



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA

INSTITUTO DE INGENIERÍA

DEGRADACIÓN DE ISÓMEROS DE NONILFENOL
POR MEDIO DE UN CONSORCIO NITRIFICANTE
EN UN REACTOR DE MEMBRANA SUMERGIDA

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN INGENIERÍA (AMBIENTAL)

P R E S E N T A :

ANGELES XITLALLI TORRES BOJORGES

TUTOR:

Dr. GERMÁN BUITRÓN MÉNDEZ



2012

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dra. Petia Mijaylova Nacheva
Secretario: Dr. Germán Cuevas Rodríguez
Vocal: Dra. Araceli Patricia Peña Álvarez
1^{er}. Suplente: Dra. Georgina Fernández Villagómez
2^{do}. Suplente: Dr. Germán Buitrón Méndez

Lugar donde se realizó la tesis:

INSTITUTO DE INGENIERÍA, UNAM.

Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas,
Unidad Académica del Instituto de Ingeniería. Campus UNAM Juriquilla, QRO.

TUTOR DE TESIS:

Dr. Germán Buitrón Méndez

Esta investigación fue financiada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACyT, Proyecto 100298.

Se agradece a la Coordinación de Estudios de Posgrado (CEP) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por la beca otorgada para la realización de los estudios de doctorado.

Se agradece también a Gloria Moreno Rodríguez y a Jaime Pérez Trevilla del Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas (LIPATA) por el apoyo técnico recibido durante los análisis químicos y biológicos.

A mamá

A papá

A mí hermano

Agradecimientos.

Dado que esta es la última tesis que escribo (confío en que así será), los agradecimientos serán más extensos de lo habitual, jejejeje.

A la piedra más antigua, como dijera Sabines, por todas las experiencias que han ocurrido en mi vida. Gracias a ellas me he convertido en lo que ahora soy. Por dejarme saber que ahí está siempre, cuidando de mí. Que aunque a veces me rebelo, Él espera pacientemente.

A mis padres, Guillermina y Faustino, por su apoyo durante cada aventura académica que he emprendido. Por su amor aún cuando nuestra perspectiva del mundo difiera. Por dejar que aprenda de mis propios errores y permitirme refugiarme en sus brazos. Gracias mamá por las conversaciones de los últimos dos años, por dejarme saber que tenemos más cosas en común de las que creía y por los consejos. Gracias papá por seguir consintiéndome, porque siempre seré Tallita.

A mi hermano, mi queridísimo lic. Victor Q., por ser mi amigo y mi cómplice. Te quiero a montones.

Al Dr. Germán Buitrón Méndez, coordinador del Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas, por haber dirigido este trabajo y por sus aportaciones al mismo.

A los miembros del comité tutorial, Dra. Georgina Fernández Villagómez y Dra. Araceli Peña Álvarez, por las recomendaciones que hacían cada semestre al trabajo, por su amabilidad y por los consejos adicionales que nada tenían que ver con la vida académica.

A los miembros del jurado, Dra. Pétia Mijaylova Nacheva y Dr. Germán Cuevas Rodríguez, por el tiempo dedicado a revisar esta tesis, así como por los valiosos comentarios que la han enriquecido.

A la Dra. Marta Carballa y al Prof. Juan M. Lema de la Universidad de Santiago de Compostela por abrirme las puertas del grupo de ingeniería ambiental y bioprocesos, el biogrupo. Gracias por mostrarme otras opciones de trabajo, por las sugerencias y por tener siempre una palabra de aliento.

A Jaime Pérez por su invaluable ayuda cuando mi querido cromatógrafo de gases se negaba a cooperar. Por la paciencia cuando me ponía como ogro cuando la tecnología parecía conspirar en mi contra.

A Gloria Moreno por explicarme cómo usar el respirómetro, por ayudarme con las muestras de carbono inorgánico, por las ideas que me dejaban pensando cómo mejorar los experimentos y por las amenas charlas donde podía desahogar mi inconformidad contra el mundo.

