Biol Chem.* 264:15328-15333
- 19 Harwood C, Burchhardt SG, Herrmann H, Fuchs G (1999) Anaerobic metabolism of aromatic compounds via the benzoyl-CoA pathway. *FEMS Microbiol Rev.* 22:439-458
- 20 Heider J, Fuchs G (1997) Anaerobic metabolism of aromatic compounds. *Eur J Biochem.* 243:577–596.

- 21 Heider J, Boll M, Breese K, Breinig S, Ebenau-Jehle C, Feil U, Gadón D, Laempe D, Leuthner B, Mohamed M, Schneider S, Burchhardt G, Fuchs G (1998) Differential induction of enzymes involved in anaerobic metabolism of aromatic compounds in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica*. *Arch Microbiol.* 170:120–131.
- 22 Hellinga C, Schellen AAJC, Mulder JW, van Loosdrecht MCM, Heijnen JJ (1998) The SHARON process: an innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich waste water. *Water Sci. Technol.* 37(9): 135–142.
- 23 Hibiya K, Terada A, Tsuneda S, Hirata A (2003) Simultaneous nitrification and denitrification by controlling vertical and horizontal microenvironment in a membrane-aerated biofilm reactor. *J Biotechnol.* 100(1):23–32.
- 24 Holub W, Przytocka-Jusiak M, Blaszczyk M, Mycielski R (2000) Nitrite as agent selecting anaerobic phenol-degrading microflora in petroleum refining sediments. *Water Res.* 34(4): 1354–1358.
- 25 Jetten MSM, Schmidt M, Schmidt I, Wubben M, Van Dongen U, Abma W, et al. (2002) Improved nitrogen removal by application of new nitrogen-cycle bacteria. *Rev Environ Sci Bio/Technol.* 1: 51–63.
- 26 Kalyuzhnyia S, Gladchenko M, Mulderb A, Versprillec B (2006) DEAMOX—New biological nitrogen removal process based on anaerobic ammonia oxidation coupled to sulphide-driven conversion of nitrate into nitrite. *Water Res.* 40(19): 3637–3645.
- 27 Khin T, Annachhatre AP (2004) Novel microbial nitrogen removal processes. *Biotechnol. Adv.* 22 (7): 519–532.
- 28 Kornaros M, Zafiri C, Lyberatos G (1996) Kinetics of denitrification by *Pseudomonas denitrificans* under growth conditions limited by carbon and/or nitrate or nitrite. *Wat Environ Res.* 68: 934–945.
- 29 Kornaros M, Lyberatos G (1997) Kinetics of aerobic growth of a denitrifying bacterium, *Pseudomonas denitrificans* in the presence of nitrates and/or nitrites. *Water Res.* 31:479–488
- 30 Körner H, Zumft WG (1989) Expression of denitrification enzymes in response to the dissolved oxygen level and respiratory substrate in continuous culture of *Pseudomonas stutzeri*. *Appl Environ Microbiol.* 55:1670–1676.
- 31 Khoury N, Dott W, Kampfer P, (1992). Anaerobic degradation of phenol in batch and continuous cultures by a denitrifying bacterial consortium. *Appl Microbiol Biotechnol.* 37: 524–528.
- 32 Kuai L, Verstraete W (1998) Ammonium removal by the oxygen-limited autotrophic nitrification-denitrification system. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4500–4506.
- 33 Kumar M, Lin JG (2010) Co-existence of anammox and denitrification for simultaneous nitrogen and carbon removal—Strategies and issues. *J Hazard Mater.* 178: 1–9.
- 34 Li X, Xiao Y, Liao D, Zheng W, Yi T, Yang Q, et al. (2011) Granulation of simultaneous partial nitrification and anammox biomass in One Single SBR System. *Appl Biochem Biotechnol.* 163:1053–1065.
- 35 Li J, Cai A, Wang D, Chen C, Ni Y (2014) Structure Analysis of Aerobic Granule from a Sequencing Batch Reactor for Organic Matter and Ammonia Nitrogen Removal. *Int J Environ Res Public Health.* 11(3): 2427–2436.
- 36 Metcalf and Eddy (2003) Wastewater Engineering Treatment and Reuse. Fourth Ed. McGraw-Hill Intl. Ed. New York, NY.
- 37 Meza-Escalante E, Texier AC, Cuervo-López F, Gómez J, Cervantes F (2008) Inhibition of sulfide on the simultaneous removal of nitrate and p-cresol by a denitrifying sludge. *J Chem Technol Biotechnol.* 83: 372–377.
- 38 Mulder A, Van de Graff AA, Robertson LA, Kuenen JG (1995) Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiol Ecol.* 16:177–184.
- 39 Münch EV, Lant PA, Keiler J (1996). Simultaneous nitrification and denitrification in benchscale sequencing batch reactors. *Water Res.* 30: 277–284.

- 40 O'Connor O, Young LY (1996) Effects of six different functional groups and their position on the bacterial metabolism of monosubstituted phenols under anaerobic conditions. *Environ Sci Technol.* 30(5): 1419–1428.
- 41 Paredes D, Kuschik P, Mbwette TSA, Stange F, Müller RA, Köser H (2007) New Aspects of Microbial Nitrogen Transformations in the Context of Wastewater Treatment – A Review. *Eng. Life Sci.* 7, 1:13–25.
- 42 Peng Y, Zhu G (2006) Biological nitrogen removal with nitrification and denitrification via nitrite pathway. *Appl Microbiol Biotechnol.* 73(1):15–26.
- 43 Philips S, Laanbroek HJ, Verstraete W (2002) Origin, causes and effects of increased nitrite concentrations in aquatic environments. *Rev Environ Sci Biotechnol.* 1:115–141.
- 44 Pochana K, Keller J, (1999) Study of factors affecting simultaneous nitrification and denitrification (SND). *Water Sci. Technol.* 39 (6): 61–68.
- 45 Robertson LA, Kuenen JG (1984) Aerobic denitrification: a controversy revived. *Arch Microbiol.* 139:347–354.
- 46 Robertson LA, van Niel EWJ, Torresmans RAM, Kuenen JG (1988) Simultaneous nitrification and denitrification in aerobic chemostat cultures of *Thiosphaera pantotropha*. *Appl Environ Microbiol.* 54, 2812–2818.
- 47 Rudolphi A, Tschech A, Fuchs G (1991) Anaerobic degradation of cresols by denitrifying bacteria. *Archives of Microbiology.* 155: 238–248.
- 48 Sabumon PC (2007) Anaerobic ammonia removal in presence of organic matter: a novel route. *J Hazard Mater.* 149(1):4–59.
- 49 Sierra R, Guerrero F, Rowlette P, Freeman S, Field J (2005) Comparison of chemo-hetero- and mixotrophic denitrification in laboratory-scale UASBs. *Water Sci Technol.* 52(1-2): 337–342.
- 50 Sijbesma WFH, Almeida JS, Reis MAM, Santos H (1996) Uncoupling effect of nitrite during denitrification by *Pseudomonas fluorescens*: an in vivo ³¹P-NMR study. *Biotechnol Bioeng.* 52:176–182
- 51 Schink B, Philipp B, Müller J (2000) Anaerobic degradation of phenolic compounds. *Naturwissenschaften.* 87:12–23.
- 52 Shinoda Y, Sakai Y, Uenishi H, Uchihashi Y, Hiraishi A, Yukawa H, Yurimoto H, Kato N (2004) Aerobic and anaerobic toluene degradation by a newly isolated denitrifying bacterium, *Thauera sp.* strain DNT-1. *Appl Environ Microbiol.* 70:1385–1392.
- 53 Strous M, Heijnen JJ, Kuenen JG, Jetten MSM (1998) The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms. *Appl Microbiol Biotech.* 50 (5):589–596.
- 54 Strous M, Fuerst JA, Kramer EHM, Logemann S, Muyzer G, Van de Pas-Schoonen KT, Webb R, Kuenen JG, Jetten MSM (1999) Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature.* 400 (6743):446–449.
- 55 Tam NFY, Wong YS, Leung G (1992) Effect of exogenous carbon sources on removal of inorganic nutrients by the nitrification denitrification process. *Water Res.* 26:1229–1236.
- 56 Thomsen J, Geest T, Cox R (1994) Mass spectrometric studies of the effect of pH on the accumulation of intermediates in denitrification by *Paracoccus denitrificans*. *Appl Environ Micro.* 60:536–541.
- 57 Torà JA, Baeza JA, Carrera J, Oleszkiewicz JA (2011) Denitrification of a high-strength nitrite wastewater in a sequencing batch reactor using different organic carbon sources. *Chem Eng J.* 172:994–8.
- 58 Turk O, Mavinic DS (1986) Preliminary assesment of a shortcut in nitrogen removal from wastewater. *Can J Civil Eng.* 13:600–605

- 59 Van Dongen U, Jetten MSM, Loosdrecht MCM (2001) The SHARON-Anammox process for treatment of ammonium rich wastewater. *Wat Sci Tech.* 44 (1): 153–160.
- 60 Van de Graaf AA, Mulder P, de Bruijn P, Jetten MSM, Robertson LA, Kuenen JG (1995) Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process. *Appl Environ Microbiol.* 61: 1246–1251
- 61 Van Verseveld HW, Stouthamer AH (1978) Electron-transport chain and coupled oxidative phosphorylation in methanol-grown *Paracoccus denitrificans*. *Arch Microbiol.* 118:13–20
- 62 Wang A, Liu C, Ren N, Han H, Lee D (2010) Simultaneous removal of sulfide, nitrate and acetate: Kinetic modeling. *J Hazard Mater.* 178(1-3):35–41.
- 63 Wöhlbrand L, Wilkes H, Halder T, Rabus R (2008) Anaerobic degradation of p-ethylphenol by *Aromatoleum aromaticum* strain EbN1: pathway, regulation, and involved proteins. *J Bacteriol* 190:5699–5709.
- 64 Zhu G, Peng Y, Li B, Guo J, Yang Q, Wang S (2008) Biological nitrogen removal from wastewater. *Rev Environ Contam Toxicol.* 192:159-195.
- 65 Zumft WG (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol Molec Biol Rev.* 61: 533–561.

3. Justificación

Ciertos tipos de efluentes industriales se caracterizan por contener compuestos nitrogenados (amonio, nitrito y nitrato) y cresoles como contaminantes. Si sus aguas residuales no son tratadas, pueden ocasionar problemas graves al ambiente y al ser humano. En la actualidad, se puede llevar a cabo el tratamiento de estos efluentes a través de trenes de tratamiento que integran más de un proceso biológico en reactores físicamente separados (nitrificación-desnitrificación). Hay indicios que sugieren que se podría eliminar de forma simultánea amonio y compuestos fenólicos, a través de la desnitrificación órgano-litotrófica sin depender de la nitrificación. Bajo este contexto, es de interés evaluar la eliminación de amonio en presencia de compuestos fenólicos en la desnitrificación con nitrato y nitrito. Siendo el *p*-cresol, un compuesto de interés debido a que suele estar presente en las aguas residuales de diversos sectores productivos (químico, alimentario, textil, entre otros), además de que bajo condiciones desnitrificantes no hay muchos estudios y los existentes en la literatura generalmente omiten variables de respuesta como velocidades, eficiencias de consumo y rendimientos de producción que pueden ayudar a entender el comportamiento cinético y los procesos de óxido-reducción cuando se cambia el aceptor de electrones en la desnitrificación. Tomado en cuenta que la adquisición de información más detallada de la desnitrificación bajo condiciones complejas permite la posibilidad de ejercer un mayor control metabólico y hacer mejores propuestas de tratamiento de aguas residuales.

4. Hipótesis

El uso de nitrato o nitrito en la desnitrificación determina el proceso de oxidación del *p*-cresol y amonio, así como sus velocidades de reacción.

5. Objetivos

5.1 GENERAL

Caracterizar cinética y metabólicamente la desnitrificación en presencia de diferentes fuentes reductoras, y proponer mecanismos de control del proceso óxido-reductor.

5.2 ESPECÍFICOS

- I. Evaluar el efecto del amonio y *p*-cresol de forma individual en la desnitrificación utilizando nitrito como aceptor final de electrones.
- II. Evaluar el efecto del nitrito en la desnitrificación órgano-litotrófica, a una relación de *p*-cresol y amonio constante.
- III. Evaluar el efecto de la concentración inicial de *p*-cresol en la desnitrificación organotrófica con nitrito.
- IV. Evaluar la oxidación del *p*-cresol y amonio empleando nitrato como aceptor final de electrones.

6. Metodología

6. METODOLOGÍA

En este apartado se presentan la metodología general en este estudio. De forma adicional y de manera puntual en los apartados 7.2.1, 7.2.2 y 7.2.3 se describen los materiales y métodos específicos.

6.1 OPERACIÓN DEL REACTOR CONTINUO DE TANQUE AGITADO

Para la producción de biomasa necesaria para realizar los estudios en lote en el presente estudio, se utilizó un reactor tipo Bioflo 2000 fermentador (New Brunswick scientific) de 10 L de volumen nominal, con bombas peristálticas (Coleparmer) acopladas para el control del flujo del influente y efluente (Figura 13). El reactor contó con dispositivos para el control de temperatura, de mezclado homogéneo y un sedimentador para la recirculación de la biomasa. El volumen de operación fue de 5 L, la temperatura se mantuvo a $30 \pm 3^\circ\text{C}$ mediante un calentador Termo Haake (mod. B3) que conduce agua a temperatura constante hasta la chaqueta del reactor. La agitación se estableció a 250 rpm, el reactor fue operado sin control de pH y se mantuvo un tiempo de residencia hidráulico (TRH) de 3.2 días. Como inóculo, se utilizó un lodo anaerobio procedente de la planta de tratamiento de aguas residuales de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Antes de inocular el reactor, el lodo se lavó varias veces con una solución isotónica (0.9%) de cloruro de sodio para eliminar residuos. La concentración de biomasa inicial, medida como sólidos suspendidos volátiles (SSV) fue de 4.0 g SSV/L.

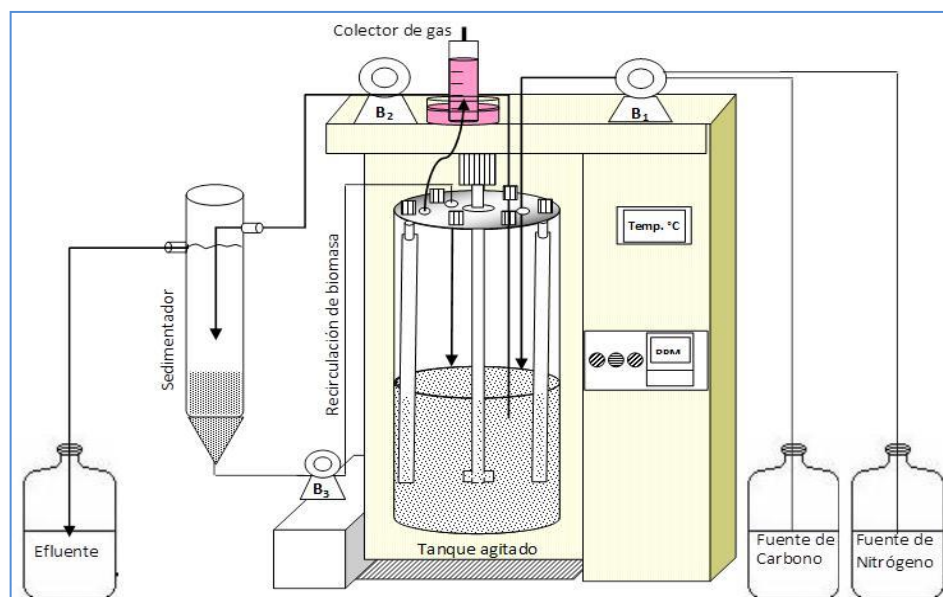


Figura 13 Esquema del reactor continuo de tanque agitado, operado bajo condiciones desnitrificantes. B, bomba peristáltica.

El reactor se operó bajo condiciones desnitrificantes organotróficas alimentado con acetato de sodio como fuente de carbono y nitrato de sodio como aceptor final de electrones. La composición del medio de cultivo se describe en apartado 6.1. La concentración inicial de C-acetato y N-nitrato fue de 428 y 400 mg/L, respectivamente, para tener una relación C/N desasimilativa de 1.07. Una vez alcanzado el régimen estacionario, es decir, cuando la velocidad de producción de N₂ presentó una variación menor que 10%, se incrementó la relación C/N a 2 para favorecer la producción de biomasa. El reactor se operó bajo estas condiciones, hasta alcanzar nuevamente el régimen estacionario, y poder utilizar el lodo para realizar los cultivos en lote.

6.2 MEDIO DE CULTIVO

Para evitar la precipitación de algunos componentes del medio de cultivo se alimentó de forma separada la fuente de carbono de la fuente de nitrógeno. El recipiente de la fuente de nitrógeno, también contenía una solución mineral, necesaria para el buen funcionamiento del proceso desnitrificante, ya que contiene cofactores enzimáticos. En la Tabla 9, se presenta la composición de la solución mineral. De la solución de elementos traza se adicionaba 1.5 mL a cada litro de solución.

Tabla 9 Composición química de la solución mineral

Micronutrientes	g/L
KH ₂ PO ₄	4.5
K ₂ HPO ₄	3.0
Solución de elementos traza	g/L
EDTA	5
CuSO ₄ -5H ₂ O (1.57),	1.57
CaCl ₂ -2H ₂ O	5.54
MnCl ₂	5.0
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ -4H ₂ O	1.1
FeCl ₃	5.0
CoCl ₂ -6H ₂ O	1.6
MgCl ₂ -5H ₂ O	5.0

6.3 CULTIVOS EN LOTE

Los cultivos en lote se realizaron por duplicado en botellas serológicas de 160 mL con un volumen de trabajo de 60 mL y un espacio de cabeza de 100 mL. Se inocularon con una concentración de

biomasa inicial de 2 g SSV/L, proveniente del reactor continuo en régimen estacionario alimentado con acetato y nitrato. A cada botella se le adicionó medio de cultivo (Tabla 9) hasta alcanzar el volumen de trabajo. Las botellas se sellaron con tapones de hule y con arillos metálicos para mantener condiciones herméticas. Para poder cuantificar el nitrógeno molecular producido en los ensayos y garantizar las condiciones anóxicas se utilizó una corriente de helio por diez minutos que desplazó el nitrógeno y oxígeno del espacio de cabeza y del líquido. Las botellas fueron incubadas a 30°C con una agitación de 150 rpm. Cada botella fue una unidad experimental independiente y después de su muestreo se sacrificó.

6.4 EVALUACIÓN DE LOS CULTIVOS

El proceso respiratorio tanto del cultivo continuo, como en lote fueron evaluados a través de las siguientes variables de respuesta: eficiencia de consumo de sustrato (E , %), rendimiento de producto (Y), y las velocidades específicas de consumo de sustrato (q_s) o formación de producto (q_p). En general, estas variables proporcionan información relevante del proceso biológico de forma global (Tabla 10).

Para evaluar el aspecto cinético de los cultivos, se determinaron las velocidades específicas de consumos de sustratos, utilizando el modelo logístico de Gompertz (Acuña *et al.*, 1999), donde la concentración de sustrato consumido y formación de productos, pueden ser expresados como una función de tiempo (x) de acuerdo con la ecuación 16:

$$y = A \exp\left(-\exp(-k(x - x_c))\right) \dots \dots \dots \text{(Ec. 16)}$$

En la cual y se refiere al sustrato residual del cultivo (mg/L), A es la concentración inicial del sustrato (mg/L), k define a la constante cinética (h^{-1}), x es el tiempo y x_c se refiere al tiempo necesario para alcanzar la máxima velocidad de consumo o formación de producto. Los valores de A , k y x_c se ajustaron utilizando los datos experimentales del programa de regresión no lineal OriginPro 8.0 (OriginLab Inc). A partir de la derivación del modelo de Gompertz, se obtuvieron los parámetros cinéticos (A y k) para calcular las velocidades específicas de consumo y producción sus ($q_{max}=0,368 Ak$) (Draper y Smith, 1981).