A los ingenieros Fernando Torres, Miriam Elías, Daniela Molina y Blanca Morales quienes compartieron conmigo esta aventura cuando aún eran estudiantes de licenciatura. Gracias por tolerar mi mal humor, mi crueldad con las diluciones (cómo olvidar la cara de

circunstancias), mi poca tolerancia al trabajo mal hecho, mi letanía interminable de qué es el nonilfenol, mis arranques apapachadores y mi locura de hablarles “bonito” a las bacterias nitrificantes para que trabajaran mejor. Gracias por hacer ameno el trabajo, por hacerme los experimentos más llevaderos prestándome otro par de ojos, de manos y de pies. Tampoco olvido el doloroso masaje a mi contraído músculo.

A los amigos que obtuve durante mi estancia en el LIPATA, tres años y medio parecieron nada al lado de ellos. Dorian, después de nuestras conversaciones no volveré a olvidar los pecados capitales. Francisco, gracias por el apodo que me definió ante las futuras generaciones. Berenice, gracias por ser tan tierna y soportar mi falta de empatía. Christian, gracias por sentarte a escuchar mis dramas académicos, por reír de mis ocurrencias y burlarnos juntos de tantas cosas que pasaban en el laboratorio. Carlitos y Gama, como los extraño y sus peleas también. Ivonne, Gerardo y Cuando, sinceramente, no creí que nos llevaríamos bien, ha sido una experiencia agradable.

A los amigos obtenidos del otro lado del océano. Edu, quien tan amablemente me prestó su reactor, sus bacterias y sus conocimientos. Teresa, quien se reía de mis ocurrencias, se quedaba haciéndole compañía a la loca que trabajaba hasta tarde y me prestaba su tarjeta para entrar los fines de semana. Korinna y Nacho mis queridos compañeros del Camino. Álvaro, siempre con una palabra amable cada vez que iba a recoger mis sólidos. Denisse, haciéndome sentir bienvenida en un país extraño. Angélica, con esas conversaciones circunstanciales cuando iba de visita al 2.3. Tania, intercambiando opiniones sobre gatos y manga, y riendo cuando le decía que me apodaban “La Malignidad”. Ángela y Carme, mis queridas compañeras de piso. Helena, diciendo que yo era el ruiseñor del 2.7 ya que para no aburrirme cantaba y cantaba. Miriam, cada vez que le llevaba muestras para análisis de iones me dejaba robarle un caramelo de limón. Mónica, que se rompió la cabeza las dos primeras semanas tratando de montar la técnica analítica para los nonilfenoles. Carmen Salgado, que terminó odiando los nonilfenoles después de semanas de tratar con ellos. Sonia, que nunca se enteraba a tiempo de mis aventuras. Mónica F., que tan amablemente nos dejaba comprar la comida con su tarjeta de estudiante. Celia y sus ocurrencias por aprender lo básico del verbo “chingar”.

A los amigos de toda la vida. Heidi, gracias por los amables viajes Querétaro-Apizaco-Querétaro, por todos los favores y por conservar la amistad desde hace más de 15 años. Ruth, gracias por las interminables conversaciones, por los jalones de orejas, por prestarme tu hombro cuando las situaciones me superaban emocionalmente, por mostrarme un mundo nuevo y por las “herramientas de psicoanálisis”. Landeta, gracias por la amistad, por permitirme ser parte de tu familia, es un halago que Adris y Chucho me consideren su tía, por detenerte a escuchar mis dramas y darme un consejo. Ulises D., gracias por todo el apoyo que me diste estando en Santiago, desde ir a recogerme al aeropuerto el día de mi llegada hasta tratar de ayudarme a salir de Amsterdam. Ulises G., gracias por los momentos compartidos, las charlas donde cada uno se quejaba y competía por ver a quién le iba peor en el doctorado.

A Froy, que durante mucho tiempo me brindó su apoyo hasta que la vida nos llevó a aceptar que el proyecto no era el mismo. Gracias por conservar la amistad.

A los amigos que he reencontrado en las redes sociales y que se emocionan cuando les digo que aún estoy estudiando, y añaden “Siempre fuiste buena para eso, sigue adelante”.

A la maravillosa gente que ha cruzado su camino con el mío por un momento o por una época. Que me han brindado valiosas lecciones, que me han mostrado como mis límites pueden modificarse.

A los contribuyentes, gracias a su puntual pago de impuestos este trabajo pudo llevarse a cabo.

A los que esta mala memoria ha olvidado al momento de redactar estos agradecimientos. Seguro están en una carpeta en mi cerebro pero no pude encontrar el acceso a ella.