Tabla 10 Variables de respuesta utilizadas para evaluar el proceso respiratorio desnitrificante

Variable de respuesta	Definición	Unidades
Rendimiento de productos		
Y_{N_2}	$Y_{N_2} = \frac{\text{mg N-N}_2 \text{ producido/L}}{\text{mg N-N}_{\text{total}} \text{ consumido/L}}$	$\frac{\text{mg N-N}_2}{\text{mg N-N}_{\text{total}}}$
$Y_{C-HCO_3^-}$	$Y_{C-HCO_3^-} = \frac{\text{mg C-HCO}_3^- \text{ producido/L}}{\text{mg C-de la fuente carbonada consumida/L}}$	$\frac{\text{mg C-HCO}_3^-}{\text{mg C}}$
Eficiencias de consumo de sustratos		
$E_{N-NO_2^-}$	$E_{N-NO_2^-} = \left(\frac{(\text{mg N-NO}_2^- \text{ inicial/L}) - (\text{mg N-NO}_2^- \text{ final/L})}{\text{mg N-NO}_2^- \text{ inicial/L}} \right) \times 100$	%
$E_{N-NO_3^-}$	$E_{N-NO_3^-} = \left(\frac{(\text{mg N-NO}_3^- \text{ inicial/L}) - (\text{mg N-NO}_3^- \text{ final/L})}{\text{mg N-NO}_3^- \text{ inicial/L}} \right) \times 100$	%
$E_{N-NH_4^+}$	$E_{N-NH_4^+} = \left(\frac{(\text{mg N-NH}_4^+ \text{ inicial/L}) - (\text{mg N-NH}_4^+ \text{ final/L})}{\text{mg N-NH}_4^+ \text{ inicial/L}} \right) \times 100$	%
$E_{C-CH_3COO^-}$	$E_{C-CH_3COO^-} = \left(\frac{(\text{mg C-CH}_3\text{COO}^- \text{ inicial/L}) - (\text{mg C-CH}_3\text{COO}^- \text{ final/L})}{\text{mg C-CH}_3\text{COO}^- \text{ inicial/L}} \right) \times 100$	%
$E_{C-p \text{ Cresol}}$	$E_{C-p \text{ cresol}} = \left(\frac{(\text{mg C-p cresol inicial/L}) - (\text{mg C-p cresol final/L})}{\text{mg C-p cresol inicial/L}} \right) \times 100$	%
Velocidades específicas de producción q_p:		
q_{N_2}	$q_{N_2} = \frac{\text{mg N}_2 \text{ producido/L} \cdot t}{[X]}$	$\frac{\text{mg N-N}_2 \text{ producido}}{\text{g SSV} \cdot t}$
$q_{C-HCO_3^-}$	$q_{C-HCO_3^-} = \frac{\text{mg C-HCO}_3^- \text{ producido/L} \cdot t}{[X]}$	$\frac{\text{mg C-HCO}_3^- \text{ producido}}{\text{g SSV} \cdot t}$
Velocidades específicas de consumo q_s:		
$q_{N-NO_2^-}$	$q_{N-NO_2^-} = \frac{\text{mg N-NO}_2^- \text{ consumido/L} \cdot t}{[X]}$	$\frac{\text{mg N-NO}_2^- \text{ consumido}}{\text{g SSV} \cdot t}$
$q_{N-NO_3^-}$	$q_{N-NO_3^-} = \frac{\text{mg N-NO}_3^- \text{ consumido/L} \cdot t}{[X]}$	$\frac{\text{mg N-NO}_3^- \text{ consumido}}{\text{g SSV} \cdot t}$
$q_{N-NH_4^+}$	$q_{N-NH_4^+} = \frac{\text{mg N-NH}_4^+ \text{ consumido/L} \cdot t}{[X]}$	$\frac{\text{mg N-NH}_4^+ \text{ consumido}}{\text{g SSV} \cdot t}$
$q_{C-p \text{ Cresol}}$	$q_{C-p \text{ Cr}} = \frac{\text{mg C-p Cr consumido/L} \cdot t}{[X]}$	$\frac{\text{mg C-p Cresol consumido}}{\text{g SSV} \cdot t}$

Donde [X] es la biomasa como g SSV/L y t, se refiere al tiempo en horas o días.

sílice fundida de 60 cm de largo y 75 μm de diámetro interno, con un suministro de corriente de 35 μA y un voltaje de 20 KV. Los tiempos de toma de muestra y de corrida fueron de 5 segundos y 5 minutos respectivamente por presión a 20 bars por 0.1 min. Se utilizó un tiempo de 1.5 minutos de purga con NaOH 0.1 M. La absorbancia fue medida con una lámpara de luz ultravioleta a una longitud de onda de 214 nm. El análisis electroforético fue realizado a 25°C, utilizando como electrolito de trabajo una solución de sulfato de sodio, el cual fue preparado de la siguiente forma: A 10 ml de una solución de Na_2SO_4 0.1 M, adicionar 3 ml de la solución comercial OFM anion-BT(Waters), mezclar y aforar a 100 ml con agua desionizada. El electrolito, las muestras y las soluciones estándar de concentración conocida fueron filtradas con una membrana de nylon de 0.45 μm . Pese a la buena reproducibilidad del método, siempre que se analizaron las muestras se construyó una curva de calibración de NO_3^- y NO_2^- en mezcla (Figura 14).

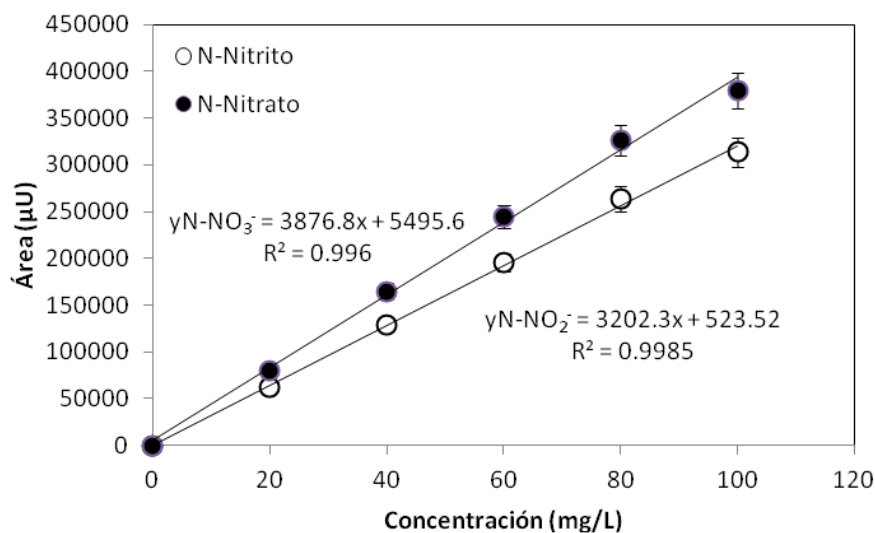


Figura 14 Curva de calibración para la cuantificación de nitrato y nitrito.

6.5.2 Cuantificación de amonio

Se utilizó un electrodo selectivo del ion amonio (Phoenix Electrode Co.). El principio de medición, se basa en desplazar el equilibrio del par $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ en solución acuosa mediante la alcalinización de las muestras. El ion amonio es convertido a amoniaco al alcalinizar las muestras con NaOH. El amoniaco pasa a través de una membrana permeable a amoniaco,

ubicada en el fondo del electrodo. La medición del potencial redox se realizó con un potenciómetro Cole-Parmer bajo agitación constante a temperatura ambiente.

Procedimiento: Se toma un volumen de 50 mL de muestra y se agrega 0.5 mL de NaOH 10N manteniendo una agitación constante de la muestra, se registra el valor en mV del potenciómetro cuando el valor permanece constante. Las mediciones deben realizarse de manera inmediata después de la adición del NaOH para evitar pérdidas de amoníaco por arrastre. Siempre que fue analizada una muestra se construyó una curva de calibración de N-NH₄⁺ en un intervalo de concentraciones adecuado para cada muestra entre 0 y 200 mg/L (Figura 15). El valor del potencial es proporcional al logaritmo de la concentración, cuyo valor puede ser calculado directamente de la ecuación de la recta.

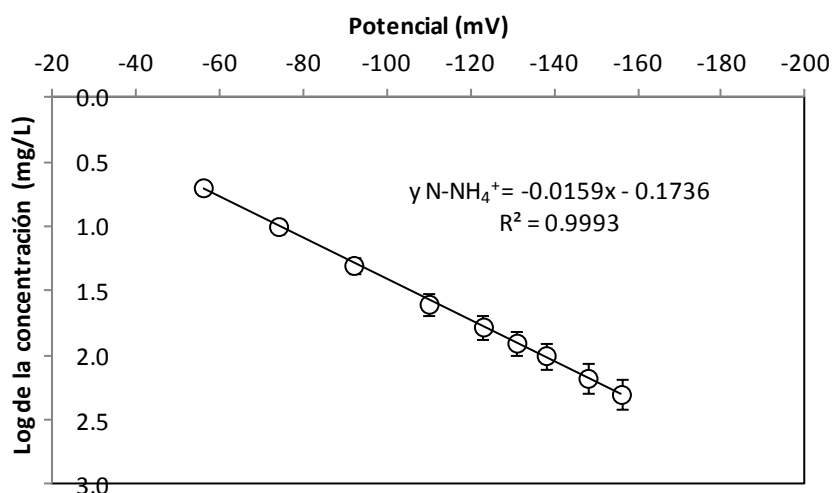


Figura 15 Curva de calibración para la cuantificación de amonio.

6.5.3 Cuantificación del *p*-cresol e intermediarios aromáticos

La concentración de *p*-cresol, *p*-OHbencilalcohol, *p*-OHbenzoato y *p*-OHbenzaldehído, se determinó utilizando cromatografía líquida de alta eficiencia (High performance liquid chromatography, HPLC), utilizando un equipo Perking Elmer (series 200 UV), con una columna C-18 (Phenomenex), acetonitrilo-agua (60:40 v/v) como fase móvil y un flujo de 1.5 mL/min. Los compuestos aromáticos fueron detectados a una longitud de onda de 254 nm. Las muestras previamente se filtraron utilizando una membrana de nylon de 0.45 μm de tamaño de poro. El volumen de inyección fue de 20 μL. Para el análisis de estos compuestos, las

muestras fueron centrifugadas a 8000 rpm durante 5 min y el sobrenadante fue filtrado por una membrana de nylon (0.45 μm). En cada corrida, se pudo medir de forma simultánea los cuatro compuestos aromáticos. Al igual que en los compuestos nitrogenados se realizaron curvas referencia (Figura 16a y 16b).

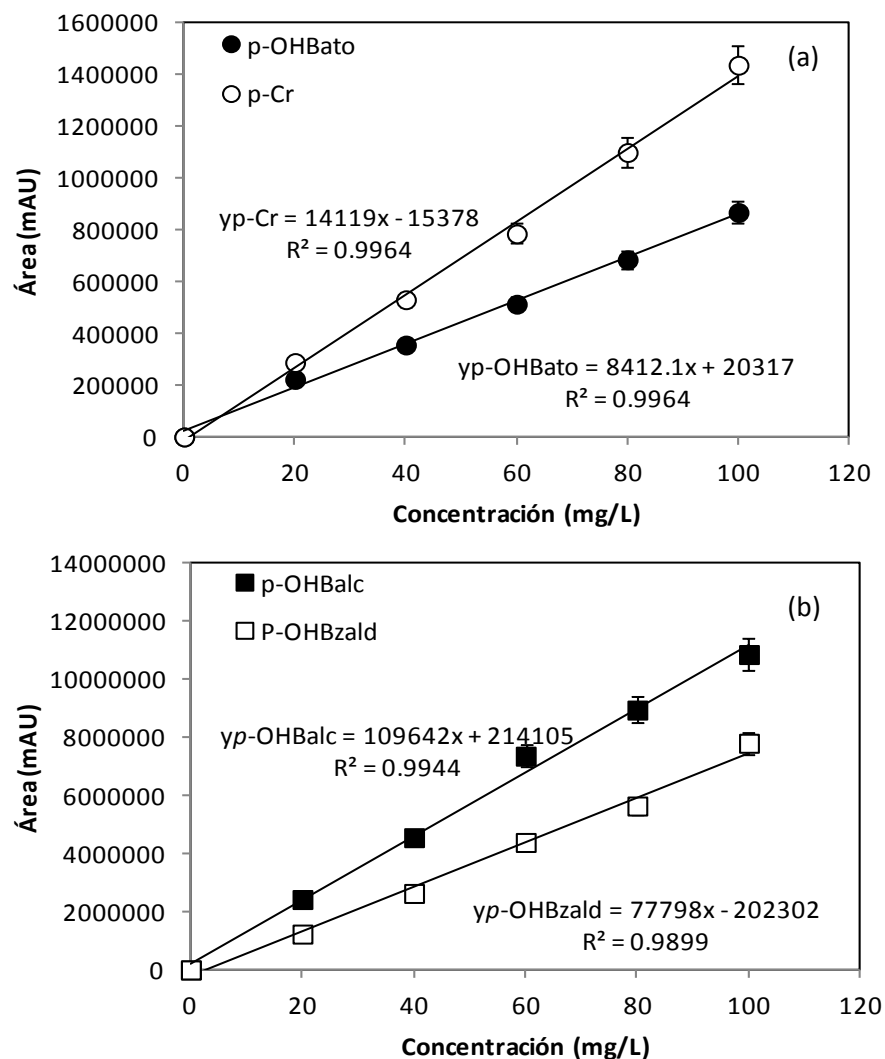


Figura 16 Curvas de calibración de (a) *p*-cresol (*p*-Cr), *p*-hidroxibenzoato (*p*OHBato) y (b) *p*-OHbencicalcohol (*p*OHBalc) y *p*-hidroxibenzaldehído (*p*OHBzald).

6.5.4 Cuantificación de nitrógeno molecular, dióxido de carbono y óxido nitroso

La determinación de los gases se hizo mediante cromatografía de gases (Varian 3350) utilizando un detector de conductividad térmica y un integrador Shimadzu CR501 Chromatopac. Como fase móvil se utilizó helio a un flujo de 16 mL/min, con una columna de

acero de 1.20 m de largo, empacada con Porapak Q malla 80 - 100. Las condiciones de temperatura fueron: para la columna, 50° C; inyector, 100° C; detector, 100° C; filamento, 135° C y un volumen de inyección de 0.2 mL.

En el RCTA se tomó periódicamente la muestra del gas producido y recolectado a través del sistema de recolección de gas. El volumen de gas generado se calculó considerando la presión atmosférica de la ciudad de México (0.8 atm) y la temperatura de operación del reactor (30°C). Se calculó la producción volumétrica de N₂ (mol N₂/L d) y se expresó finalmente en mg/L d.

Para medir los gases en los ensayos en lote se construyó una curva estándar de mg/L vs área, basada en la ecuación de los gases ideales ($n=PV/RT$). Se prepararon una serie de botellas con un volumen de fase gaseosa conocido. Se purgaron con helio y se inyectó una cantidad conocida de N₂, CO₂ conocida (5, 10 mL, etc.) para construir la curva de calibración. En la Figura 17, se muestra la curva de calibración para N₂.

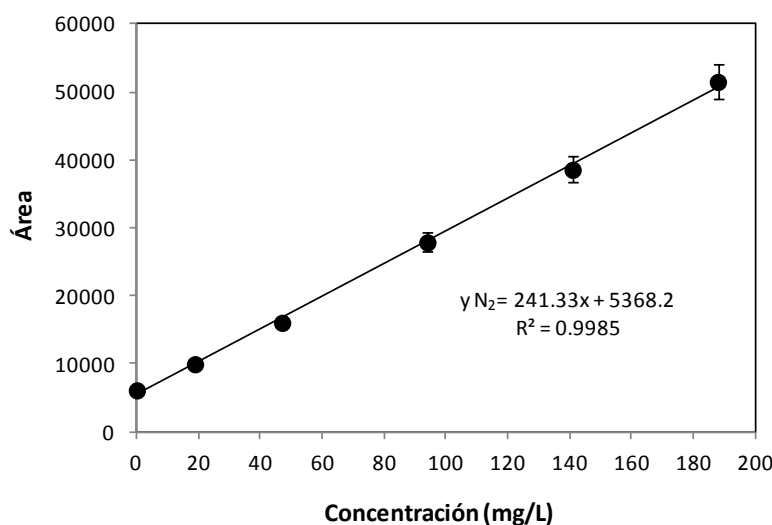


Figura 17 Curva de calibración para la cuantificación de N₂

6.5.5 Cuantificación de acetato

El acetato fue medido por cromatografía de gases (Varian 3400) con un detector de ionización de flama (FID). Se utilizó una columna de acero inoxidable de 1.2 m de longitud empacada con Poropaq Q malla 80-10, el gas acarreador fue N₂ a un flujo de 4 mL/min. Las temperaturas de operación fueron 180, 230, y 250 °C para la columna, inyector y detector respectivamente. Las

muestras fueron previamente filtradas con una membrana de nylon de 0.45 y 0.2 μm de porosidad y posteriormente acidificadas al 5% (V/V) con una solución de HCl al 50%. El volumen de inyección de la muestra fue de 2 μL . En la Figura 18 se muestra una curva estándar de acetato.

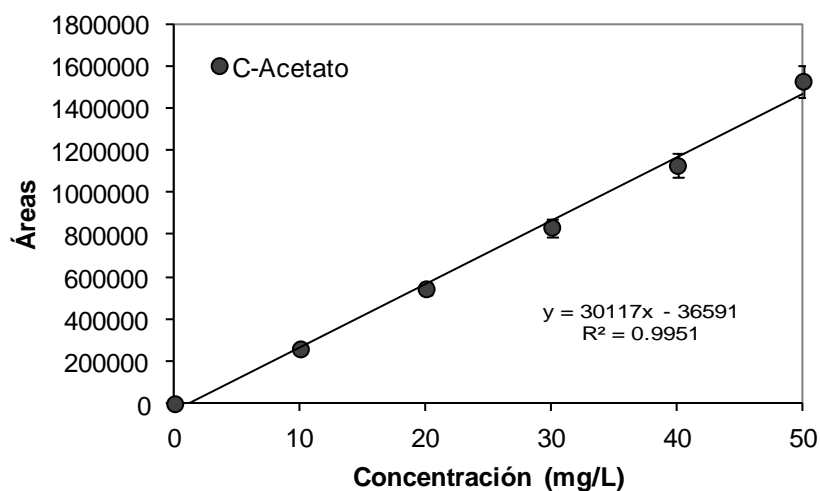


Figura 18 Curva de calibración para la cuantificación de C-acetato.

6.5.6 Carbono orgánico e inorgánico

Los compuestos carbonados en fase líquida, también fueron cuantificados en un analizador de carbono orgánico total (Shimadzu, TOC-5000). El equipo analiza por separado el carbono total y el inorgánico. El sistema cuenta con un inyector que toma la muestra y la envía por medio de una corriente de aire de alta pureza, a un tubo de combustión que tiene una temperatura de 680^o C. En el tubo de combustión el carbono es oxidado a CO₂ y transportado a un vaso de reacción de carbono inorgánico. Posteriormente, es secado y enfriado por medio de un deshumificador, para finalmente pasar a un celda con un analizador de infrarrojo de gas, donde el CO₂ es detectado. El CO₂ cuantificado genera como señal un pico, cuya área es calculada por un procesador de datos. El área obtenida es proporcional a la concentración de carbono en la muestra y calculada con base en una curva de calibración elaborada previamente. Las muestras y los estándares se filtran por una membrana de 0.45 μm antes de ser analizados. Las curvas estándares para este análisis, se preparan haciendo diluciones con una solución concentrada de aftalato de potasio (1000

mg/L). En la Figura 19, se muestra una curva estándar de carbono total e inorgánico diferentes concentraciones.

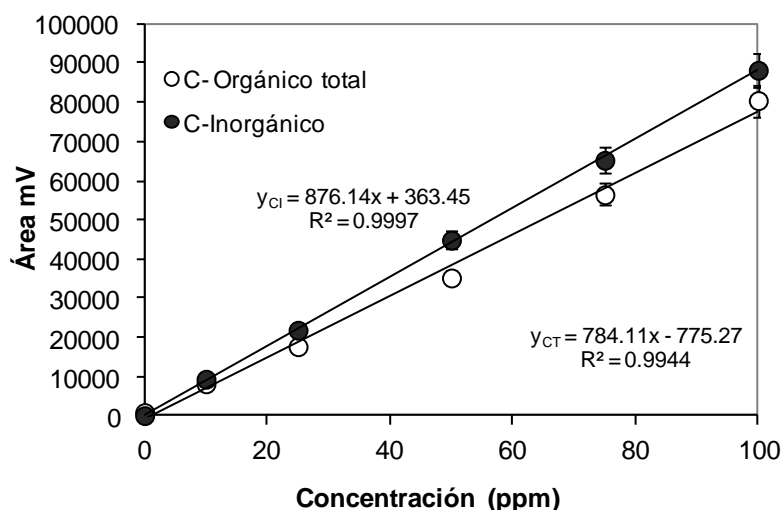


Figura 19 Curva de calibración para la determinación de carbono total e inorgánico.

6.5.7 Cuantificación de sólidos suspendidos volátiles (SSV)

Este parámetro se determinó siguiendo el método establecido por APHA/AWWA/WEF (2005). Para la determinación de los sólidos suspendidos volátiles, se puso a peso constante los crisoles a 100 °C al menos por 4 horas. Se tomó una muestra homogénea de 10 mL (por duplicado), se evaporó el líquido de la muestra en el crisol en una parrilla a baja temperatura, para evitar ebullición y pérdidas. Las muestras con líquidos evaporados se secaron en una estufa a 105°C por una hora, y posteriormente se colocaron en un desecador por 15 minutos. Se pesaron en una balanza analítica y se obtuvo el peso de sólidos suspendidos totales (SST). Posteriormente se colocaron los crisoles con la muestra seca por 45 minutos en una mufla a 550°C y fueron desecados por 15 minutos, para posteriormente obtener el peso de los sólidos suspendidos fijos (SSF). Y con los pesos anteriores se calculó la concentración de SSV de la siguiente manera, donde A es el peso constante del crisol:

$$\frac{g \text{ SSV}}{L} = \frac{(SST - A) - (SSF - A)}{\text{Volumen de la muestra}} \dots \dots \dots (Ec. 18)$$

Para verificar la reproducibilidad y linealidad de los métodos analíticos utilizados en esta tesis, se realizaron al menos cinco curvas de calibración para cada técnica analítica. En la Tabla 11, se

muestran los promedios de las pendientes de cada uno de los diferentes métodos analíticos utilizados para la determinación de los diferentes compuestos evaluados, sus desviaciones estándar, los coeficientes de correlación (R^2) y el coeficiente de variación (CV). Todos los métodos presentaron un CV menor al 7%, lo cual indicó una aceptable reproducibilidad, mientras que los R^2 fueron mayores a 0.992, demostrando una respuesta lineal de los métodos.

Tabla 11 Métodos analíticos utilizados para la determinación de diferentes compuestos carbonados y nitrogenados. Con su respectivos coeficientes de correlación y de variación.

Compuesto	Método analítico	Promedio	Desviación estándar	Coefficiente de correlación (R^2)	% Coeficiente de variación (C.V.)
Nitrato	CIA	3806.5	148.2	0.9967±0.0006	3.89
Nitrito	CIA	3246.6	139.7	0.998±0.001	4.30
Amonio	Electrodo selectivo	0.01693	0.00049	0.9972±0.0009	2.92
N ₂	CG-DCT	237.4	7.89	0.992±0.008	3.32
CO ₂	CG-DCT	3588	8.45	0.9942±0.05	2.78
p-Cr	HPLC	14249.5	184.5	0.9975±0.001	1.29
p-Bcalc	HPLC	108723	1299.6	0.9968±0.003	1.19
p-OHBcald	HPLC	76244	1388.7	0.9939±0.001	1.82
p-OHBato	HPLC	8434.7	32.0	0.9962±0.0002	0.37
C-Total	TOC	784.1	2.8	0.9994±0.006	0.32
C-Inorgánico	TOC	876.1	1.3	0.9997±0.007	0.96
Acetato	CG-FID	31205.2	2554.2	0.995±0.007	6.2

6.6 BIBLIOGRAFÍA.

1. Acuña ME, Pérez F, Auria R, Revah S (1999) Microbiological and kinetic aspects of a biofilter for the removal of toluene from waste gases. *Biotechnol Bioeng.* 63(2):175-184.
2. APHA/AWWA/WEF (2005) Standard Methods for the examination of water and wastewater, Washington DC, USA.

3. Buitrón G, Schoeb ME, Moreno-Andrade I, Moreno JA (2005) Evaluation of Two Control Strategies for a Sequencing Batch Reactor Degrading High Concentration Peaks of 4 -chlorophenol. *Water Resch* 39: 1015-1024.
4. Draper NR, Smil H (1981) Applied regression Analysis. 2da edición. Editorial: Reverté. Apéndice G. AP-13.
5. Gòdia Casablanca (2000) Cinética microbiana. En Ingeniería Bioquímica. Godíá Casablanca F, López Santín (Eds). Editorial: Síntesis, Madrid, España. Cap. 4.
6. López Santín J (2000) Cinética enzimática. En Ingeniería Bioquímica. Godíá Casablanca F, López Santín (Eds). Editorial: Síntesis, Madrid, España. Cap. 3.

7. Resultados y Discusión

PREFACIO DE RESULTADOS

Esta tesis doctoral versa sobre la eliminación de amonio y *p*-cresol en presencia de nitrato o nitrito como aceptores terminales de electrones, en cultivos en lote. El estudio está dividido en cuatro partes principales; en la primera parte se presenta la obtención de un cultivo fisiológicamente estable empleando un reactor de tanque agitado bajo condiciones desnitrificantes, donde se promovió el anabolismo para poder llevar a cabo los ensayos en lote (Sección 7.1). En la segunda parte se dedicó a la evaluación del nitrito como poder oxidante del amonio y *p*-cresol, tanto de forma individual como en mezcla. El lodo desnitrificante mostró la capacidad metabólica para oxidar el amonio y/o *p*-cresol, pero a diferente velocidad específica, lo cual podría estar asociado con las constantes de afinidad de los sustratos. Al adicionar el *p*-cresol se observó una fase lag de los compuestos nitrogenados, y una disminución en las eficiencias de consumo y rendimientos (Sección 7.2.1). En la tercera parte, el objetivo fue estudiar la conducta cinética del lodo desnitrificante a diferentes concentraciones de *p*-cresol, en presencia de nitrito. El incremento de las concentraciones iniciales de *p*-cresol evaluadas provocó una disminución en las velocidades específicas de consumo de nitrito. El perfil cinético se ajustó al modelo de Haldane, inhibición por sustrato, para determinar la constante de inhibición (k_i), de afinidad del *p*-cresol (k_s), así como la velocidad específica máxima de consumo del nitrito (q_{max}) [Sección 7.2.2]. Finalmente se llevó a cabo la oxidación de amonio y *p*-cresol en presencia de nitrato, a una C/N de 0.38 mg C/mg N con el propósito de promover la acumulación transitoria del nitrito. Inicialmente el amonio no se consumió, ya que la oxidación del *p*-cresol se acopló a la reducción de nitrato, formando transitoriamente nitrito, el cual posteriormente se empleó para la oxidación del amonio a N_2 . Este trabajo también permitió identificar parcialmente un posible intermediario de la oxidación del *p*-cresol, que afectó el consumo temporal de los sustratos (Sección 7.2.3).

7.1 CULTIVO CONTINUO

7.1.1 Reactor operado en continuo bajo condiciones desnitrificantes

El reactor se operó con la finalidad de tener una fuente de inóculo metabólicamente estable, para los estudios en lote. Un consorcio metabólicamente estable minimiza las posibles variaciones debido a cambios en el metabolismo propio del consorcio, además de conclusiones más claras de las variables en estudio y no influenciadas por la variabilidad metabólica de la microflora. Por lo tanto, el reactor se operó en dos etapas, modificando la relación C/N de 1.07 a 2.

En la primera etapa, el reactor se operó a una velocidad de carga de 120 mg N-NO₃⁻/L d, y 131 mg COT/L d (Tabla 12). El régimen estacionario se definió en función de dos criterios; el TRH (mínimo 5 veces su valor) y una velocidad de producción de N₂ estable. Se eligió al N₂ como variable de respuesta principal del proceso desnitrificante.

Tabla 12 Parámetros de operación en el reactor desnitrificante operado en continuo

Parámetro	Unidades (mg/L d)	
	Etapla I	Etapla II
N-NO ₃ ⁻ _{inf}	120 ± 7.2	126 ± 1.0
N-NH ₄ ⁺ _{inf}	NA	21 ± 0.9
N-NO ₃ ⁻ _{efl}	6 ± 3.8	2 ± 3.9
N-NH ₄ ⁺ _{efl}	NA	5 ± 2.9
N-NO ₂ ⁻ _{efl}	ND	ND
N-N ₂ _{efl}	102 ± 2.6	123 ± 6.9
N-biomasa*	ND	17 ± 4.2
Recuperación N (%)	89	100
COT _{inf}	131 ± 2.4	252 ± 4.3
CIT _{efl}	107 ± 3.0	137 ± 5.6
COT _{efl}	15 ± 3.9	28 ± 4.2
C- biomasa*	ND	86 ± 21.0
Recuperación C (%)	94	100

*La concentración de biomasa inicial medida como SSV fue de 4.0±0.2g SSV/L.

Alrededor del día 10, se alcanzó una velocidad de producción de N_2 de 100 mg /L d, con un coeficiente de variación menor que 10% (Figura 20), lo cual indicó un régimen estacionario desnitrificante. Durante este régimen, las eficiencias de consumo para nitrato y materia orgánica fueron de 95 y 85%, respectivamente (Tabla 13). El nitrato fue recuperado principalmente como nitrógeno molecular, con un rendimiento desnitrificante de $0.9 \text{ mg } N_2 / \text{mg } N_{\text{total consumido}}$. En el régimen estacionario, el rendimiento desnitrificante también mantuvo un coeficiente de variación menor al 10%. El rendimiento es un reflejo del metabolismo, por tanto, se puede decir, que en el estado estacionario, el lodo está metabólicamente estable. Por otro lado, el nitrato consumido se acopló a la oxidación de la materia orgánica, teniendo como principal producto de la oxidación, el CO_2 , que por especiación química en función del pH (9 ± 3) se identifica y cuantifica como HCO_3^- . El rendimiento de bicarbonato obtenido en el régimen estacionario fue de $0.97 \text{ mg C-}HCO_3^- / \text{mg C-}CH_3COO^-$ consumido. En el reactor no se detectó un cambio en la concentración celular (Tabla 13), ni en el efluente se detectaron sólidos suspendidos volátiles (por el método analítico usado); indicadores de crecimiento microbiano. Los resultados experimentales indicaron que a la C/N 1.07 el metabolismo fue principalmente catabólico.

Tabla 13 Variables de respuesta en el régimen estacionario desnitrificante

Variable	ETAPA I C/N 1.07	ETAPA II C/N 2	Unidades
$E_{N-NO_3^-}$	95 ± 2.8	98 ± 3.0	%
$q_{N-NH_4^+}$	85 ± 2.9	88 ± 2.5	%
$E_{C-CH_3COO^-}$	93 ± 3.1	76 ± 6.4	%
Y_{N_2}	0.90 ± 0.09	0.91 ± 0.07	-
$Y_{C-HCO_3^-}$	0.97 ± 0.03	0.62 ± 0.08	-
$Y_{C-biomasa}$	-	0.34 ± 0.03	-

En la segunda etapa, se incrementó la relación C/N a un valor de 2, aumentando la concentración de la materia orgánica. La etapa II, se inició aproximadamente en el día 250, alcanzando rápidamente el régimen estacionario, con una velocidad de producción de N_2 de 128 mg/L d. En estas últimas condiciones, las eficiencias de consumo de nitrato y acetato fueron de 98 y 88%, respectivamente, siendo los productos principales de la óxido-reducción, N_2 y HCO_3^- . El rendimiento desnitrificante fue de $0.91 \text{ mg } N_2 / \text{mg } N_{\text{total consumido}}$, mientras que el

rendimiento de mineralización de la materia orgánica, fue de 0.62 mg C-HCO₃⁻/ mg C-CH₃COO⁻ consumido. El incremento de la C/N no modificó las eficiencias de consumo de los sustratos; sin embargo, el metabolismo si se vio afectado, principalmente el relacionado al compuesto orgánico, ya que el rendimiento de mineralización disminuyó en un 36%, con respecto a la primera etapa. Esta disminución se debió a que parte del carbono se utilizó por la ruta anabólica, ya que se obtuvo una producción de biomasa de 86 mg C-SSV/L d.

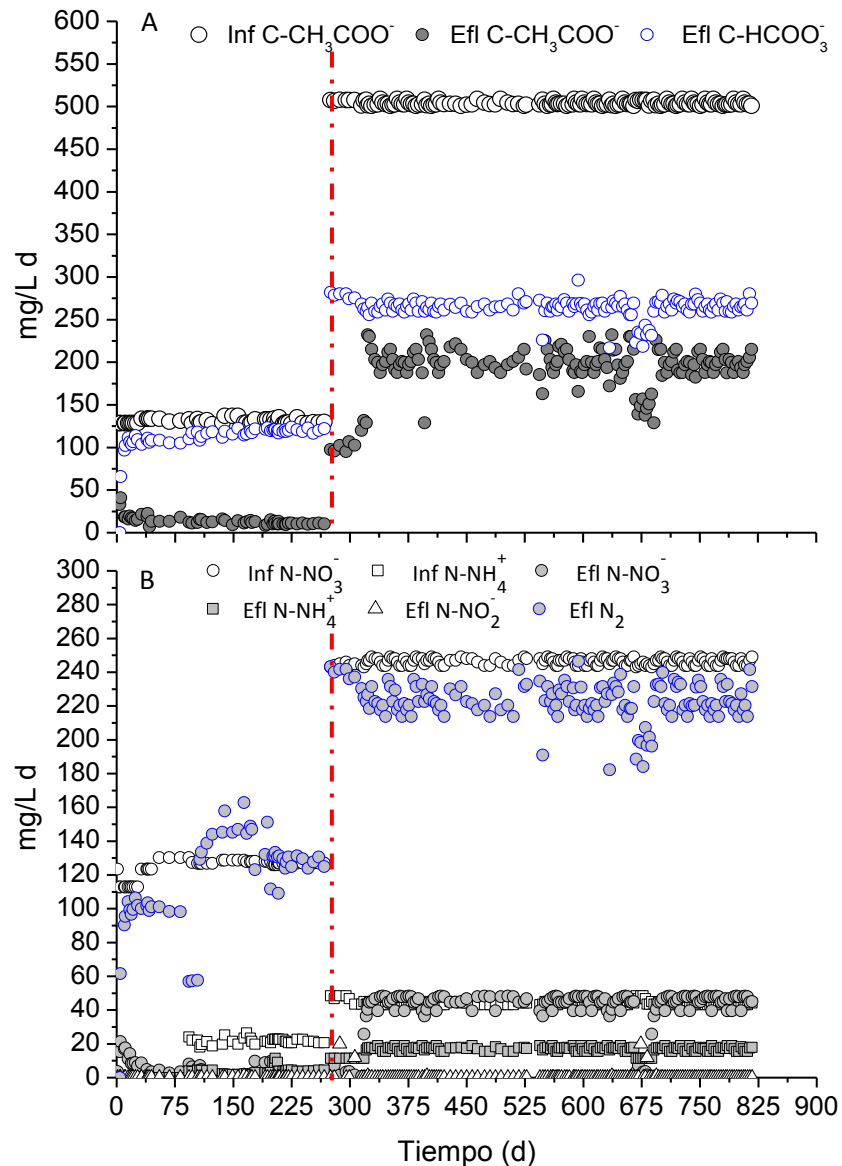


Fig. 20 Perfil del reactor desnitrificante operado en continuo. A) Compuestos carbonados y B) Compuestos Nitrogenados. La línea roja discontinua (- - -) indica el final de la etapa I (C/N 1.07) y el inicio de la etapa II (C/N 2).

El incremento de la relación C/N mejoró el crecimiento celular necesario para disponer con biomasa suficiente para los estudios en lote. Es importante mencionar que los estudios en lote se realizaron tomando muestra de lodo durante el régimen estacionario, y en estas condiciones el lodo siempre estuvo metabólicamente estable.

7.2 Cultivos en lote

7.2.1 OXIDACIÓN SIMULTÁNEA DE AMONIO Y *P*-CRESOL ACOPLADO A LA REDUCCIÓN DE NITRITO, EMPLEANDO UN LODO DESNITRIFICANTE.



Simultaneous oxidation of ammonium and *p*-cresol linked to nitrite reduction by denitrifying sludge

G. González-Blanco^a, R. Beristain-Cardoso^a, F. Cuervo-López^a, F.J. Cervantes^{b,c}, J. Gómez^{a,*}

^aDepartamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, DF, Mexico

^bDivisión de Ciencias Ambientales, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT), San Luis Potosí, Mexico

^cNorwegian University of Science and Technology (NTNU), Department of Biotechnology, 7491 Trondheim, Norway

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 July 2011

Received in revised form 18 September 2011

Accepted 20 September 2011

Available online 29 September 2011

Keywords:

Ammonium

p-Cresol

Oxidation

Litho-organotrophic

ABSTRACT

The metabolic capability of denitrifying sludge to oxidize ammonium and *p*-cresol was evaluated in batch cultures. Ammonium oxidation was studied in presence of nitrite and/or *p*-cresol by 55 h. At 50 mg/L NH₄⁺-N and 76 mg/L NO₂⁻-N, the substrates were consumed at 100% and 95%, respectively, being N₂ the product. At 50 mg/L NH₄⁺-N and 133 mg/L NO₂⁻-N, the consumption efficiencies decreased to 96% and 70%, respectively. The increase in nitrite concentration affected the ammonium oxidation rate. Nonetheless, the N₂ production rate did not change. In organotrophic denitrification, the *p*-cresol oxidation rate was slower than ammonium oxidation. In litho-organotrophic cultures, the *p*-cresol and ammonium oxidation rates were affected at 133 mg/L NO₂⁻-N. Nonetheless, at 76 mg/L NO₂⁻-N the denitrifying sludge oxidized ammonium and *p*-cresol, but at different rate. Finally, this is the first work reporting the simultaneous oxidation of ammonium and *p*-cresol with the production of N₂ from denitrifying sludge.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

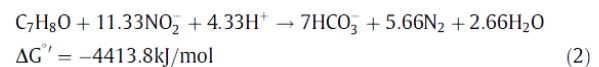
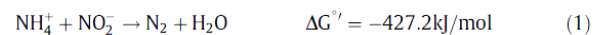
1. Introduction

The major pollutants in wastewaters industrials are nitrogen and carbon aromatic compounds, without excluding other pollutants. For example, the three isomeric forms of cresol are used individually or in mixtures as disinfectants, preservatives, and solvents or as intermediates in the production of antioxidants, fragrances, herbicides, insecticides, dyes, and explosives (Sanders et al., 2009). Specifically the phenolic compound, 4-methylphenol (*p*-cresol), is a natural product present in crude oil, foods, and is also detected in animal and human urine (Yan et al., 2005). The *p*-cresol exposition or ingestion can cause: (1) at high concentration, death (Monma-Ohtaki et al., 2002), (2) hepatotoxicity (Kamijo et al., 2003) and (3) the *p*-cresol in the human body is conjugated, with *p*-cresylsulphate as the main metabolite, the last cause toxic effects such as uremia (Schepers et al., 2007). Hence, it is of utmost importance to diminish the phenolic compound level in industrial effluents to tolerant limits prior to being released into the environment (Banerjee and Ghoshal, 2010). On the other hand, nitrogen compounds are usually found as ammonium, nitrite and nitrate. Ecological and toxicological effects caused by these compounds can give rise to major environmental problems to name a few: water acidification, can deplete dissolved oxygen levels in receiving waters, eutrophication

and can reach toxic levels for human beings and affect the suitability of wastewater for reuse (Wolfe and Patz, 2002; Smith, 2003; Camargo and Alonso, 2006).

Literature frequently mentions the nitrite inhibitory effect towards bacteria and aquatic life. Usually the presence of nitrite is undesired in wastewater treatment. However, some recent biological processes use mainly nitrite as an intermediate (Philips et al., 2002) as the anaerobic ammonium oxidation (Anammox), single reactor high activity ammonia removal over nitrite (Sharon) and oxygen limited autotrophic nitrification denitrification (Oland) processes (Van de Graaf et al., 1996; Jetten et al., 1998; Hellings et al., 1998; Kuai and Verstraete, 1998).

Nitrite is an intermediate in different oxidative or reductive biochemical pathways that occur in water or soil: nitrification, denitrification, dissimilatory nitrate reduction to ammonium and Anammox processes (Fig. 1). Nitrite nitrogen has an oxidation state of +3, which allows it acting as donor or electron acceptor. Nonetheless, the thermodynamics of biological process which involves the nitrite could change in function of energy source, as can be seen in next equations:



* Corresponding author.

E-mail address: dani@xanum.uam.mx (J. Gómez).

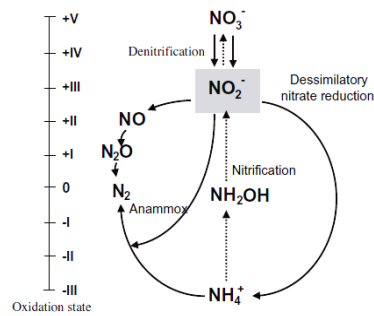
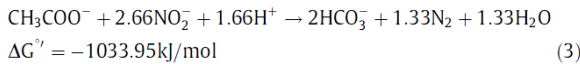


Fig. 1. Oxide-reduction state of nitrogen cycle (modified of Codispoti et al., 2001).



According to these reactions, using a chemical structure complex, like *p*-cresol, the reaction is more exergonic in regarding to ammonium or acetate. For instance, the low ΔG° value for the ammonium oxidation with nitrite (Eq. 1), it is possible to predict that the ATP production will be low. Thus, the growth of the ammonium oxidizing bacteria will be also very low, because cellular biosynthesis is limited by the energy availability.

On the other hand, under anoxic conditions, Anammox bacteria oxidize ammonium to molecular nitrogen whereas nitrite is the electron acceptor and carbon dioxide is used for growth (Molinuevo et al., 2009). The metabolic versatility of Anammox bacteria has been showed, since this microflora can also oxidize organic matter like acetic and propionic acid and this metabolic versatility might improve the Anammox process for energy generation (Kartal et al., 2007, 2010). Nonetheless, high concentration of organic matter can negatively affect the Anammox process (Dapena-Mora et al., 2007). Many of the ammonium containing wastewaters also contained organic matter, thus utilization of autotrophic Anammox process would not be suitable in such cases. There are authors that suggest that the coexistence of Anammox and denitrification might allow the simultaneous removal of ammonium in presence of simple organic matter (Kartal et al., 2007). Organotrophic denitrification is

able to use a wide variety of organic compounds, such as toluene and phenolic compounds as carbon and energy source (Beristain-Cardoso et al., 2009a). Nitrite is an unusual compound in wastewater, but it can be coming from nitrate partial reduction due to the presence of phenolic compounds, like *p*-cresol or phenol (Meza-Escalante et al., 2008; Beristain-Cardoso et al., 2009b). The transitory nitrite formation from organotrophic denitrification might be a good strategy for ammonium oxidation. There are information in the literature that the denitrifying process can simultaneously remove ammonium and acetate or ammonium, acetate and sulfide in a single reactor without previous adaptation to Anammox conditions (Cervantes et al., 1999, 2001; Beristain-Cardoso et al., 2011).

It is important to note that there is no work reporting the simultaneous oxidation of ammonium and phenolic compounds from denitrifying sludge. Nowadays, the oxidation of ammonium and the mineralization of phenolic compounds require different types of reactors connected in series. The use of one only bioreactor for wastewater treatment will be a feasible process. The purpose of this research was to evaluate the metabolic capability of denitrifying sludge for ammonium oxidation with nitrite either in presence or absence of *p*-cresol. This research might be crucial because the real wastewaters are highly heterogeneous and several of them have high phenolic compound concentrations.