“Nihil est in intellectu quod prius non fuerit in sensu”

Estratón de Lampsaco

CONTENIDO

I.	INTRODUCCIÓN	7
I.1.	COMPUESTOS ALTERADORES ENDOCRINOS	7
I.2.	NONILFENOL COMO ALTERADOR ENDOCRINO	9
I.2.1.	<i>Nonilfenol</i>	9
I.2.2.	<i>Vías de exposición</i>	12
I.2.3.	<i>Toxicidad y bioacumulación</i>	13
I.3.	NITRIFICACIÓN	17
I.3.1.	<i>Microbiología del proceso nitrificante</i>	17
I.3.2.	<i>Bioquímica de la nitrificación</i>	18
I.3.3.	<i>Cometabolismo</i>	22
I.4.	BIODEGRADACIÓN DEL NONILFENOL	24
I.4.1.	<i>Degradación de nonilfenol con cepas del género Sphingomonas</i>	24
I.5.	DEGRADACIÓN DE NONILFENOL CON CONSORCIOS MIXTOS	26
I.6.	TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES CON PRESENCIA DE NONILFENOL.....	29
I.6.1.	<i>Factores que afectan la remoción de nonilfenol</i>	29
I.7.	REMOCIÓN DE NONILFENOL	31
I.8.	REACTOR DISCONTINUO DE MEMBRANAS SUMERGIDAS	33
I.8.1.	<i>Reactor de membranas</i>	33
I.8.2.	<i>Reactor discontinuo secuencial</i>	35
I.8.3.	<i>Reactor discontinuo de membrana sumergida</i>	36
I.9.	JUSTIFICACIÓN.....	36
II.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	41
II.1.	HIPÓTESIS	41
II.2.	OBJETIVO GENERAL	41
II.3.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
III.	METODOLOGÍA	45
III.1.	REACTIVOS Y MATERIALES	45
III.2.	CUANTIFICACIÓN DE 4-N-NONILFENOL E ISÓMEROS DE NONILFENOL EN MUESTRAS ACUOSAS	45
III.2.1.	<i>Análisis de muestras acuosas</i>	45
III.2.2.	<i>Derivatización</i>	46
III.2.3.	<i>Cromatografía de gases acoplada a detector de espectrometría de masas (CG-EM)</i>	46
III.2.4.	<i>Cuantificación de 4-n-Nonilfenol e isómeros de nonilfenol en muestras de lodo</i>	47
III.2.5.	<i>Cálculos</i>	48
III.3.	ENRIQUECIMIENTO DE BACTERIAS NITRIFICANTES A PARTIR DE LODO ACTIVADO	50
III.3.1.	<i>Inóculo</i>	50

III.3.2.	<i>Análisis de las muestras</i>	51
III.4.	PRUEBAS DE BIODEGRADABILIDAD DE LOS ISÓMEROS DE NONILFENOL	51
III.4.1.	<i>Inóculos empleados</i>	51
III.4.2.	<i>Ensayo de biodegradabilidad</i>	52
III.4.3.	<i>Medio mineral</i>	52
III.4.4.	<i>Cálculos</i>	52
III.5.	COEFICIENTE DE SORCIÓN DE LA MEZCLA TÉCNICA DE NONILFENOLES	54
III.5.1.	<i>Sorbente</i>	54
III.5.2.	<i>Determinación del equilibrio de sorción</i>	54
III.5.3.	<i>Isoterma de adsorción</i>	54
III.5.4.	<i>Cálculos</i>	54
III.6.	REACTOR DISCONTINUO DE MEMBRANAS SUMERGIDAS	56
III.6.1.	<i>Material y equipo</i>	56
III.6.2.	<i>Prueba de adsorción</i>	57
III.6.3.	<i>Inóculo</i>	58
III.6.4.	<i>Alimentación</i>	58
III.6.5.	<i>Estrategia de operación</i>	58
III.6.6.	<i>Identificación de intermediarios</i>	59
III.6.7.	<i>Cálculos</i>	59
III.7.	FLUX CRÍTICO Y PRESIÓN TRANSMEMBRANA	61
III.7.1.	<i>Materiales</i>	61
III.7.2.	<i>Procedimiento</i>	62
III.7.3.	<i>Limpieza química</i>	62
III.8.	INHIBICIÓN CON ALITIUREA EN PRUEBAS EN LOTE.	62
III.8.1.	<i>Inóculo</i>	62
III.8.2.	<i>Biodegradabilidad de la mezcla técnica de nonilfenoles en presencia de alitiourea.</i>	63
III.9.	EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE NONILFENOL SOBRE LA ACTIVIDAD NITRIFICANTE Y NITRITO-OXIDANTE.	63
III.9.1.	<i>Inóculos</i>	63
III.9.2.	<i>Disolución tampón</i>	64
III.9.3.	<i>Ensayos en respirometría</i>	64
III.9.4.	<i>Cálculos</i>	65
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	69
IV.1.	IMPLEMENTACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS.	69
IV.1.1.	<i>Extracción de 4-n-Nonilfenol y Nonilfenoles de muestras acuosas.</i>	69
IV.1.2.	<i>Extracción de 4-n-Nonilfenol y nonilfenoles a partir de lodo seco.</i>	73
IV.1.3.	<i>Curva de referencia de 4-n-nonilfenol y mezcla de nonilfenoles en matriz sólida</i>	74
IV.2.	BIODEGRADACIÓN DE ISÓMEROS DE NONILFENOL CON TRES CONSORCIOS BACTERIANOS	76
IV.2.1.	<i>Remoción de isómeros de nonilfenol</i>	76
IV.2.2.	<i>Coefficiente de adsorción de la mezcla de isómeros</i>	79