2. Methods

2.1. Inoculum and culture medium composition

The denitrifying sludge used for the batch experiments was produced in a 5.0 L continuous stirrer tank reactor (CSTR) operated at 30 ± 0.2 °C, pH 9.3 ± 0.2 with a hydraulic retention time of 3.2 d. The basal mineral medium was composed of (g/L): K₂HPO₄ (4.5), KH₂PO₄ (3.0), and trace elements solution supplied at 1.5 ml/L. The trace element solution contained (g/L): EDTA (5), CuSO₄·5H₂O (1.57), CaCl₂·2H₂O (5.54), MnCl₂ (5.0), (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O (1.1), FeCl₃ (05.0), CoCl₂·6H₂O (1.6), MgCl₂ (5.0). The CSTR was fed with the following loading rates (mg/L d): 128 of NO₃⁻-N, 258 of acetate-C and 22 of NH₄⁺-N. In denitrifying steady state the consumption efficiencies for nitrate, acetate and ammonium were 100%, 76% and 89%, respectively, being the main products N₂ and

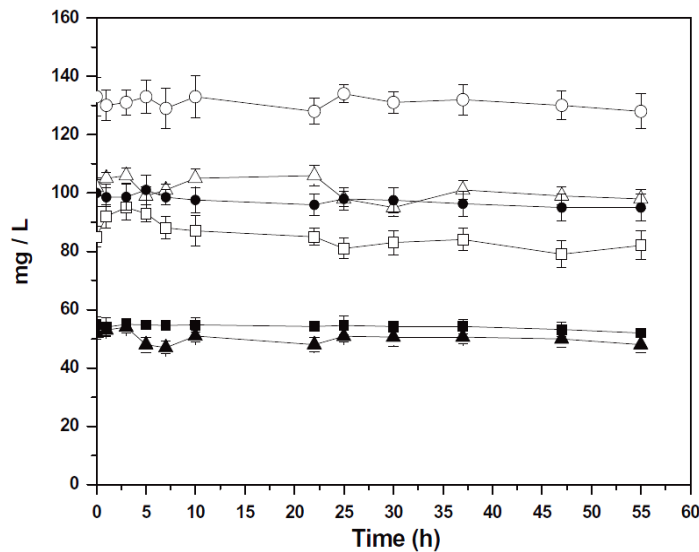


Fig. 2. Control assays. Abiotic: (○) NO₂⁻-N, (Δ) NH₄⁺-N, (□) *p*-cresol-C. Biotic: (●) NO₂⁻-N, (▲) NH₄⁺-N, (■) *p*-cresol-C.

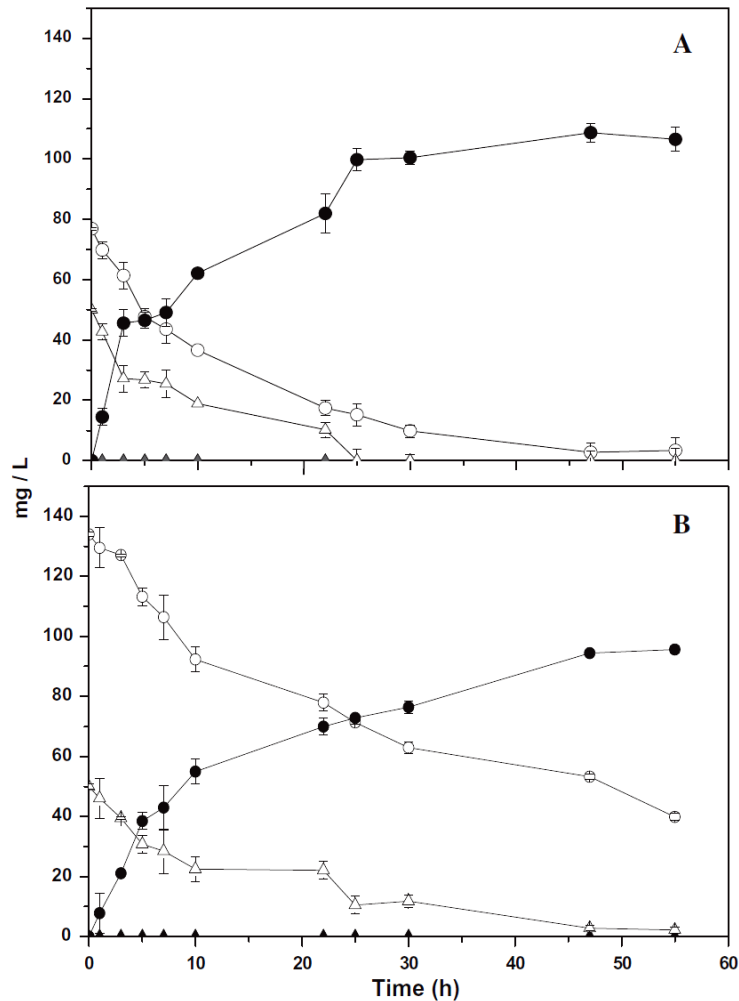


Fig. 3. Time course of ammonium oxidation and N₂ production by denitrifying sludge, in batch lithotrophic cultures. (A) At 76 mg/L NO₂⁻-N and (B) at 133 mg/L NO₂⁻-N; (○) NO₂⁻-N, (△) NH₄⁺-N, (▲) NO₃⁻-N, (●) N₂.

HCO₃⁻, with yields of 1.01 ± 0.04 mg N₂/mg N consumed and 0.67 ± 0.03 mg HCO₃⁻-C/mg C consumed, respectively. The denitrifying sludge used for inoculating the batch cultures was always produced under these culture conditions. Sludge samples taken from the CSTR were washed twice with isotonic saline solution 0.9% (w/v) before using as inoculum in the batch cultures.

2.2. Batch cultures

Batch cultures were conducted in 160 mL serological bottles containing 60 mL of mineral medium, with the same culture medium and environmental conditions above pointed out. The headspace was flushed during 10 min with helium/CO₂ mixture (80/20, v/v) to exclude oxygen from the assays. All bottles were sealed with butyl rubber stoppers and aluminum crimp seals. Separate bottles were set up for gas phase measurements of N₂. Abiotic controls lacking inoculum were run in parallel to monitor the possible abiotic elimination of the substrates. Biotic controls lacking nitrite, ammonium or *p*-cresol were also included to correct for compound losses not associated with denitrification. All assays either abiotic or biotic were carried out by duplicate in an orbital shaker

(200 rpm). For lithotrophic denitrification (ammonium oxidation by nitrite) the bottles were spiked with 50 mg/L NH₄⁺-N and 76 or 133 mg/L NO₂⁻-N. For organotrophic denitrification it was spiked with 50 mg/L *p*-cresol-C and 94 mg/L NO₂⁻-N. Whereas, for litho-organotrophic assays the bottles were spiked with 43 mg/L *p*-cresol-C, 50 mg/L NH₄⁺-N and 76 or 133 mg/L NO₂⁻-N. The batch cultures were inoculated with 2.0 ± 0.2 g VSS/L of the denitrifying sludge produced in continuous culture. The initial and final pH for all batch cultures was of 7.0 ± 0.5 . Microbial activity was evaluated in terms of consumption efficiency (E , [g of N or C consumed/g of N or C fed] × 100), production yield (Y , [g of N or C produced/g of N or C consumed]) and a specific consumption rate (q , [mg of substrate or product/g VSS d]).

2.3. Kinetic data

The kinetic parameters such as the specific rates were calculated using the Gompertz model. In this logistic Gompertz model the consumed substrate concentration, y , may be expressed as a function of time according to the following equation:

$$y = A \exp(-\exp(-k(X - X_c)))$$

$y = (S_0 - S)$; initial substrate (S_0 ; mg/L), final substrate (S ; mg/L), the initial concentration of substrate (A ; mg/L), necessary time to reach the maximum consumption rate [$(X_c) h$], and the kinetic constant [$k h^{-1}$]. The values A , k and X_c were fitted from experimental data using a non-linear regression program (OriginPro 8.0). From the derivation of the Gompertz model, kinetic parameters were used to calculate the specific rates [$q = 0.368 Ak/(gVSS/L)$]. This mathematical model applies either substrate consumption or product formation. The coefficient of determination was higher than 0.95 for all cases.

2.4. Analytical methods

Nitrate and nitrite were determined by ion chromatography (Beckman Coulter, proteomeLab PA 800). The buffer was prepared with 5 mL of Na_2SO_4 (0.1 M), NaCl (10 mM) and a commercial solution CIA Pak OFM anion-BT (Waters) plus 35 mL of deionizer water. A microcapillary of melted silica (60 cm long and 75 μ m internal diameter) was used. The absorbance was measured in the ultraviolet region using a mercury lamp at 254 nm and 25 °C. Ammonium was determined by selective ammonium electrode (pHoenix electrode Co. Mod. NH331501). The *p*-cresol was analyzed by HPLC with a C-18 reverse-phase column (Sigma-Aldrich, USA), column size 300 \times 3.90 mm. A mixture of acetonitrile/deionized water (60:40, v/v) was used as the solvent and the flow rate was maintained at 1.5 ml/min (Perkin Elmer Series 200, USA). The soluble inorganic carbon was measured using a TOC analyzer (TOC-5000, Shimadzu). N_2 , N_2O and CO_2 were measured by gas chromatography (Varian 3350) with a thermal conductivity detector. Helium was used as mobile phase with a flow of 16 ml/min. The stainless steel column (Porapak Q mesh 100-80) was of 1.20 m long and 1/8" diameter. The temperatures were 50 °C for the column and 100 °C for the detector and the injection port.

The volatile suspended solids (VSS) were determined according to standard methods for the examination of water and wastewater (APHA/AWWA/WEF, 2005).

3. Results and discussion

3.1. Control cultures

Abiotic cultures showed no chemical reactions between ammonium, nitrite and *p*-cresol. Biotic cultures were carried out to determine the extent of contribution of the possible endogenous metabolism during the ammonium and *p*-cresol oxidation, as well as in the nitrite reduction. All control batch cultures were incubated for 55 h. In the biotic control with ammonium and *p*-cresol and lacking nitrite, only 3.0% of initial substrate concentration was consumed. In the biotic control with nitrite and lacking electron donors, the initial nitrite concentration consumed was around 5% (Fig. 2). These tests indicated that ammonium and *p*-cresol oxidation and nitrite reduction were consumed via biological process.

3.2. Lithotrophic denitrification: ammonium oxidation by nitrite

In batch cultures spiked with 50 mg/L NH_4^+ -N and 76 mg/L NO_2^- -N or 133 mg/L NO_2^- -N was evaluated the kinetics of ammonium oxidation from denitrifying sludge physiologically stable. Fig. 3A and B shows the time course of consumption and production of nitrogen compounds. In both initial nitrite concentrations tested, the ammonium oxidation was linked to nitrite reduction, being the main product, N_2 . The consumption efficiency for ammonium was 100%, nonetheless, either the nitrite consumption efficiency or denitrifying yield diminished at 26% and 12.5%, respectively, due to the increasing of nitrite concentration from 76 to 133 mg/L NO_2^- -N (Table 1). The increasing of initial

Table 1
Efficiencies of ammonium, nitrite and *p*-cresol consumption, and yields obtained in batch cultures inoculated with a denitrifying sludge.

Initial substrate concentration (mg/L)	Efficiency of NH_4^+ -N consumption (%)	Efficiency of NO_2^- -N consumption (%)	Efficiency of <i>p</i> -cresol-C consumption (%)	N_2 yield	HCO_3^- -C yield
49.92 \pm 0.69 NH_4^+ -N	100 \pm 1.51	95.57 \pm 5.24	–	0.88 \pm 0.03	–
76.87 \pm 0.40 NO_2^- -N					
50.2 \pm 0.48 NH_4^+ -N	95.68 \pm 1.23	70.27 \pm 0.68	–	0.77 \pm 0.014	–
133.17 \pm 0.74 NO_2^- -N					
49.3 \pm 0.27 <i>p</i> -cresol-C	–	40 \pm 3.4	41 \pm 1.82	1.0 \pm 0.02	1.0 \pm 0.03
94.6 \pm 0.56 NO_2^- -N					
50.7 \pm 0.24 <i>p</i> -cresol-C	60.45 \pm 1.18	40.68 \pm 1.37	18.90 \pm 1.77	0.96 \pm 0.04	1.0 \pm 0.03
53.8 \pm 0.61 NH_4^+ -N					
76 \pm 1.25 NO_2^- -N					
46.19 \pm 0.92 <i>p</i> -cresol-C	52.00 \pm 1.69	32.87 \pm 1.59	–	0.27 \pm 0.04	–
50.3 \pm 0.85 NH_4^+ -N					
133.08 \pm 1.60 NO_2^- -N					

Table 2
Specific rates of ammonium, nitrite and *p*-cresol consumption, and molecular nitrogen production determined in batch cultures inoculated with a denitrifying consortium.

Initial substrate concentration (mg/L)	qN_2	qNO_2^- -N	qNH_4^+ -N	qp -cresol-C	$qHCO_3^-$ -C
49.92 \pm 0.69 NH_4^+ -N	60.1 \pm 1.08	44.08 \pm 1.59	32.54 \pm 0.88	–	–
76.87 \pm 0.40 NO_2^- -N					
50.2 \pm 0.48 NH_4^+ -N	62 \pm 0.82	32.49 \pm 1.66	21.59 \pm 1.71	–	–
133.17 \pm 0.74 NO_2^- -N					
49.3 \pm 0.27 <i>p</i> -cresol-C	3.84 \pm 0.07	8.88 \pm 0.12	–	3.6 \pm 0.07	3.36 \pm 0.04
94.6 \pm 0.56 NO_2^- -N					
50.7 \pm 0.24 <i>p</i> -cresol-C	14.37 \pm 1.05	10.21 \pm 0.12	10.37 \pm 0.22	2.72 \pm 0.09	2.83 \pm 0.17
53.8 \pm 0.61 NH_4^+ -N					
76 \pm 1.25 NO_2^- -N					
46.19 \pm 0.92 <i>p</i> -cresol-C	5.4 \pm 0.22	10.8 \pm 0.11	13.32 \pm 0.36	0.0	–
50.3 \pm 0.85 NH_4^+ -N					
133.08 \pm 1.60 NO_2^- -N					

Table 3
Electron balances in the batch cultures spiked with 2.0 g VSS/L.

Initial substrate concentrations (mg/L)	Total meq ^a donated [NH ₄ ⁺ -N → NO ₂ ⁻ -N]	Total meq accepted [NO ₂ ⁻ -N → N ₂]	Total meq donated [p-cresol-C → HCO ₃ ⁻ -C]	Observation
49.92 ± 0.69 NH ₄ ⁺ -N	21.43 ± 0.75	22.83 ± 1.12	–	Coupled
76.87 ± 0.40 NO ₂ ⁻ -N				
50.2 ± 0.48 NH ₄ ⁺ -N	20.5 ± 1.06	20.23 ± 0.88	–	Coupled
133.17 ± 0.74 NO ₂ ⁻ -N				
49.3 ± 0.27 p-cresol-C	–	7.07 ± 0.74	6.07 ± 0.68	Coupled
94.6 ± 0.56 NO ₂ ⁻ -N				
50.7 ± 0.24 p-cresol-C	14.40 ± 0.33	13.30 ± 0.28	–	Coupled
53.8 ± 0.61 NH ₄ ⁺ -N				
76 ± 1.25 NO ₂ ⁻ -N				
46.19 ± 0.92 p-cresol-C	11.4 ± 0.4	4.1 ± 0.61	–	Uncoupled
50.3 ± 0.85 NH ₄ ⁺ -N				
133.08 ± 1.60 NO ₂ ⁻ -N				

^a meq = milliequivalents of electrons.

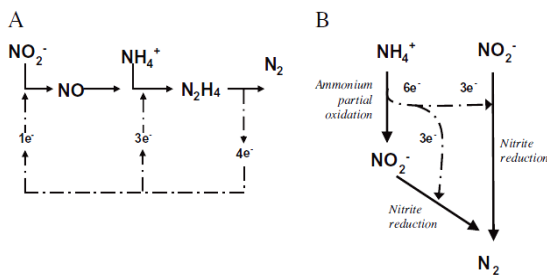


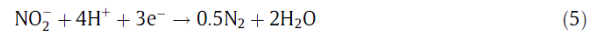
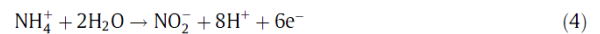
Fig. 4. (A) Possible route by Anammox bacteria (Kuenen, 2008). (B) Possible route suggested by electron balances (present work).

concentration of nitrite also had a negative effect on the consumption specific rates for ammonium and nitrite (Table 2). The diminishing on ammonium consumption rate suggested that nitrite might be acting as inhibitory agent. For instance, Strous et al. (1999) and Dapena-Mora et al. (2007) observed an inhibitory effect on ammonium oxidizing activity at concentrations higher than 100 mg NO₂⁻-N/L. Rowe et al. (1979) and Rake and Eagon (1980) suggested that nitrite is an uncoupler of the respiratory chain.

Thus, in spite of being nitrite a substrate for ammonium oxidation it can also have a negative effect at certain culture conditions.

On the other hand, an increase in initial nitrite concentration did not affect the specific N₂ production rates (Table 2). The specific N₂ production rates obtained from a denitrifying sludge physiologically stable were sixfold lower than reported by Jetten et al. (1998) and Egli et al. (2001) who reported values of specific N₂ production rates between 0.02 and 0.046 mg/mg protein h (an estimation might be 300–690 mg N₂/g VSS d) by using Anammox sludge. It is important to note that several factors might be affecting the production rate values, such as history of sludge, kind of sludge, pH and substrate concentration, among others. Nonetheless, it is worth to remark that the denitrifying sludge physiologically stable used in this work showed the metabolic capability for molecular nitrogen production from ammonium and nitrite.

The electron balances suggested that ammonium oxidation was linked to nitrite reduction (Table 3), in agreement to next semi-reactions:



Kuenen (2008) showed a hypothetical catabolism for ammonium oxidation (Fig. 4A). In this pathway, nitrite is reduced to NO, which then combines with NH₄⁺ to produced hydrazine, later

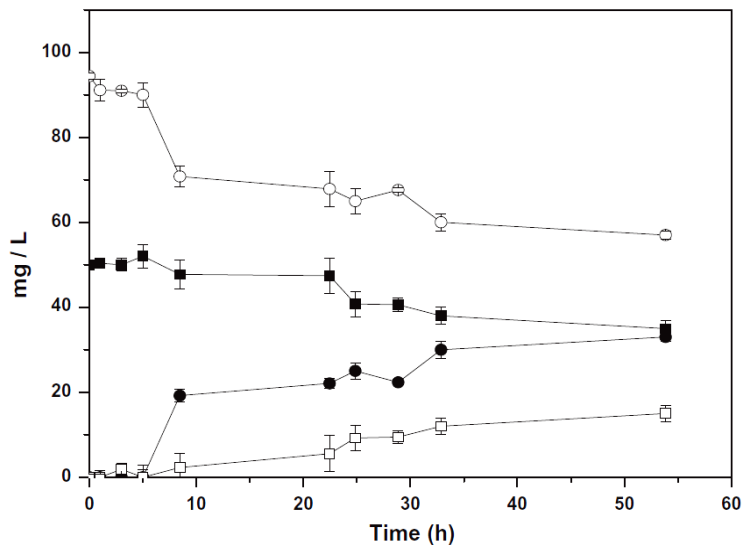


Fig. 5. Time course of p-cresol oxidation and N₂ production by denitrifying sludge, in batch organotrophic cultures. (○) NO₂⁻-N, (■) p-cresol-C, (●) N₂, (□) HCO₃⁻-C.

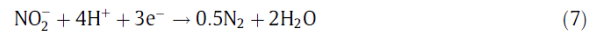
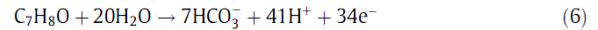
oxidized to N_2 and producing 4 electron equivalents. The electron balances obtained in the present work, suggested that ammonium was first oxidized to nitrite, producing 6 electron equivalents, which were used for reducing initial nitrite concentration together to the nitrite produced (Table 3), being the main product, N_2 , in accordance to semi-reactions 4 and 5.

A critical aspect on anaerobic ammonium oxidation is related to the low bacterial growth rate leading to long start-up periods going from 2 month to 3.5 years (Szatkowska et al., 2007). In the present work, microbial growth was not detected at the end of batch cultures. It seems that ammonium oxidation was not associated with the microbial growth. These results might be promising since the start-up of the reactors for removing ammonium might be faster by using a denitrifying sludge physiologically stable, which is easily produced.

3.3. Organotrophic denitrification: *p*-cresol oxidation by nitrite

Fig. 5 shows the time course of nitrogen and carbon compounds under these culture conditions. The *p*-cresol consumption

presented a lag phase of 5 h. The consumption efficiencies for both substrates were around 40%, being the end products HCO_3^- and N_2 , with yields values close to one (Table 1). The kinetics of the ammonium oxidation and nitrite reduction are shown in Table 2, where can be seen a diminishing on specific consumption rates regarding to lithotrophic cultures. The electron balances indicated that the phenolic compound oxidation was totally linked to nitrite reduction (Table 3), in accordance to next equations:



In comparing the lithotrophic and organotrophic denitrifying rates, the denitrifying sludge oxidizes the ammonium ten-fold faster than *p*-cresol. For instance, Meza-Escalante et al. (2008) studied the *p*-cresol oxidation under denitrifying conditions in batch cultures, but using nitrate as electron acceptor. These authors reported that phenolic compound was oxidized linked to nitrate reduction, with specific N_2 production rate of 5.9 ± 1.6 mg/gVSSd.

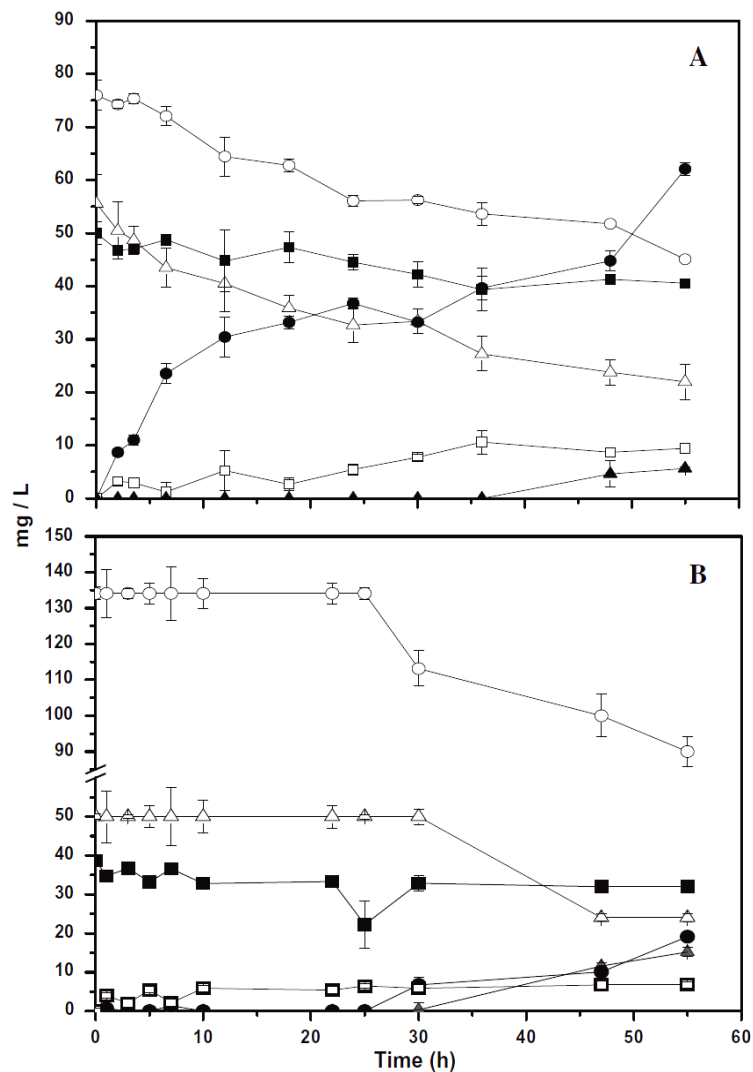


Fig. 6. Time course of *p*-cresol and ammonium oxidation by denitrifying sludge, in batch litho-organotrophic cultures. (A) At 76 mg/L NO_2^- -N and (B) at 133 mg/L NO_2^- -N; (○) NO_2^- -N, (△) NH_4^+ -N, (▲) NO_3^- -N, (●) N_2 , (■) *p*-cresol-C, (□) HCO_3^- -C.

In contrasting this last value with the value obtained in the present study, it is indicating that the organotrophic denitrification is a slow biochemical reaction. The low consumption rate of *p*-cresol compared to the ammonium oxidation rate might be related to the affinity constant (K_s) value of *p*-cresol, possibly higher than for ammonium. Nonetheless, the denitrifying consortium showed metabolic capability for oxidizing *p*-cresol linked to nitrite reduction to N_2 . It is important to note that the information on this topic is still scarce. Thus, it is necessary to carry out more detailed studies in order to understand better the physiological and kinetics behavior.

3.4. Litho-organotrophic denitrification: ammonium and *p*-cresol oxidation by nitrite

In batch cultures spiked with 50 mg/L *p*-cresol-C, 53 mg/L NH_4^+ -N and 76 mg/L or 133 mg/L NO_2^- -N was evaluated the kinetics of ammonium oxidation from denitrifying sludge physiologically stable. Fig. 6A shows the time course of nitrogen and carbon compounds. The nitrite and ammonium consumption efficiencies diminished 2.34 and 1.65 times, respectively, in regarding to lithotrophic culture using 76 mg/L of NO_2^- -N (Table 1). The main products were HCO_3^- and N_2 , with high product yields. The kinetics of nitrite and ammonium consumption and N_2 production also diminished 4.31, 3.13 and 4.2 times, respectively, in regarding to the lithotrophic cultures (Table 2). These experimental results clearly indicated that *p*-cresol exerted a negative effect on the physiology and kinetics of litho-organotrophic denitrification. On the other hand, nitrate formation was detected under this culture conditions. In this sense, Jetten et al. (1998) pointed out that nitrate coming from nitrite oxidation is only produced with the aim to generate reducing equivalents necessary for the reduction of CO_2 . In the present work, biomass growth was not detected by the analytical method used. Likewise, the HCO_3^- was not consumed when nitrate was formed (Fig. 6A). These results might indicate that nitrate formation was not linked to the anabolic pathway.

Regarding to the specific *p*-cresol oxidation rate it diminished around 25%, in comparison to the organotrophic denitrifying culture. The electron balances suggests that *p*-cresol and ammonium was linked to nitrite reduction to molecular nitrogen (Table 3). The denitrifying sludge oxidized the ammonium 3.7-fold faster than *p*-cresol. This might suggest a competition between both substrates, thus affecting the specific consumption rates either *p*-cresol or ammonium. Anyway, these evidences showed that ammonium and *p*-cresol were simultaneously oxidized in presence of nitrite, but at different rate.

Batch cultures spiked with 133 mg/L NO_2^- -N, the ammonium consumption presented a lag phase of 25 h (Fig. 6B). The ammonium and nitrite consumption efficiencies diminished 1.84 and 2.13 times, respectively, in regarding to lithotrophic culture using 133 mg/L NO_2^- -N (Table 1). Continuing the comparison, the ammonium and nitrite consumption rates were not affected, however, the organotrophic denitrification was significantly affected. As noted earlier, the denitrifying consortium showed the metabolic capability for oxidizing *p*-cresol. Nevertheless, at this initial nitrite concentration, *p*-cresol was not consumed during the experimentation time. So that, these experimental results might point out that initial nitrite concentration affected the *p*-cresol transport.

Finally, the electron balances clearly indicated that the increasing of nitrite concentration affected stronger the respiratory process of ammonium oxidation, since the oxidation–reduction process was uncoupled (Table 3). For instance, the end products were NO_3^- and N_2 . Nonetheless, NO_3^- and N_2 only represented the 49% of total nitrogen consumed, indicating the production of other nitrogenous intermediates not quantified.

4. Conclusions

In lithotrophic cultures with ammonium and nitrite, the denitrifying sludge removed efficiently the ammonium and nitrite, resulting as end product, molecular nitrogen. In litho-organotrophic cultures, the kinetics of *p*-cresol and ammonium oxidation was significantly affected by 133 mg/L NO_2^- -N. Nonetheless, at 76 mg/L NO_2^- -N the denitrifying sludge showed the metabolic capability for oxidizing simultaneously ammonium and *p*-cresol, but at different rate. Finally, this is the first work reporting the simultaneous oxidation of ammonium and *p*-cresol with the concomitant production of N_2 from denitrifying sludge physiologically stable.

Acknowledgements

This work was financed by CONACyT. G. González-Blanco received a Ph.D. fellowship from CONACyT-México.

References

- APHA/AWWA/WEF, 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, Washington DC, USA.
- Banerjee, A., Ghoshal, A.K., 2010. Isolation and characterization of hyper phenol tolerant *Bacillus* sp. from oil refinery and exploration sites. *J. Hazard. Mater.* 176, 85–91.
- Beristain-Cardoso, R., Texier, A.-C., Razo-Flores, E., Méndez Pampín, R., Gómez, J., 2009a. Biotransformation of aromatic compounds from wastewaters containing N and/or S, by nitrification/denitrification: a review. *Rev. Environ. Sci. Bio. Technol.* 8, 325–342.
- Beristain-Cardoso, R., Texier, A.-C., Sierra-Alvarez, R., Razo-Flores, E., Field, J.A., Gómez, J., 2009b. Effect of initial sulfide concentration on sulfide and phenol oxidation under denitrifying conditions. *Chemosphere* 74, 200–205.
- Beristain-Cardoso, R., Gómez, J., Méndez-Pampín, R., 2011. Sulfide and ammonium oxidation, acetate mineralization by denitrification in a multipurpose UASB reactor. *Bioresour. Technol.* 102, 2549–2554.
- Camargo, A., Alonso, A., 2006. Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: a global assessment. *Environ. International* 32, 831–849.
- Cervantes, F., Monroy, O., Gómez, J., 1999. Influence of ammonium on the performance of a denitrifying culture under heterotrophic conditions. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 81, 13–21.
- Cervantes, F.J., De la Rosa, D.A., Gómez, J., 2001. Nitrogen removal from wastewaters at low C/N ratios with ammonium and acetate as electron donors. *Bioresour. Technol.* 79, 165–170.
- Codispoti, L.A., Brandes, J.A., Christensen, J.P., Devol, A.H., Naqvi, S.W.A., Paerl, H.W., Yoshinari, T., 2001. The oceanic fixed nitrogen and nitrous oxide budgets: Moving targets as we enter the anthropocene? *Sci. Mar.* 65, 85–105.
- Dapena-Mora, A., Fernández, I., Campos, J.L., Mosquera-Corral, A., Méndez, R., Jetten, M.S.M., 2007. Evaluation of activity and inhibition effects on Anammox process by batch tests based on the nitrogen gas production. *Enzyme Microb. Technol.* 40, 859–865.
- Egli, K., Franger, U., Alvarez, P.J.J., Siegrist, H., Vandermeer, J.R., Zehnder, A.J.B., 2001. Enrichment and characterization of an anammox bacterium from a rotating biological contactor treating ammonium-rich leachate. *Arch. Microbiol.* 175, 198–207.
- Hellings, C., Schellen, A.A.J.C., Mulder, J.W., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J., 1998. The SHARON process: an innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich waste water. *Water Sci. Technol.* 37, 135–142.
- Kamijo, Y., Soma, K., Kokuto, M., Ohbu, M., Fuke, C., Ohwada, T., 2003. Hepatocellular injury with hyperamino-transferaseemia after cresol ingestion. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 127, 364–366.
- Kartal, B., Rattray, J., van Niftrik, L., van de Vossenberg, J., Schmid, M., Webb, R.L., et al., 2007. Candidatus '*Anammoxoglobus propionicus*' gen. nov., sp. nov., a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 30, 39–49.
- Kartal, B., Kuenen, J.G., van Loosdrecht, M.C.M., 2010. Sewage treatment with anammox. *Science* 328, 702–703.
- Kuai, L.P., Verstraete, W., 1998. Ammonium removal by the oxygen-limited autotrophic nitrification–denitrification system. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4500–4506.
- Kuenen, J.G., 2008. Timeline: Anammox bacteria: from discovery to application. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 320–326.
- Jetten, S.M., Strous, M., van de Pas-Schoonen, K.T., Schalk, J., van Dongen, G.J.M., van de Graaf, A.A., Logemann, S., Muyzer, G., van Loosdrecht, M.C.M., Kuenen, J.G., 1998. The anaerobic oxidation of ammonium. *FEMS Microbiol. Rev.* 22, 421–437.
- Meza-Escalante, E.R., Anne-Claire, T., Cuervo-López, F., Gómez, J., Cervantes, F., 2008. Inhibition of sulfide on the simultaneous removal of nitrate and *p*-cresol by a denitrifying sludge. *J. Chem. Technol. Bio. Technol.* 83, 372–377.

- Molinuevo, B., Cruz, G.M., Karakashev, D., Angelidaki, I., 2009. Anammox for ammonia removal from pig manure effluents: effect of organic matter content on process performance. *Bioresour. Technol.* 100, 2171–2175.
- Monma-Ohtaki, J., Maeno, Y., Nagao, M., Iwasa, M., Koyama, H., Isobe, I., Seko-Nakamura, Y., Tsuchimochi, T., Matsumoto, T., 2002. An autopsy case of poisoning by massive absorption of cresol a short time before death. *Forensic Sci. Int.* 126, 77–81.
- Philips, S., Laanbroek, H.J., Verstraete, W., 2002. Origin, causes and effects of increased nitrite concentrations in aquatic environments. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 1, 115–141.
- Rake, J.B., Eagon, R.G., 1980. Inhibition, but not uncoupling, of respiratory energy coupling of three bacterial species by nitrite. *J. Bacteriol.* 144, 975–982.
- Rowe, J.J., Yarbrough, J.M., Rake, J.B., Eagon, R.G., 1979. Nitrite inhibition of aerobic bacteria. *Curr. Microbiol.* 2, 51–54.
- Sanders, J.M., Bucher, J.R., Peckham, J.C., Kissling, G.E., Hejtmancik, M.R., Chhabra, R.S., 2009. Carcinogenesis studies of cresols in rats and mice. *Toxicology* 257, 33–39.
- Smith, V.H., 2003. Eutrophication of freshwater and coastal marine ecosystems: a global problem. *Environ. Sci. Pollut. R.* 10, 126–139.
- Schepers, E., Meert, N., Glorieux, G., Goeman, J., Van der Eycken, J., Vanholder, R., 2007. *p*-cresylsulphate, the main in vivo metabolite of *p*-cresol, activates leucocyte free radical production. *Nephrol. Dial Transplant.* 22, 592–596.
- Strous, M., Kuenen, J.G., Jetten, M.S.M., 1999. Key physiology of anaerobic ammonium oxidation. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3248–3250.
- Szatkowska, B., Cema, G., Plaza, E., Trela, J., Hultman, B., 2007. One-stage system with partial nitrification and Anammox processes in moving-bed biofilm reactor. *Water Sci. Technol.* 55, 19–26.
- Van de Graaf, A.A., de Bruijn, P., Robertson, L.A., Jetten, M.S.M., Kuenen, J.G., 1996. Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms in a fluidized bed reactor. *Microbiology* 142, 2187–2196.
- Wolfe, A.H., Patz, J.A., 2002. Reactive nitrogen and human health: acute and long-term implications. *Ambio.* 31, 120–125.
- Yan, Z., Zhong, H.M., Maher, N., Torres, R., Leo, G.C., Caldwell, G.W., Huebert, N., 2005. Bioactivation of 4-methylphenol (*p*-cresol) via cytochrome P450 mediated aromatic oxidation in human liver microsomes. *Drug. Metab. Dispos.* 33, 1867–1876.

7.2.2 NITRITO COMO PODER OXIDANTE PARA LA ELIMINACIÓN DE P-CRESOL EMPLEANDO UN LODO DESNITRIFICANTE: ESTUDIO CINÉTICO.

Nitrite as oxidizing power for *p*-cresol removal using a denitrifying sludge: kinetic study

Gehovana González-Blanco,^a Flor Cuervo-López,^a Francisco J. Cervantes,^b Ricardo Beristain-Cardoso^a and Jorge Gómez^{a*}

Abstract

BACKGROUND: Chemical plants, oil refineries and petrochemical plants discharge wastewaters polluted with phenolic and nitrogen compounds. Denitrification is an economical and feasible process, however, metabolic and kinetic information is required in order to know and to control the limitations involved when nitrite is present or accumulated. The goal of this study was to study the kinetic behavior of a denitrifying sludge and to reduce nitrite at several *p*-cresol-C (*p*-Cr) concentrations.

RESULTS: Over the 10 to 45 mg *p*-Cr L⁻¹ concentration range tested, nitrite reduction was linked to *p*-Cr oxidation and the specific rate increased to 7.02 mg NO₂⁻-N g⁻¹ VSS h, with CO₂ and N₂ the products. At higher initial *p*-Cr concentrations, inhibition was observed, diminishing the specific rate to 1.60 mg NO₂⁻-N g⁻¹ VSS h. Electron balance showed that *p*-Cr consumption was carried out by two biological processes; denitrification and fermentation. The kinetic profile followed the Haldane model, with inhibition constant (K_i) of 35.75 mg *p*-Cr L⁻¹, affinity constant (K_s) of 20.32 mg *p*-Cr L⁻¹ and maximum specific nitrite reduction (q_{max}) of 9.48 mg NO₂⁻-N g⁻¹ VSS h.

CONCLUSIONS: The results suggest that *p*-cresol can be removed by denitrification and fermentation. Kinetic information should be considered for designing and operating denitrifying reactors to treat industrial wastewaters containing phenolic compounds and nitrite.

© 2013 Society of Chemical Industry

Keywords: denitrification; nitrite; *p*-cresol; kinetic-constants

INTRODUCTION

Industrial wastewaters from chemical and petrochemical plants entering a water body represent a great challenge for treatment. The major part of wastewaters polluted with *p*-cresol derives from the petrochemical industry where nitrite is also found.¹ Nitrite is produced in the process of generating 'sour water' by the petrochemical refinery.¹ *p*-cresol is toxic, corrosive and causes nervous system depression.² Nitrite negatively affects human health and causes severe problems to aquatic ecosystems.^{3–5} Denitrification is a suitable technology for organotrophic denitrification. This biological process involves four enzymatic steps in which nitrate is reduced to nitrite, nitric oxide, nitrous oxide and finally to N₂. In agreement with the denitrifying pathway, nitrite can be used as an oxidant and can be released by: (1) petrochemical industrial activities; (2) produced (accumulation) in wastewater treatment through partial oxidation of ammonia via nitrification; or (3) accumulated during biological denitrification processes when the electron donor is stoichiometrically insufficient or when nitrate reduction proceeds faster than nitrite reduction.^{6–9} Likewise, nitrite is the principal substrate in some biological processes (i.e. Anammox and Oland) and its production is required, since most wastewaters do not contain high enough concentrations of nitrite.^{10–15} Nitrite is a common intermediate in at least three different oxidative or reductive pathways that occur in water and soil, namely, nitrification, denitrification and nitrate reduction to ammonium.³ Nitrite nitrogen has an oxidation

state of +3, which allows it to act as electron donor or electron acceptor. As an electron acceptor, nitrite can potentially be used for phenolic compounds oxidation, and the coexistence of these two pollutants can be expected in pre-denitrification systems in which partial nitrification supplies nitrite to the denitrifying reactor.¹⁶ However, further information is needed in order to elucidate the rate-limiting factors affecting the simultaneous removal of *p*-cresol and nitrite in a denitrifying process.

Economic analyses have shown that partial nitrification is economically more attractive than complete nitrification due to the lower energy demand in the process compared with full nitrification.^{17–19} Nevertheless, accumulation of nitrite in treatment systems based on partial nitrification can also increase the risk of process collapse due to the inhibitory effects of nitrite.^{3,20} Thus, the goal of this research work is to evaluate the kinetic behavior of a denitrifying sludge during nitrite reduction with

* Correspondence to: J. Gomez, Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, DF, México.
E-mail: dani@xanum.uam.mx

^a Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, DF, México

^b División de Ciencias Ambientales, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT), Camino a la Presa San José 2055, Col. Lomas 4^o. Sección, San Luis Potosí, SLP 78216, Mexico

p-cresol in order to identify the rate-limiting steps and to estimate the values of kinetic constants.

MATERIALS AND METHODS

Biomass stabilization in a continuous denitrifying reactor

The denitrifying sludge used for the batch cultures was produced in a 5.0 L continuous stirred tank reactor (CSTR) operated over a period of 1 year at $30 \pm 0.2^\circ\text{C}$, $\text{pH } 9.3 \pm 0.2$ with a hydraulic retention time of 3.2 ± 0.2 days. The CSTR was fed with basal mineral medium at the following loading rates ($\text{mg L}^{-1} \text{ day}^{-1}$): 128 of NO_3^- -N, 258 of acetate-C and 22 of NH_4^+ -N. The basal mineral medium was composed of (g L^{-1}): K_2HPO_4 (4.5), KH_2PO_4 (3.0), and trace elements solution supplied at 1.5 mL L^{-1} . The trace element solution contained (g L^{-1}): $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (5.54), MnCl_2 (5.0), MgCl_2 (5.0), EDTA (5), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1.6), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (1.57), $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1.1), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.05). In denitrifying steady state conditions, the consumption efficiencies for nitrate, acetate and ammonium were 100%, 76% and 89%, respectively, the main end products being N_2 and CO_2 . The denitrifying sludge used for inoculating the batch cultures was taken under steady state, after 7 months of continuous reactor operation.

Batch assays

Batch experiments were undertaken in serologic bottles of 160 mL. Sludge incubations containing 60 mL of basal medium were inoculated with the denitrifying sludge produced in steady state at an initial concentration of $2 \pm 0.01 \text{ g VSS L}^{-1}$. The headspace was flushed for 10 min with helium to establish anaerobic conditions. All bottles were sealed with butyl rubber stoppers and aluminum crimp seals. Separate bottles were set up for N_2 measurements. In order to discard chemical reactions, abiotic controls without inoculum were run. Biotic controls lacking NO_2^- -N or *p*-cresol-C (*p*-Cr) were also included to correct for substrate losses not associated with denitrification. All assays were carried out in duplicate at 200 rpm. The pH value for all batch cultures was 7.0 ± 0.5 . Microbial performance was evaluated in terms of consumption efficiency (E , [$\text{g of N or C consumed g}^{-1} \text{ of N or C fed}$] $\times 100$), production yield (Y , [$\text{g of N or C produced g}^{-1} \text{ of N or C consumed}$]) and specific rates (q , [$\text{mg of substrate or product g}^{-1} \text{ VSS h}$]). The specific rates were calculated by the integrated Gompertz model.^{21,22} Specific consumption rates of nitrite were used to estimate the kinetic parameters. K_s and q_{max} were estimated by linearizing the active phase, whereas K_i was estimated by linearizing the inactive phase.

Analytical methods

Phenolic compounds, such as *p*-cresol and its intermediates were monitored by high-performance liquid chromatography (HPLC) [Perkin-Elmer series 200 UV] using a C18 reverse phase column and a UV detector at 280 nm. The mobile phase was an acetonitrile:water (60:40 v/v) mixture at 1.5 mL min^{-1} . NO_2^- -N was determined by capillary electrophoresis (Beckman Coulter, proteomeLab PA 800). The buffer was prepared with 5 mL of Na_2SO_4 (0.1 mol L^{-1}), NaCl (10 mmol L^{-1}) and a commercial solution CIA Pak OFM anion-BT (Waters) plus 35 mL of deionized water. A microcapillary of melted silica (60 cm long and 75 μm internal diameter) was used. The absorbance was measured in the ultraviolet zone using a mercury lamp at 254 nm and 25°C . Total organic carbon (TOC) and total inorganic carbon (TIC) were measured in a TOC-meter (Shimadzu Co. Model TOC-5000 A). The gas composition in the headspace (N_2 , N_2O and CO_2)

was determined by gas chromatography (Varian 3350) with a thermal conductivity detector. The temperatures of the column, the injector and the detector were 50, 100 and 110°C , respectively, with helium as carrier gas at a constant flow rate of 16 mL min^{-1} . The stainless steel column (Porapak Q mesh 100–80) was 1.20 m long and 1/8" diameter. All liquid samples were filtered through a $0.45 \mu\text{m}$ nylon membrane before analysis. Acetate was measured by gas chromatography (Varian Star 3400) equipped with a flame ionization detector (FID). The stainless steel column was of 1.2 m long packed with Q Poropak 80–10 mesh. The temperatures of the column, injector and detector were 180, 230 and 250°C , respectively, with N_2 as carrier gas. Volatile suspended solids (VSS) were determined according to standard methods for the examination of water and wastewater.²³

RESULTS AND DISCUSSION

Control assays

Batch assays were evaluated over approximately 70 h (Fig. 1). The abiotic cultures spiked with nitrite and *p*-cresol showed no chemical reactions, because at the end of the batch assays the initial concentrations did not significantly change. Regarding biotic controls, *p*-Cr consumption without electron acceptor (NO_2^- -N) and vice versa was evaluated in order to observe the contribution of the endogenous metabolism. At the end of the batch assays NO_2^- -N and *p*-Cr were almost completely recovered ($\sim 95\%$). These experimental data show that consumption of both substrates is associated only with the biological denitrifying activity.