IV.2.3.	<i>Biodegradación</i>	83
IV.3.	BIODEGRADACIÓN DE ISÓMEROS DE NONILFENOL EN UN REACTOR DISCONTINUO DE MEMBRANA SUMERGID EMPLEANDO LODO NITRIFICANTE.....	88
IV.3.1.	<i>Flux critico y presión transmembrana</i>	88
IV.3.2.	<i>Operación del MSBR</i>	93
IV.3.3.	<i>Inhibición con aliltiourea</i>	101
IV.3.4.	<i>Identificación de intermediaries</i>	103
IV.4.	EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE ISÓMEROS DE NONILFENOL SOBRE LA ACTIVIDAD NITRIFICANTE	106
V.	CONCLUSIONES GENERALES.	115
VI.	REFERENCIAS	119
VII.	PRODUCTOS DERIVADOS DE ESTA INVESTIGACIÓN	139
VII.1.	CONGRESOS	139
VII.2.	PUBLICACIONES	139
VIII.	ANEXO	143
VIII.1.	CÁLCULO DE LÍMITES DE DETECCIÓN A PARTIR DE LAS CURVAS DE REFERENCIA EMPLEADAS EN ESTE ESTUDIO.	143
VIII.1.1.	<i>4-n-NP en fase líquida ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)</i>	143
VIII.1.2.	<i>Mezcla de isómeros en fase líquida ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)</i>	143
VIII.1.3.	<i>4-n-NP en fase sólida ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)</i>	144
VIII.1.4.	<i>Mezcla de isómeros en fase sólida ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)</i>	144
VIII.2.	DATOS DE LA CUANTIFICACIÓN DE LOS ISÓMEROS DE NONILFENOL EN LA FASE LÍQUIDA Y SÓLIDA DURANTE LA DETERMINACIÓN DEL EQUILIBRIO DE SORCIÓN.....	145
VIII.2.1.	<i>Lodo nitrificante enriquecido a una relación C/N 5.0</i>	145
VIII.2.2.	<i>Lodo activado</i>	145
VIII.3.	MEMORIA DE CÁLCULO DE LOS PORCENTAJES DE BIODEGRADACIÓN, ADSORCIÓN Y REMOCIÓN DURANTE LAS PRUEBAS DE BIODEGRADABILIDAD DE LOS ISÓMEROS DE NONILFENOL CON TRES INÓCULOS DIFERENTES.....	146
VIII.4.	PRUEBA DE ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) DE LOS DATOS OBTENIDOS DURANTE LA OPERACIÓN DEL MSBR. .	149
VIII.4.1.	<i>Influyente (tNP_{inf})</i>	149
VIII.4.2.	<i>Efluente (tNP_{efl})</i>	150
VIII.4.3.	<i>Exceso de lodo (tNP_{EL})</i>	151
VIII.4.4.	<i>Porcentaje de remoción de la tNP</i>	152
VIII.4.5.	<i>Porcentaje de biodegradación</i>	153
VIII.4.6.	<i>Porcentaje de adsorción</i>	153