Organotrophic denitrification: physiological aspect

Batch cultures were performed in order to evaluate the respiratory behavior of a denitrifying sludge in the presence of NO_2^- -N at several initial *p*-Cr concentrations (Table 1). In all batch cultures performed, neither methane or nitrous oxide was detected, and N_2 was the one and only nitrogen gas detected.

At $10 \text{ mg p-Cr L}^{-1}$, NO_2^- -N and *p*-Cr consumptions were 23% and 100%, respectively (Table 1). The low NO_2^- -N consumption efficiency was due to the limited concentration of electron donor provided under these experimental conditions. NO_2^- -N was completely reduced to N_2 , with a yield of 1.0 ± 0.01 . The *p*-Cr oxidation was linked to nitrite reduction, with an inorganic carbon yield of 1.0 ± 0.15 . At 15 and 30 mg of *p*-Cr L^{-1} , *p*-cresol consumption efficiency and product yields were also higher. The initial concentrations of phenolic compound improved significantly the nitrite consumption, showing high

Table 1. Product yields and consumption efficiencies (%E) obtained at several initial *p*-Cr concentrations

<i>p</i> -Cr (mg L^{-1})	%E			
	NO_2^- -N	<i>p</i> -Cr	YN_2	YC-HCO_3^-
10	23.3 ± 0.78	100 ± 0.15	1.0 ± 0.01	1.0 ± 0.15
15	34.55 ± 0.97	100 ± 0.21	1.0 ± 0.02	1.0 ± 0.15
30	64.88 ± 1.11	100 ± 0.20	1.0 ± 0.13	1.0 ± 0.11
40	100 ± 1.4	94.8 ± 0.1	1.0 ± 0.09	1.0 ± 0.1
45	100 ± 1.4	99.1 ± 0.68	1.0 ± 0.04	1.0 ± 0.1
50	31.79 ± 1.15	99.02 ± 0.75	1.0 ± 0.11	0.42 ± 0.1
55	26.18 ± 0.72	86.18 ± 0.59	1.0 ± 0.11	0.54 ± 0.07
65	37.92 ± 1.75	95.51 ± 0.96	1.0 ± 0.16	0.57 ± 0.04

Table 2. Mass balance of nitrogen and carbon in denitrifying cultures with nitrite as electron acceptor at different *p*-Cr concentrations (mg L⁻¹)

<i>p</i> -Cr inlet	NO ₂ ⁻ - N inlet	NO ₂ ⁻ - N outlet	N ₂	<i>p</i> -Cr outlet	HCO ₃ ⁻ - C ^a	Organic-Cout ^b
10	83.70 ± 1.2	64.19 ± 0.98	19.85 ± 0.24	0	10.12 ± 0.98	0
15	86.87 ± 0.72	56.85 ± 1.26	29.69 ± 0.84	0	14.75 ± 1.16	0
30	82.89 ± 0.97	29.11 ± 1.19	53.03 ± 0.78	0	30.14 ± 0.91	0
40	82.93 ± 1.1	0	82.89 ± 0.89	0	42.1 ± 0.98	0
45	84.61 ± 1.6	0	84.12 ± 1.55	0.68	45.58 ± 1.22	0
50	86.02 ± 1.3	45.67 ± 1.59	27.34 ± 1.41	2.91 ± 0.53	28.66 ± 1.13	33.77 ± 0.97
55	84.67 ± 1.6	61.61 ± 1.17	22.96 ± 0.93	7.73 ± 1.11	27.85 ± 0.86	26.26 ± 0.86
65	87.31 ± 1.2	55.82 ± 1.76	31.10 ± 1.23	2.94 ± 1.23	27.78 ± 1.25	33.51 ± 1.36

^a The sum of dissolved C-HCO₃⁻ and the C-CO₂ measured in the headspace.
^b Organic-Cout constituted by unidentified compounds.

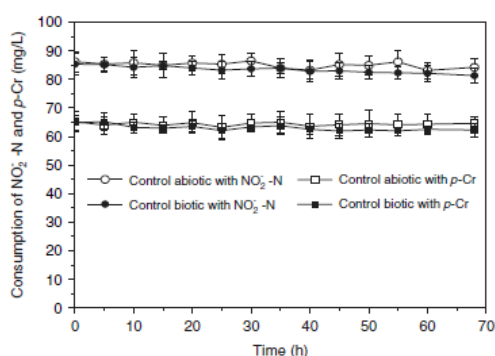
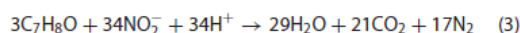
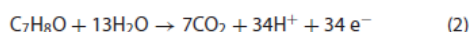
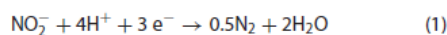


Figure 1. Control batch cultures. Error bars represent the standard deviation.

reducing power. The *p*-Cr oxidation was linked to nitrite reduction with product yield values close to one. On the other hand, when batch cultures were spiked with 40 and 45 mg of *p*-Cr L⁻¹, nitrite consumption efficiencies were 100%. Specifically at 45 mg L⁻¹ of *p*-Cr tested, the consumption efficiencies for both substrates were 100%, the end products being N₂ and CO₂. This is an interesting result because although nitrite and *p*-cresol are known inhibitors, they could be simultaneously and efficiently removed. To accomplish this, the culture medium must be balanced with the molar ratio *p*-Cresol/NO₂⁻ of 0.088, according to the following reactions.



Nitrite consumption efficiencies significantly diminished when denitrifying sludge was evaluated in the presence of 50, 55 and 65 mg *p*-Cr L⁻¹. Nonetheless, the denitrifying yields were high with values close to one. Under these culture conditions, the electron donor was in excess, enough to completely reduce nitrite to N₂. At the *p*-Cr concentrations tested the nitrite consumption efficiencies decreased and this negative effect might

Table 3. Electron balances in the batch cultures

<i>p</i> -Cr (mg L ⁻¹)	Total meq*		Observation
	Accepted [NO ₂ ⁻ -N → N ₂]	Donated [<i>p</i> -Cr → HCO ₃ ⁻ -C]	
10	4.25 ± 0.13	4.10 ± 0.18	Coupled
15	6.36 ± 0.22	5.97 ± 0.19	Coupled
30	11.36 ± 0.28	12.20 ± 0.54	Coupled
40	17.76 ± 0.56	17.76 ± 0.56	Coupled
45	18.03 ± 0.72	18.03 ± 0.33	Coupled
50	5.86 ± 0.24	11.60 ± 0.71	uncoupled
55	4.92 ± 0.24	11.27 ± 0.63	uncoupled
65	6.66 ± 0.15	11.24 ± 0.47	uncoupled

*meq= milliequivalents of electrons.

be associated with the transport of substrate. Regarding the fate of carbon compounds, the *p*-cresol consumption efficiencies were relatively high, but the metabolic pathway was negatively affected, since the mineralization diminished, as was shown by the low product yields obtained during the 70 h of culture (Table 1). The carbonaceous intermediates monitored, *p*-hydroxybenzyl alcohol, *p*-hydroxybenzaldehyde and *p*-hydroxybenzoate, were not detected during the oxidation of *p*-Cr, and the extent of mineralization achieved (YHCO₃⁻-C) was near 50% for the three last concentrations tested (Table 1). In agreement with the matter balance, *p*-cresol carbon was recovered as carbon dioxide and residual organic carbon (Table 2). After 25 h of culture, nitrite consumption was stopped. Nonetheless, *p*-cresol was consumed to a greater extent, identified as residual organic carbon, phenol and acetic acid, the latter at concentrations as low as 2 mg L⁻¹. These carbonaceous end products suggested that a fermentative pathway existed. Electrons balance showed that the electrons released from *p*-cresol oxidation up to carbon dioxide were only partly accepted by nitrite reduction to N₂ (Table 3). Thus, *p*-cresol consumption was not fully coupled to denitrification, indicating that phenolic compound was consumed via two metabolic pathways, denitrification and fermentation, two anaerobic processes.

Häggbloom *et al.*²⁴ showed that the intermediaries during *p*-cresol oxidation via either denitrification or methanogenesis are initially similar, since in both cases intermediaries such as *p*-hydroxybenzyl alcohol, *p*-hydroxybenzaldehyde and *p*-hydroxybenzoate were detected. Nevertheless, under

<i>p</i> -Cr (mg L ⁻¹)	Consumption		Production qN ₂
	qNO ₂ ⁻	q <i>p</i> -Cr	
10	3.10 ± 0.11	1.22 ± 0.04	2.05 ± 0.06
15	4.20 ± 0.15	2.18 ± 0.21	3.63 ± 0.12
30	5.49 ± 0.19	2.91 ± 0.23	4.99 ± 0.19
40	7.02 ± 0.23	3.76 ± 0.12	7.03 ± 0.23
45	6.80 ± 0.27	3.60 ± 0.08	6.80 ± 0.16
50	2.56 ± 0.07	1.82 ± 0.05	3.14 ± 0.09
55	2.17 ± 0.08	2.16 ± 0.09	2.22 ± 0.08
65	1.60 ± 0.05	2.75 ± 0.11	1.60 ± 0.05

methanogenesis conditions, benzoate was also detected from *p*-hydroxybenzoate oxidation.²⁵ In the batch cultures with the denitrifying sludge, those intermediaries were not detected, and this might be related to the use of nitrite instead of nitrate. Denitrification and methanogenesis can occur together, as was observed by Puig-Grajales *et al.*²⁶ These authors observed that a mixture of phenolic compounds (i.e. phenol and 3,4 dimethylphenol) at certain culture conditions were simultaneously removed by denitrification and methanogenesis, the end products being N₂, CO₂ and CH₄. However, in the present work no methane was detected.

Finally, at the highest *p*-cresol concentrations tested, the phenolic compound was removed by the denitrifying sludge by denitrification via nitrite reduction and fermentation.

Organotrophic denitrification: kinetic aspect

Figure 2 shows the time course of *p*-Cr and nitrite consumptions and N₂ production. Nitrite was consumed at all initial *p*-Cr concentrations tested, but the consumption rate was directly related to the initial *p*-Cr concentration (Table 4). The specific nitrite consumption rate increased as a function of initial *p*-Cr concentration, reaching a maximum value of 7.02 mg NO₂⁻-N g⁻¹ VSS h (Fig. 3). In this range, the consumption process followed first-order kinetics. Afterwards, the specific nitrite consumption rate fell to 1.60 mg NO₂⁻-N g⁻¹ VSS h. The reduction in the denitrifying activity might be associated with the accumulation of phenol and propionate, as was pointed out above.

Adav *et al.*⁹ studied the microbial reduction of nitrite with methanol, ethanol and acetate as external electron donors by denitrifying biogranules. The denitrifying activities reported by the authors were 2.07 mg NO₂⁻-N g⁻¹ VSS h, 1.2 mg NO₂⁻-N g⁻¹ VSS h and 1.6 mg NO₂⁻-N g⁻¹ VSS h, with acetate, methanol and ethanol, respectively. Torá *et al.*²⁸ also evaluated the denitrifying activity using several organic compounds and nitrite as electron acceptor, reporting maximum specific nitrite removal rates of 0.01 mg NO₂⁻-N g⁻¹ VSS h (ethanol), while values between 0.0054 and 0.007 mg NO₂⁻-N g⁻¹ VSS h were obtained using glycerol and landfill leachate. In the present study, the specific nitrite consumption rates were higher and the denitrifying activity found was approximately 3.5 times higher with *p*-cresol than with acetate. The higher nitrite reduction activity reported here might be associated with several factors such as the initial nitrite and *p*-cresol concentrations, biomass concentration, or the sludge produced at steady state, among others.

The kinetic profile obtained in the present work followed the Haldane equation [q = (q_{max}*S)/(k_s+S+ (1/K_i)S²)], which is a

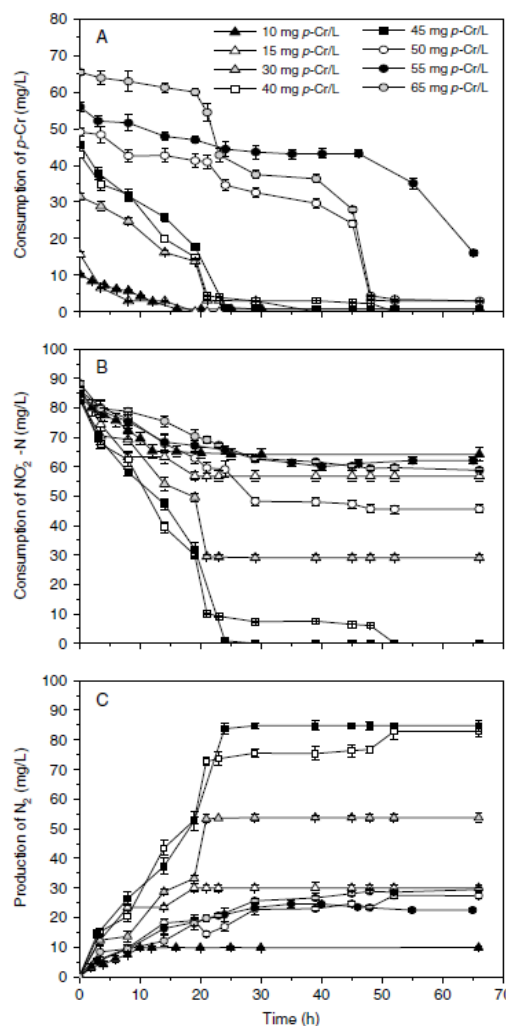


Figure 2. Time course of *p*-Cr (A) NO₂⁻-N (B) and N₂ (C) by a denitrifying sludge, in batch cultures. Batch cultures were carried out in duplicate. Error bars represent the standard deviation.

substrate inhibition model.²⁷ Kinetic parameters such as affinity constant (k_s), maximum specific rate (q_{max}) and the inhibition constant (k_i) were estimated. The values were 20.32 ± 2.5 mg *p*-Cr L⁻¹, 9.48 ± 1.3 mg NO₂⁻-N g⁻¹ VSS h and 35.75 ± 4.1 mg *p*-Cr L⁻¹, respectively. The correlation coefficients were higher than 0.95. Despite the inhibitory effects observed, the present study has provided evidence of conditions under which a denitrifying sludge can remove *p*-cresol and nitrite. Although the experimental data obtained in the present study provide a good basis for designing denitrifying process dealing with the removal of nitrogen and phenolic pollutants from wastewaters, further studies are required in continuous reactors in order to determine adequate operational conditions for this treatment. This kinetic information might be considered in order to treat industrial effluents in which phenolic compounds and nitrite (produced or accumulated) co-exist, such as those generated from the petrochemical sector and particularly

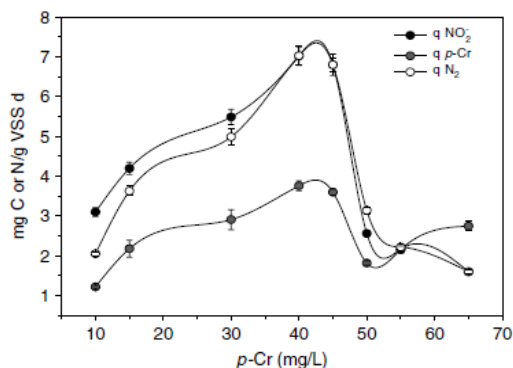


Figure 3. NO₂⁻-N and *p*-Cr consumption rates and specific molecular nitrogen production rates at several *p*-Cr concentrations evaluated in batch cultures. Batch cultures were carried out in duplicate. Error bars represent the standard deviation.

when a partial nitrification is integrated in the treatment system.

CONCLUSIONS

The denitrifying sludge showed metabolic capability for oxidizing *p*-cresol linked to nitrite reduction. The results showed that either the *p*-cresol consumption efficiencies or denitrifying yields remained almost constant at any *p*-cresol concentrations tested. At *p*-cresol concentrations above 50 mg L⁻¹, efficiencies of nitrite consumption and mineralization yields were affected. The *p*-cresol concentration also affected the denitrification specific rate, since the nitrite reduction rates were reduced. Above 50 mg L⁻¹ of *p*-cresol, the phenolic compound was removed by two metabolic pathways, denitrification and fermentation. Finally, Haldane's model used for estimating the kinetic parameters indicated an inhibitory effect of *p*-cresol on the specific nitrite consumption rates.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was financed by CONACyT-México (Project number-14511882). González-Blanco received a PhD fellowship from CONACyT-México.

REFERENCES

- Olmos A, Olguin P, Fajardo C, Razo-Flores E and Monroy O, Physicochemical characterization of spent caustic from the OXIMER process and source waters from Mexican oil refineries. *Energy Fuels* **18**:302–304 (2004).
- Tallur PN, Megadi VB and Ninnekar HZ, Biodegradation of *p*-cresol by immobilized cells of *Bacillus sp.* strain PHN 1. *Biodegradation* **20**:79–83 (2009).
- Phillips S, Laanbroek HJ and Verstraete W, Origin, causes and effects of increased nitrite concentrations in aquatic environments. *Rev Environ Sci Biotechnol* **1**:115–141 (2002).
- Camargo A and Alonso A, Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: a global assessment. *Environ Int* **32**:831–849 (2006).
- Sanders JM, Bucher JR, Peckham JC, Klssling GE, Hejtmancik MR and Chhabra RS, Carcinogenesis studies of cresols in rats and mice. *Toxicology* **257**:33–39 (2009).
- Foley J, Haas D, Yuan ZG and Lant P, Nitrous oxide generation in full-scale biological nutrient removal. *Water Res* **44**:831–844 (2010).
- Gong Y-K, Peng Y-Z, Yang Q, Wu W-M and Wang S-Y, Formation of nitrous oxide in a gradient of oxygenation and nitrogen loading rate during denitrification of nitrite and nitrate. *J Hazard Mater* **227–228**:453–460 (2012).
- Cervantes FJ, Meza-Escalante ER, Texier AC and Gómez J, Kinetic limitations during the simultaneous removal of *p*-cresol and sulfide in a denitrifying process. *J Ind Microbiol Biotechnol* **36**:1417–1424 (2009).
- Adav SS, Lee DJ and Lai JY, Enhanced biological denitrification of high concentration of nitrite with supplementary carbon source. *Appl Microbiol Biotechnol* **85**:773–778 (2010).
- Van de Graaf AA, Bruijn P, Robertson LA, Jetten MSM and Kuenen JG, Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms in a fluidized bed reactor. *Microbiology* **142**:2187–2196 (1996).
- Hellings C, Schellen AAJ, Mulder JW, van Loosdrecht MCM and Heijnen JJ, The SHARON process: an innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich waste water. *Water Sci Technol* **37**:135–142 (1998).
- Jetten SM, Strous M, van de Pas-Schoonen KT, Schalk J, van Dongen GJM, van de Graaf AA, Logemann S, Muyzer G, van Loosdrecht MCM and Kuenen JG, The anaerobic oxidation of ammonium. *FEMS Microbiol Rev* **22**:421–437 (1998).
- Kuai LP and Verstraete W, Ammonium removal by the oxygen-limited autotrophic nitrification–denitrification system. *Appl Environ Microbiol* **64**:4500–4506 (1998).
- Mosquera-Corral A, González F, Campos JL and Méndez R, Partial nitrification in a SHARON reactor in the presence of salts and organic carbon compounds. *Process Biochem* **40**:3109–3118 (2005).
- Vazquez-Padín J, Fernández I, Figueroa M, Mosquera-Corral A, Campos J and Méndez R, Applications of Anammox based processes to treat anaerobic digester supernatant at room temperature. *Bioresour Technol* **100**:2988–2994 (2009).
- Fdz-Polanco F, Villaverde S and Garcia PA, Nitrite accumulation in submerged biofilters-combined effects. *Water Sci Technol* **34**:371–378 (1996).
- Peng Y and Zhu G, Biological nitrogen removal with nitrification and denitrification via nitrite pathway. *Appl Microbiol Biotechnol* **73**:15–26 (2006).
- Zhu G, Peng Y, Li B, Guo J, Yang Q and Wang S, Biological removal of nitrogen from wastewater. *Rev Environ Contam Toxicol* **192**:159–195 (2008).
- Jubany I, Lafuente J, Baeza JA and Carrera J, Total and stable washout of nitrite oxidizing bacteria from a nitrifying continuous activated sludge system using automatic control based on oxygen uptake rate measurements. *Water Res* **43**:2761–2772 (2009).
- Lotti T, van der Star WRL, Kleerebezem R, Lubello C and van Loosdrecht MCM, The effect of nitrite inhibition on the anammox process. *Water Res* **46**:2559–2569 (2012).
- Silva CD, Gómez J and Beristain-Cardoso R, Simultaneous removal of 2-chlorophenol, phenol, *p*-cresol and *p*-hydroxybenzaldehyde under nitrifying conditions: kinetic study. *Bioresour Technol* **102**:6464–6468 (2011).
- González-Blanco G, Beristain-Cardoso R, Cuervo-López F, Cervantes FJ and Gómez J, Simultaneous oxidation of ammonium and *p*-cresol linked to nitrite reduction by denitrifying sludge. *Bioresour Technol* **103**:48–55 (2012).
- APHA, *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater*, 20th edn. American Public Health Association: Washington, DC (1998).
- Häggblohm MM, Rivera MD, Bossert ID, Rogers JE and Young LY, Anaerobic biodegradation of *para*-cresol under three reducing conditions. *Microbiol Ecol* **20**:141–150 (1990).
- Cervantes FJ, van der Velde S, Lettinga G and Field JA, Quinones as terminal electron acceptors for anaerobic microbial oxidation of phenolic compounds. *Biodegradation* **11**:313–321 (2000).
- Puig-Grajales L, Rodríguez-Nava O and Razo-Flores E, Simultaneous biodegradation of a phenol and 3,4 dimethylphenol mixture under denitrifying conditions. *Water Sci Technol* **48**:171–178 (2003).
- Agarry SE, Audu TOK and Solomon BO, Substrate inhibition kinetics of phenol degradation by *Pseudomonas fluorescens* from steady state and wash-out data. *Int J Environ Sci Technol* **6**:443–450 (2009).
- Torá JA, Baeza JA, Carrera J and Oleszkiewicz J, Denitrification of a high-strength wastewater in a sequencing batch reactor using different organic carbon sources. *Chem Eng J* **172**:994–998 (2011).

7.2.3 CONCURRENCIA DE LA OXIDACIÓN ANAEROBIA DEL AMONIO Y LA DESNITRIFICACIÓN ORGANOTRÓFICA EN PRESENCIA DE *p*-CRESOL.

Trabajo enviado a Biodegradation.

"Concurrente of anaeróbico ammonium oxidación and organotrophic denitrification in presente of *p*-cresol"

Full author list: González-Blanco Gehovana, MS; C-Lopez Flor, PhD; Cervantes Francisco J, PhD; Beristain-Cardoso Ricardo, PhD; Jorge Gomez, Ph. D.

El 20/05/14 23:16, "Biodegradation (BIOD)" <no-reply@editorialmanager.com> escribió:

Dear Dr Jorge Gomez,

Thank you for submitting your manuscript, Concurrence of anaerobic ammonium oxidation and organotrophic denitrification in presence of *p*-cresol, to Biodegradation.

Concurrence of anaerobic ammonium oxidation and organotrophic denitrification in presence of *p*-cresol

González-Blanco G., Cuervo-López F¹., Cervantes FJ²., Beristain-Cardoso R³., Gómez J^{1*}.

¹Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. DF, Mexico. *dani@xanum.uam.mx

²División de Ciencias Ambientales, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT), Camino a la Presa San José 2055, Col. Lomas 4^a. Sección, San Luis Potosí, SLP, 78216 Mexico. ³Departamento de Recursos de la Tierra, División de Ciencias Básicas e Ingeniería. Universidad Autónoma Metropolitana-Lerma, Edo. Mexico.

Abstract

This study was carried out to evaluate the capacity of anaerobic granular sludge for oxidizing ammonium and *p*-cresol with nitrate as terminal electron acceptor. Kinetics for the anaerobic oxidation of ammonium and *p*-cresol is described in this paper. The phenolic compound was very efficiently consumed, achieving 65% of mineralization. Ammonium and nitrate were also consumed at 83 and 92%, respectively; being the main product N₂. Anaerobic ammonium oxidation was promoted owing to accumulation of nitrite, and it allowed the synergy of anaerobic ammonium oxidation and organotrophic denitrification for the simultaneous removal of ammonium, nitrate and *p*-cresol. A carbonaceous intermediate partially identified was transiently accumulated, and it transiently truncated the respiratory process of denitrification. These experimental results might be considered for defining strategies in order to remove nitrate, ammonium and phenolic compounds from wastewaters.

Keywords: denitrification, anaerobic ammonium oxidation, nitrite, *p*-cresol

1. Introduction

Cresols and nitrogenous compounds (i.e. ammonia, nitrate) have been discharged into aquatic ecosystems, such as surface or groundwaters, through their use as biocides, fertilizers or generated by the petrochemical or chemical industry [13, 26]. Industrial wastewaters coming from the petrochemical industry (sour water) represent a challenge for the treatment before discharge because of their chemical complexity [21]. US Environmental Protection Agency has classified cresols as pollutant of group C (possible human carcinogen) [1]. *p*-Cresol, even at very low concentration, has adverse effects on the central nervous system, cardiovascular system, lungs, kidney and can cause central nervous system depression [4]. On the other hand, ammonia is one of the main nitrogenous compounds that can lead to eutrophication, hypoxia and loss of biodiversity and habitat in water bodies [14, 33].

Biological removal of these compounds is more environmentally friendly than physico-chemical processes [20]. Ammonium is usually oxidized (to

nitrate) and then reduced to N₂ by sequential nitrification-denitrification or directly through anaerobic oxidation (Anammox). The first step in nitrification-denitrification is the aerobic oxidation of ammonium into nitrate. The second stage is denitrification, where nitrate is reduced to N₂. Denitrifying microorganisms use nitrate or nitrite as the final electron acceptor [23, 30]. In this step organic or inorganic compounds are needed as electron donors. Denitrifying sludge has the versatility to oxidize an extensive group of organic compounds, such as methanol, acetate, propionic, ethanol, phenol, *p*-cresol, etc. [6]. Likewise, denitrifying consortia can use inorganic energy sources, such as sulfide, which is rapidly oxidized to elemental sulphur and slowly to sulfate [5, 25]. N₂ production from anaerobic ammonia oxidation via anammox is carried out only when nitrite is present, but not with nitrate [17, 27, 32]. The presence of organic matter has been seen as inhibitory to this autotrophic process [3, 16]. So wastewaters containing low levels of organic carbon and high nitrogen concentration might be treated

via anammox. However, some studies have documented that the coupling between anammox and organotrophic denitrification can contribute to the simultaneous oxidation of ammonium and organic substrates, including phenolic compounds, linked to the reduction of nitrite/nitrate [15, 18].

For instance, Cervantes et al. [9] evaluated several ammonium and acetate loading rates (25-500 mg NH_4^+ /L d) in a denitrifying continuous UASB reactor using nitrate as electron acceptor. N_2 production rates increased whereas ammonium loading rates were increasing. Authors suggested that over production of N_2 might have been associated to the coupling between anammox and organotrophic denitrification processes.

It has been observed that nitrite can be accumulated during denitrification when the electron donor is stoichiometrically insufficient, when nitrate reduction proceeds faster than nitrite reduction, or when the nitrite reductase enzyme is inhibited [3, 10]. Meza et al. [19] observed transient nitrite accumulation when *p*-cresol was added as reducing source during denitrification. In some cases this accumulation might negatively affect the respiratory process. However, the promotion of nitrite accumulation might also be a good alternative to achieve anaerobic ammonium oxidation into molecular nitrogen, with the concomitant mineralization of phenolic compounds under denitrifying conditions. Nevertheless, a better understanding about the metabolism and kinetic behavior of the denitrifying sludge is still necessary to overcome this challenge. The aim of this work was to evaluate the metabolic capability of denitrifying sludge to achieve simultaneous removal of ammonium, nitrate and *p*-cresol, with the overall goal of obtaining N_2 and CO_2 as the main products. This research might be crucial because industrial wastewaters are highly heterogeneous and several of them are polluted with these compounds.

2. Materials and methods

2.1 Biomass stabilization in a denitrifying reactor

A 5-L completely stirred tank reactor (CSTR) was operated at $30 \pm 0.2^\circ\text{C}$ with a hydraulic retention time (HRT) of 3.2 d. The reactor was inoculated with 4 g volatile suspended solids (VSS)/L. The CSTR was fed at the following loading rates (mg/L-d): 128 of NO_3^- -N, 258 of acetate-C and 22 of NH_4^+ -N. The basal mineral medium was composed of (g/L): K_2HPO_4 (4.5), KH_2PO_4 (3.0), and trace elements solution supplied at 1.5 ml/L. The trace element solution contained (g/L): $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (5.54), MnCl_2 (5.0), MgCl_2 (5.0), EDTA (5), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1.6), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (1.57), $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1.1), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.05). Nitrate, nitrite, ammonium, acetate and bicarbonate were quantified in the denitrifying reactor. Biogas production and composition were also regularly monitored in the reactor. Table 1 summarizes the reactor performance under steady state conditions. The consumption efficiencies of nitrate, acetate and ammonium were of 98.4%, 76.4% and 88.7%, respectively, being N_2 and HCO_3^- the main end products. The product yield of molecular nitrogen (Y_{N_2}) was of 0.91 mg of N_2 /mg of NO_3^- -N fed, and the bicarbonate yield ($\text{Y}_{\text{HCO}_3^-}$) of 0.62 mg of total inorganic carbon/mg of acetate-C fed. The reactor was operating during two years under these culture conditions before using its biomass as inoculum source. Batch cultures were carried out using the sludge produced in the CSTR at steady-state.

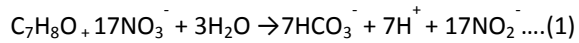
Table 1 Performance of the denitrifying CSTR under steady-state conditions

Parameter	Value [in mg/ L-d]
N- NO_3^- in	126.79 \pm 1.03
N- NH_4^+ in	21.81 \pm 0.96
N- NO_3^- out	2.09 \pm 3.96
N- NH_4^+ out	5.20 \pm 2.98
N- NO_2^- out	ND
N- N_2 out	128.29 \pm 6.98
Acetate-C in	252.57 \pm 4.32
HCO_3^- -C out	137.45 \pm 5.69
Acetate-C out	28.32 \pm 4.27

Data represent mean values obtained from two years of steady-state denitrifying conditions \pm standard deviation

2.2 Batch assays

Batch experiments were undertaken in serologic bottles of 160 ml. Sludge incubations contained 60 ml of basal medium with the composition described above. The serum bottles were spiked with 35.5 ± 0.37 mg *p*-cresol-C (*p*-Cr)/ L, 93.3 ± 2.1 mg NO_3^- -N/ L and 63.7 ± 1.7 mg NH_4^+ -N/ L. The C/N ratio was around 0.38 mg C/ mg N, according to equation 1.



The batch assays were inoculated with 1.9 ± 0.03 g VSS/L of denitrifying sludge from the CSTR. The headspace was flushed for 10 min with helium to establish anaerobic conditions. All bottles were sealed with butyl rubber stoppers and aluminum crimp seals. Separate bottles were set up for N_2 measurements. In order to discard chemical reactions, abiotic controls lacking inoculum were run at the same initial concentrations regarding denitrifying cultures. Biotic controls individually amended with only NH_4^+ -N, NO_3^- -N or *p*-Cr were also included. All assays were carried out by triplicate, and every incubation bottle was an independent experimental unit, which was sacrificed after sampling. The bottles were incubated at 30 °C, pH of 7.1 ± 0.5 , and 200 rpm of agitation in an orbital shaker. Microbial performance was evaluated in terms of consumption efficiency [E, %, mg of C or N consumed/ mg of C or N fed] $\times 100$, yield [Y, mg of C or N produced/ mg of C or N consumed], specific substrate consumption rate [q_S, mg of C or N consumed/ g VSS day] and specific production rate [q_p, mg of C or N produced/ g VSS day]. The specific rates were calculated by the integrated Gompertz model [15]. The coefficient of determination (R^2) was higher than 0.9 for all respiratory rates calculated.

2.3 Analytical methods

NO_3^- and NO_2^- were analyzed by capillary electrophoresis (Beckman Coulter, proteomeLab PA 800), buffer was prepared with 5 mL of Na_2SO_4 (0.1M), NaCl (10 mM) and a commercial solution

CIA Pak OFM anion-BT (Waters) plus 35 mL of deionized water. A microcapillar of melted silica (60 cm long and 75 mm internal diameter) was used and a UV detector at 254 nm. N_2 , CO_2 and N_2O were measured by gas chromatography with thermal conductivity detector. Temperatures for the column, injector and detector were 50, 100 and 110°C, respectively. Helium was used as carrier gas at a constant flow rate of 16 mL/min. The stainless steel column (Porapak Q mesh 100-80) was of 1.20 m long and 1/8" diameter. The NH_4^+ was measured using an ion selective electrode (pHoenix electrode Co. Mod. NH331501). *p*-Cr, *p*-hydroxy-benzylalcohol-C (*p*OHBzalc), *p*-hydroxy-benzoate-C (*p*OHBzate), *p*-hydroxy-benzaldehyde-C (*p*OHBzald), were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) [Perkin-Elmer series 200 UV] using a C18 reverse phase column and a UV detector at 280 nm. The mobile phase was an acetonitrile:water (60:40 v/v) mixture at 1.5 mL/min. Scanning was performed by using high-performance liquid chromatography (Waters, Milford, MA, USA) equipped with diode array detector model 2996, at a wavelength of 190 to 350 nm. Mobile phase, flow and column type were the same than for the measurement of phenolic compounds. Inorganic carbon was measured in a TOC-meter (Shimadzu Co. Model TOC-5000 A). Before sampling, all liquid samples were filtered through a 0.45- μm nylon membrane. All the other measurements (pH and VSS) were according to Standard Methods [2].

3. Results and discussion

3.1 Control assays

Batch assays were performed for a period of approximately 90 hours. Abiotic cultures spiked with NO_3^- -N, NH_4^+ -N and *p*-Cr did not show any chemical reaction, because at the end of the batch experiments the initial concentrations remain without change. Regarding inoculated treatments, *p*-Cr and NH_4^+ -N consumptions without electron acceptor (NO_3^- -N) and viceversa were evaluated in order to observe a contribution of a possible endogenous metabolism. At the end of the batch

assays nitrate, ammonium and *p*-Cr were almost completely recovered (~94%). These experimental data evidenced that consumption of three substrates was mainly associated to denitrifying sludge activity (see below).

3.2 Nitrate reduction

Batch assays were carried out in order to evaluate the metabolic behavior of anaerobic sludge in the presence of two nitrogenous compounds, NO_3^- and NH_4^+ , and one phenolic compound, *p*-cresol; namely, one terminal electron acceptor and two energy sources, respectively. In global terms, nitrate was readily consumed (Fig. 1-A) at specific rate of $0.80 \pm 0.11 \text{ mg NO}_3^- \text{-N/gVSS-h}$, achieving consumption efficiency of 92% and denitrifying yield (Y_{N_2}) of 0.61 after 95 hours of incubation. These results were expected, as the utilized sludge was stabilized in a denitrifying CSTR fed with acetate and nitrate in steady state; thus, it contained an active population of organotrophic denitrifying microorganisms. Nitrogen balance showed that nitrate was mainly recovered as N_2 (around 73%) with accumulation of NO_2^- (close to 16%) as can be seen in Table 2. Total nitrogen recovery was of 82%, indicating that 18% of consumed nitrogen followed another fate. Biomass was analyzed at the end of the batch assays but no growth was detected. Thus, nitrogen used for anabolic process was negligible and the metabolism was mainly catabolic. Nitrous oxide was detected after 75 hours of culture (not quantified), and nitrogen compounds consumption was stopped around 90 h. The shut-off of the respiratory process might be associated to nitrous oxide formation. Regarding this, Beristain-Cardoso et al. [7] showed

an inhibition of the denitrifying process owing to the presence of N_2O during phenol oxidation. On the other hand, Firth and Edwards [12] have suggested that elevated concentrations of N_2O might exert a negative feedback effect upon the enzymes nitrite or nitrate reductases, switching off the pathway.

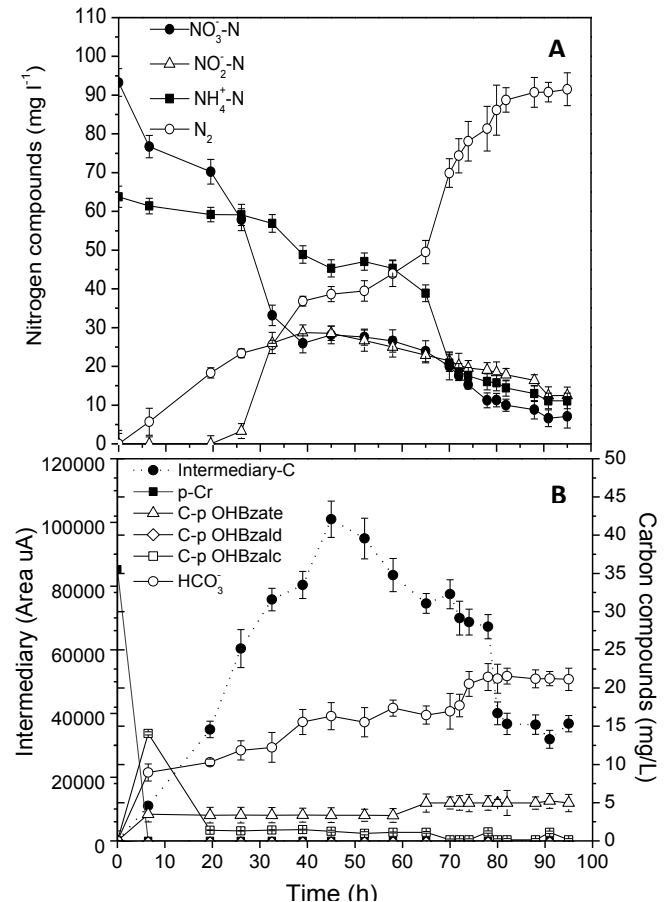


Fig. 1 Time course of nitrogenous (A) and carbonaceous compounds (B) by a denitrifying sludge, in batch cultures. The bar errors represent the standard deviation.

Table 1. Balance of nitrogen and carbon compounds under denitrifying conditions

Initial concentrations (mg/L)		Final concentration (mg/L)				
<i>p</i> cresol-C	<i>p</i> OHBzato-C	<i>p</i> OHBzalc-C	<i>p</i> OHBzald-C	HCO_3^- -C	Total-C	
35.5 ± 0.37	3.2 ± 1.1	0.13 ± 0.1	ND	23.2 ± 1.4	26.4 ± 2.7	
NO_3^- -N	NH_4^+ -N	NO_3^- -N	NH_4^+ -N	NO_2^- -N	N_2	Total-N
93.3 ± 2.1	63.7 ± 1.7	6.6 ± 2.7	11.1 ± 1.9	12.5 ± 2.2	94.5 ± 4.2	130.2 ± 5.4

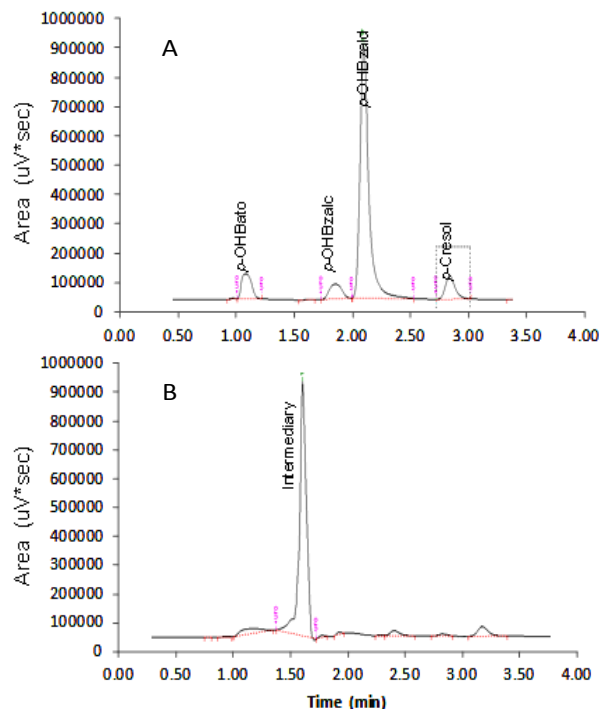
Data represent average from triplicate determinations ± standard deviation. *p*-Cresol-C (*p*-Cr), *p*-hydroxy-benzylalcohol-C (*p*OHBzalc-C), *p*-hydroxy-benzoate-C (*p*OHBzate-C), *p*-hydroxy-benzaldehyde-C (*p*OHBzald-C).

3.3 *p*-Cresol and ammonium oxidation

p-Cr was completely consumed by anaerobic sludge under these environmental conditions. Further analyses revealed that it was converted to *p*OHBzate, *p*OHBzalc, an unidentified intermediate and HCO_3^- during the first 10 h of incubation. The total carbon recovered at the end of the batch cultures was 73%. Thus, 27% of consumed carbon ended up in the form of unidentified compounds (Table 2). Methane was not detected in the gas phase of incubations confirming the denitrifying profile of the respiratory process; thus, the balance gap might be due to accumulation of fermentation products derived from *p*-Cr degradation. After the first 30 h of incubation, an electron balance was made, showing that nitrite and N_2 production required approximately 12.5 mEq (milliequivalents of electrons)/L. Moreover, electrons generated from *p*-cresol oxidation to HCO_3^- and *p*OHBzate were around 5 mEq/ L. In order to produce the amount of nitrite and N_2 , a fraction of electrons should have come from *p*-Cr oxidation to the carbonaceous intermediates (~7.0 mEq/ L). The electron balance suggests that carbonaceous intermediates production provided the greatest number of electrons to reduce nitrate. *p*-Cr consumption was linked to nitrate reduction, but nitrite accumulation occurred, suggesting that nitrite reduction was the main rate-limiting step on this respiratory process. Nitrite accumulation under denitrifying conditions has been observed by several researchers using phenol or other aromatic compounds [11, 31]. For instance, Thomas et al. [29] suggested that nitrite accumulation is owing to the presence of nitrate, which exerted repression on the nitrite reductase. On the other hand, Meza-Escalante et al. [19] also observed nitrite accumulation in batch tests amended with nitrate and *p*-cresol. These authors displayed a global balance of total carbon; therefore, it is unclear whether the nitrite accumulation was due to presence of *p*-Cr, or by the accumulation of phenolic intermediates. In the present work *p*-Cr was partially oxidized to an unidentified carbonaceous intermediate, which was detected by

HPLC. The unidentified intermediate reached a maximum pick around 40 hours (Fig. 1-B, Fig. 2).

Fig. 2 HPLC chromatogram of carbonaceous



compounds quantified during the denitrifying cultures. A) Standards and B) unknown phenolic intermediate.

A spectrophotometric screening from 190 to 350 nm of this unknown compound was made, showing that its chemical structure was formed by a benzene ring (206.4 nm) and two substituents groups (282.4 and 299.2 nm) (Fig. 3). In agreement to the biochemical pathway proposed by Bossert and Joung [8], this compound partially identified might be positioned between *p*-Cr and *p*-OHBzalc, and it seems to be a phenolic compound. This model pathway involves the initial formation of a quinone, then oxygen from water is incorporated by the enzyme methylhydrolase to form *p*-OHBzalc, followed by dehydrogenation to produce *p*-OHBzald, and finally a new dehydrogenation is carried out to produce *p*-OHBato. Nitrate acts as external electron acceptor and it is reduced to N_2 . In the time interval between 40 and 60 h, N_2 production stopped, which might be due to the presence of this carbonaceous intermediate.

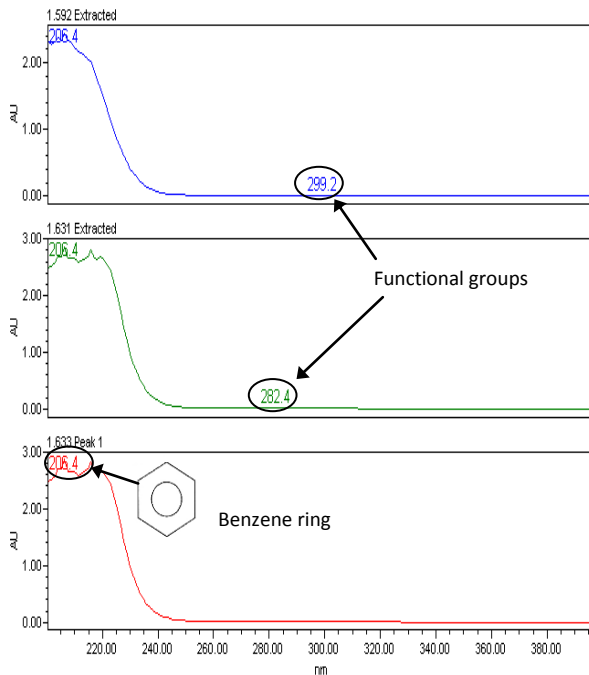


Fig. 3 Spectrophotometric screening with a scan from 350 to 190 nm. AU: maximum absorbance, nm: resolution.

Nitrate and ammonium were also not consumed during the same period of time; nonetheless, this compound partially identified was progressively decreasing, suggesting some biotransformation for another via not associated to denitrification. For example, Thomas et al. [29] showed that there is a hindrance to degrade compounds when two substituent groups on the aromatic ring are in the ortho-position to one another, such as catechol, 2,5-dihydroxybenzoic acid, *o*-hydroxybenzoic acid, among others.

Regarding to second reducing source, ammonium, there was a lag phase of about 30 hours before this anaerobic sludge started to consume ammonium, but after this period, anaerobic ammonium oxidation took place (Figure 1-A). Ammonium consumption efficiency was of 83%, and it was

oxidized at specific rate of 1.02 ± 0.07 mg NH_4^+ -N/g VSS-h (Table 3). The kinetic results showed that denitrifying sludge consumed ammonium faster than nitrate.

On the other hand, nitrate reduction was not linked to ammonium oxidation, suggesting that sludge was not able to use nitrate as terminal electron acceptor for anaerobic ammonium oxidation. In fact, Van de Graaf et al. [32] carried out batch experiments with tracers, showing that the actual electron acceptor for anaerobic ammonium oxidation was nitrite instead of nitrate, being N_2 and NO_3^- end products. According to the experimental data, anaerobic sludge oxidized ammonium when nitrite was transiently accumulated, in agreement to the Anammox biological process. For example, Sun et al. [28] observed Anammox activity in several sludge taken from municipal wastewater treatment plants (WWTPs), but the response time to produce N_2 took more than one month. In the present work, N_2 production from anaerobic ammonium oxidation was relatively fast when nitrite was present. Similar results were previously reported by Gonzalez-Blanco et al. [15], who evaluated the kinetics of ammonium oxidation from denitrifying sludge physiologically stable using nitrite as terminal electron acceptor; observing faster N_2 production without lag phase. Therefore, removal of different pollutants by using denitrifying sludge physiologically stable (easy to stabilize and handle) instead of Anammox sludge might be a good strategy in order to start-up bioreactors with these purposes (simultaneous removal of nitrogenous pollutants, such as ammonium and nitrite, as well as organic contaminants, such as phenolic compounds).

Table 3. Consumption efficiencies of *p*-cresol and nitrogen compounds, product yields and specific consumption or production rates

Efficiency of consumption (%)			Yields	
<i>p</i> cresol-C	NO_3^- -N	NH_4^+ -N	N_2	HCO_3^- -C
100 ± 1.3	92 ± 2.6	83 ± 4.5	0.61 ± 0.04	0.65 ± 0.06
Specific consumption rate (<i>qs</i>)			Specific production rate (<i>qp</i>)	
mg NO_3^- -N/g SSV h		mg NH_4^+ -N/g SSV h	mg N_2 /g SSV h	mg HCO_3^- -C /g SSV h
0.8056 ± 0.11		1.0166 ± 0.07	0.5724 ± 0.04	0.1396 ± 0.03

It has been well established that the Anammox metabolism requires nitrite as the terminal electron acceptor. As nitrite was not externally fed to the batch assays, it must have been internally produced by the biochemical reactions involved, for example, during the partial nitrate reduction linked to *p*-Cr oxidation (Fig. 4).

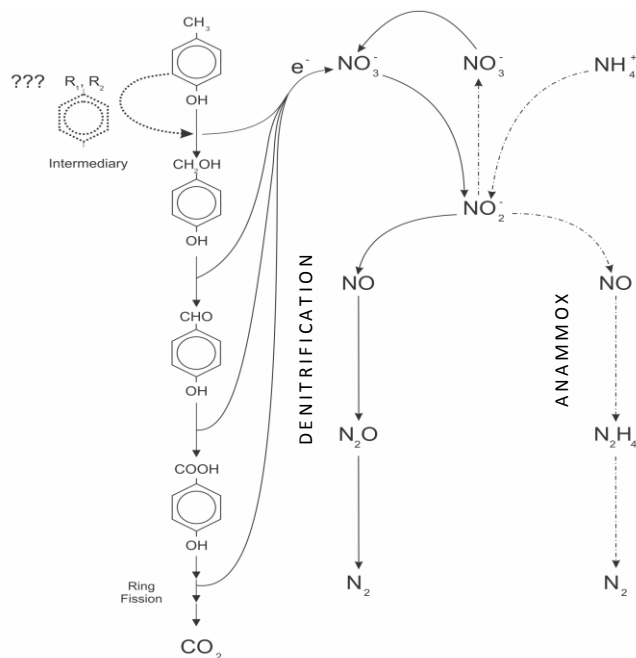


Fig. 4 A conceptual model describing reactions between anaerobic ammonium oxidation (Anammox) and denitrification. e^- , electrons equivalents. R_1 and R_2 are the substituents groups.

In parallel, simultaneous consumption of *p*-Cr/ NO_3^- or $\text{NH}_4^+/\text{NO}_2^-$ was observed, strongly suggesting the synergy of anaerobic ammonium oxidation and organotrophic denitrification. In the last decade there are several reports about coupling the Anammox and denitrification, where nitrite has been promoted in a unit of partial nitrification, to be used after for the Anammox process in another reaction unit; observing competition for nitrite reduction between Anammox bacteria and denitrifiers [18]. For example, Shi et al. [24] observed in a membrane biofilm reactor fed with methane, ammonium and nitrate, an occurrence of Anammox coupled to denitrification. Denitrifying bacteria reduced nitrate to nitrite, using electrons

derived from methane, afterward nitrite was used by Anammox bacteria. Finally, in the present work, the coupling between two respiratory processes; anaerobic ammonium oxidation and organotrophic denitrification might be a good strategy for treating industrial wastewaters containing nitrate, ammonium and phenolic compounds, like those generated from petrochemical industry or found in groundwaters.

4. Conclusions

Nitrate, ammonium and *p*-cresol were removed at 92, 83 and 100%, respectively, being the main products N_2 and CO_2 . Incomplete *p*-cresol oxidation led to the formation of an unidentified intermediate, which induced nitrite accumulation promoting the anaerobic ammonium oxidation process. Thus, two respiratory processes; organotrophic denitrification and anaerobic ammonium oxidation were carried out in a sequential way. The presence of the unknown phenolic compound inhibited the respiratory process of denitrification, but induced the ammonium consumption owing to nitrite accumulation.

Acknowledgements

This work was financed by the Council of Science and Technology of Mexico (CONACYT). González-Blanco G, received a Ph.D fellowship from CONACyT-Mexico.

References

- [1] Agency for Toxic Substances and Disease Registry (1990) Toxicological Profile for Cresols. Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA.
- [2] APHA/AWWA/WEF (2005) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, Washington DC, USA.
- [3] Adav SS, Lee DJ, Lai JY (2010) Enhanced biological denitrification of high concentration of nitrite with supplementary carbon source. Appl Microbiol Biotechnol 85:773-778.
- [4] Basheer F, Farooqi IH (2012) Biodegradation of *p*-cresol by aerobic granules in sequencing batch reactor. J Environ Sci 24: 2012-2018.
- [5] Beristain-Cardoso R, Sierra Alvarez R, Roulette P, Razo Flores E, Gomez J, Field JA (2006) Sulfide oxidation under

- chemolithotrophic denitrifying conditions. *Biotechnol Bioeng* 95:1142-1157.
- [6] Beristain-Cardoso R, Texier AC, Razo-Flores E, Mendéz-Pampín R, Gómez J (2009a) Biotransformation of aromatic compounds from wastewaters containing N and/or S, by nitrification/ denitrification: a review. *Rev Environ Sci Biotechnol* 8:325-342.
- [7] Beristain-Cardoso R, Texier AC, Sierra-Alvarez R, Razo-Flores E, Field JA, Gomez J (2009b) Effect of initial sulfide concentration on sulfide and phenol oxidation under denitrifying conditions. *Chemosphere* 74:200-205
- [8] Bossert ID, Young LY (1986) Anaerobic oxidation of p-cresol by a denitrifying bacterium. *Appl Environ Microbiol* 52:1117-1122.
- [9] Cervantes F, Monroy O, Gómez J (1999) Influence of ammonium on the performance of a denitrifying culture under heterotrophic conditions. *Appl Biochem Biotechnol* 81:13-21.
- [10] Cervantes FJ, Meza-Escalante ER, Texier AC, Gómez J (2009) Kinetic limitations during the simultaneous removal of p-cresol and sulfide in a denitrifying process. *J Ind Microbiol Biotechnol* 36:1417-1424.
- [11] Chee-Sanford JC, Frost JW, Fries MR, Zhou JZ, Tiedje JM (1996) Evidence for acetyl coenzyme A and cinnamoyl coenzyme A in the anaerobic toluene mineralization pathway in *Azoarcus toluolyticus* Tol-4. *Appl Environ Microbiol* 62:964-973.
- [12] Firth JR, Edwards C (1999) Effects of cultural conditions on denitrification by *Pseudomonas stutzeri* measured by membrane inlet mass spectrometry. *J Appl Microbiol* 87:353-358.
- [13] Flyvbjerg J, Jørgensen C, Arvin E, Jensen BK, Olsen SK (1993) Biodegradation of ortho-cresol by a mixed culture of nitrate-reducing bacteria growing on toluene. *Appl Environ Microbiol* 59: 2286-2292.
- [14] Galloway JN, Aber JD, Erisman JW, Seitzinger SP, Howarth RW, Ellis B, Cowling EB, Cosby BJ (2003) The Nitrogen Cascade. *Bio Science* 53: 341-356.
- [15] González-Blanco G, Beristain-Cardoso R, Cuervo-López F, Cervantes FJ, Gómez J (2012) Simultaneous oxidation of ammonium and p-cresol linked to nitrite reduction by denitrifying sludge. *Bioresour Technol* 103: 48-55.
- [16] Güven D, Dapena A, Kartal B, Schmid MC, Maas B, van de Pas-Schoonen K, Sozen S, Mendez R, Op den Camp HJ, Jetten, MS, Strous M, Schmidt I (2005) Propionate oxidation by and methanol inhibition of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria. *Appl Environ Microbiol* 71:1066-1071.
- [17] Jetten MSM, Cirpus I, Kartal B, van Niftrik L, van de Pas-Schoonen KT, Sliemers O, Haaijer S, van der Star W, Schmid M, van de Vossenberg J, Schmidt I, Harhangi H, van Loosdrecht M, Kuenen JG, den Camp, HO, Strous M (2005) 1994-2004: 10 years of research on the anaerobic oxidation of ammonium. *Biochem Soc Trans* 33:119-123.
- [18] Kumar M, Lin JG (2010) Co-existence of anammox and denitrification for simultaneous nitrogen and carbon removal-Strategies and issues. *J Hazard Mater* 178:1-9.
- [19] Meza-Escalante ER, Texier AC, Cuervo-Lopez F, Gomez J, Cervantes FJ (2008) Inhibition of sulphide on the simultaneous removal of nitrate and p-cresol by a denitrifying sludge. *J Chem Technol Biotechnol* 83:372-377.
- [20] Oldham, WK, Rabinowitz B (2002) Development of biological nutrient removal technology in western Canada. *J Environ Eng Sci* 1:33-43.
- [21] Olmos A, Olguin P, Fajardo C, Razo-Flores E, Monroy O (2004) Physicochemical characterization of spent caustic from the OXIMER process and sour water from Mexican oil refineries. *Energy Fuel* 18:302-304
- [22] Puyol D, Carvajal-Arroyo JM, Sierra-Alvarez R, Field JA (2013) Nitrite (not free nitrous acid) is the main inhibitor of the anammox process at common pH conditions. *Biotechnol Lett* 36:547-551.
- [23] Ruiz G, Jeison D, Ciudad G, Chamy R (2006) Nitrification – denitrification via nitrite accumulation for nitrogen removal from wastewaters. *Bioresour Technol* 97: 330-335.
- [24] Shi Y, Hu S, Lou J, Lu P, Keller J, Yuan Z (2013) Nitrogen removal from wastewater by coupling Anammox and methane-dependent denitrification in a membrane biofilm reactor. *Environ Sci Technol* 47 : 11577-11583.
- [25] Sierra-Alvarez R, Beristain-Cardoso R, Salazar M, Gómez J, Razo-Flores E, Field JA (2007) Chemolithotrophic denitrification with elemental sulfur for groundwater treatment. *Wat Res* 41: 1253-1262.
- [26] Smil V (1999) Nitrogen in crop production: An account of global flows. *Global Biogeochemical Cycles*. 13: 647-662.
- [27] Strous M, Heijnen JJ, Kuenen JG, Jetten MSM (1998) The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 50:589-596.
- [28] Sun WJ, Banihani Q, Sierra-Alvarez R, Field JA (2011) Stoichiometric and molecular evidence for the enrichment of anaerobic ammonium oxidizing bacteria from wastewater treatment plant sludge samples. *Chemosphere* 84: 1262-1269.
- [29] Thomas S, Sarfaraz S, Mishra LC, yengar LI (2002) Degradation of phenol compounds by defined denitrifying bacterial culture. *Word J Microb Biot* 18: 57-63.
- [30] Tiedje JM (1988) In: *Ecology of Denitrification and Dissimilatory Nitrate Reduction to Ammonium*. Biology of Anaerobic Microorganism. John Willey & Sons, New York, pp. 179-244.
- [31] Tschech A, Fuchs G (1987) Anaerobic degradation of phenol by pure culture of newly isolated denitrifying *Pseudomonads*. *Arch Microbiol* 148: 213-217.
- [32] Van de Graaf AA, de Bruijn P, Robertson LA, Jetten MSM, Kuenen JG (1996) Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms in a fluidized bed reactor. *Microbiology* 142: 2187-2196.
- [33] Veeresh GS, Kumar P, Mehrotra I (2005) Treatment of phenol and cresol in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) process: a review. *Wat Res* 39:154-170.

8. Conclusiones Generales

El propósito de este trabajo fue caracterizar cinética y metabólicamente el proceso desnitrificante en presencia de diferentes fuentes reductoras, y proponer mecanismos de control del proceso óxido-reductor. Se partió de la hipótesis de que un lodo con capacidad metabólica para desnitrificar sería capaz de oxidar el amonio y *p*-cresol, empleando al nitrito o nitrato como agente oxidante.

1. El lodo con capacidad metabólica para desnitrificar se consiguió al imponer condiciones anóxicas a la biomasa procedente de un sistema convencional de digestión anaerobia, y para promover la producción de biomasa sólo bastó incrementar la relación C/N en el sistema.
2. Cuando se utilizó nitrito con amonio o *p*-cresol de forma individual, la velocidad específica de consumo de nitrito con amonio fue 4 veces mayor con respecto al consumo de nitrito con *p*-cresol. Al ser evaluados ambos donadores de electrones a una concentración inicial de 76 mg N-NO₂⁻/L se llevó a cabo la desnitrificación órgano-litotrófica, mientras que a una concentración de 133 mg N-NO₂⁻/L no se observó consumo de *p*-cresol y el rendimiento de la desnitrificación litotrófica disminuyó en un 72%. Los resultados mostraron que la oxidación del *p*-cresol en presencia de nitrito fue la más afectada, ya que presentó la más baja velocidad de consumo tanto en ausencia como en presencia de amonio.
3. Al evaluar las constantes cinéticas (q_{max} , k_i y k_s) durante la oxidación del *p*-cresol, y en presencia de nitrito se observó que:
 - a) A concentraciones de *p*-cresol por debajo del valor estequiométrico establecido (45 mg C-*p* cresol/L) se llevó a cabo la desnitrificación organotrófica sin ningún inconveniente. A las concentraciones de 50-65 mg C-*p* cresol/L las eficiencias de consumo de nitrito, la mineralización de la materia orgánica y las velocidades desnitrificantes disminuyeron cerca de 50%.
 - b) El perfil cinético se ajustó al modelo de Haldane, y los parámetros cinéticos indicaron que el *p*-cresol ejerció un efecto inhibitorio sobre las velocidades específicas de consumo de nitrito.

- c) A las concentraciones de *p*-cresol de 50-65 mg C-*p* cresol/L, el compuesto fenólico se oxidó por dos vías metabólicas: desnitrificación y fermentación.
4. Al utilizar nitrato como aceptor final de electrones, la oxidación del *p*-cresol se acopló a la reducción del nitrato, con una acumulación transitoria de nitrito y un intermediario carbonado formado por un anillo bencénico con dos grupos sustituyentes. El nitrito acumulado promovió la actividad anammox, ya que se acopló a la oxidación anaerobia del amonio. Respecto al intermediario carbonado, éste se mineralizó vía desnitrificación con nitrato. En términos globales, las eficiencias de consumo de nitrato, amonio y *p*-cresol fueron de 92, 83 y 100%, respectivamente, siendo los productos finales, bicarbonato y N₂.
5. El acoplamiento de estos dos procesos biológicos (desnitrificación organotrófica y anammox) podría ser una estrategia para tratar aguas residuales industriales contaminadas con compuestos nitrogenados y materia orgánica.

Esta investigación sugirió algunos mecanismos de control del proceso biológico.

- Establecer una relación C/N-NO₃⁻ másica alrededor de 0.4 favorece la acumulación de nitrito.
- Partir del nitrato en vez del nitrito permite disminuir los efectos inhibitorios en la desnitrificación organotrófica y promueve el proceso anammox, lo que permite la eliminación simultánea de amonio y *p*-cresol de forma más eficiente.

9. Recomendaciones

Los resultados obtenidos en esta tesis abren la posibilidad de plantear nuevos estudios para una mayor comprensión de la fisiología de lodos anaerobios bajo condiciones desnitrificantes en presencia de nitrito, amonio y *p*-cresol. Los estudios fisiológicos realizados en el presente trabajo mostraron la posibilidad de llevar a cabo de forma simultánea el proceso desnitrificante y la oxidación anaerobia del amonio. No obstante, para tener una mayor certeza de la interacción de estos dos procesos biológicos es necesario hacer uso de otras herramientas como son las técnicas de biología molecular (PCR, DGGE, FISH, entre otros) para establecer la existencia y en su caso la abundancia y distribución de ambas poblaciones. También, es recomendable que a la par de los estudios de biología molecular se realicen ensayos con inhibidores selectivos, para verificar la actividad y aporte de los microorganismos desnitrificantes y anamoxidantes en la óxido-reducción de los sustratos. Con la misma finalidad, también se podría hacer uso de isotopos (^{14}N ^{15}N), ya que en la literatura se establece como un método exitoso para distinguir la actividad anammox dentro de un consorcio microbiano.

Por otro lado, en el presente trabajo también se aportó evidencia de que el tipo de aceptor de electrones tiene un efecto sobre el tiempo y velocidad de consumo del *p*-cresol, y que aparentemente el nitrito modifica o promueve la formación de intermediarios que no han sido reportados en la ruta de oxidación del *p*-cresol con nitrato. Por lo que futuros estudios podrían apoyarse en el uso de la cromatografía acoplada a la espectrofotometría de masas (HPLC-MS) para identificar, esclarecer y proponer la posible ruta de oxidación del *p*-cresol en presencia de nitrito.