Indice de Figuras

Figura I.1. Ruta de degradación de los alquiflenoles polietoxilados. Tomado de Ying et al., 2002.	10
Figura I.2. Transporte de electrones en <i>Nitrosomonas europaea</i> . Las rutas establecidas están representadas con líneas continuas y las rutas hipotéticas se representan con líneas punteadas. AMO, amoniaco monooxigenasa; HAO, hidroxilamina oxidorreductasa; C-P460, citocromo P460; Q, Ubiquinona-8; Cu NiR, nitrito reductasa con cobre; CCP, citocromo c peroxidasa; NOR nitrito oxidorreductasa; Cu aa3, citocromo c oxidasa; CcM552, citocromo membranal Cc552, bc ₁ , complejo citocromo bc ₁ . Tomado de Whittaker et al. (2000).	20
Figura I.3. Reacciones catalizadas por la enzima amonio monooxigenasa de <i>Nitrosomonas</i> . Tomado de Hooper et al., 1997.	22
Figura I.4. Ciclo catalítico propuesto para la enzima amonio monooxigenasa, incluye la oxidación y reducción del sitio binuclear de cobre. Tomado de Bédard y Knowles, 1989.	23
Figura III.1. Diagrama del biorreactor discontinuo de membrana sumergida empleado en este estudio.	57
Figura IV.1. Cromatograma obtenido en modo SIM para A) 4-n-Nonilfenol + mezcla de isómeros de nonilfenol; B) Mezcla de isómeros de nonilfenol.	70
Figura IV.2. Curvas de referencia de A) 4-n-Nonilfenol y B) mezcla de isómeros de nonilfenol, en fase líquida.	71
Figura IV.3. Curvas de referencia de A) 4-n-nonilfenol, y B) mezcla de nonilfenoles en matriz sólida.	75
Figura IV.4. Evolución de la mezcla técnica de nonilfenol en función del tiempo para la fase líquida. A) Lodo nitrificante, B) Biomasa adaptada a 4-Clorofenol, y C) Lodo activado. Los círculos representan los datos experimentales y la línea el modelo ajustado.	78
Figura IV.5. Evolución de la cantidad adsorbida de tNP sobre lodo activado y lodo nitrificante. Las líneas punteada y discontinua representan el ajuste a un modelo de pseudo-segundo orden para lodo nitrificante y activado, respectivamente.	79
Figura IV.6. Isothermas de adsorción. A) Modelo de Freundlich; B) Coeficiente de adsorción. Las líneas punteada y discontinua representan el ajuste a un modelo de pseudo-segundo orden para lodo nitrificante y activado, respectivamente.	82
Figura IV.7. Promedio de tNP removido, adsorbido y degradado durante la prueba de biodegradabilidad a las 62 h y 254 h.	84

- Figura IV.8. Evolución de la mezcla técnica de nonilfenol en función del tiempo considerando las fases líquida y sólida. A) Lodo nitrificante; B) Biomasa adaptada a 4-Clorofenol; C) Lodo activado. Los círculos representan los datos experimentales y la línea, el ajuste del modelo.86
- Figura IV.9. Perfil de la presión transmembrana a cada flux probado sin limpieza química previa de la membrana.88
- Figura IV.10. Perfil de la presión transmembrana a cada flux probado después de una limpieza química de la membrana.89
- Figura IV.11. PTM y flux en las pruebas de filtración.90
- Figura IV.12. Comportamiento del flux, PTM y la permeabilidad en condiciones subcríticas para cada combinación de tiempos de succión y retrolavado. A) 36 minutos succión y 1 min retrolavado; B) 27 minutos succión y 45 segundos retrolavado; C) 18 minutos succión y 45 segundos retrolavado.92
- Figura IV.13. Concentraciones de compuestos nitrogenados durante el enriquecimiento de bacterias nitrificantes a una relación C/N=5. (■) N-NH₄⁺ en el influente; (□) N-NH₄⁺ en el efluente; (●) N-NO₃⁻ en el efluente.93
- Figura IV.14. Isómeros de nonilfenol en el influente, en el efluente y en el reactor 1 hora después del inicio del ciclo.....96
- Figura IV.15. Cantidad removida (A) y biotransformada (B) de isómeros de nonilfenol durante cuatro ciclos de operación del MSBR en las etapas II y III. El ajuste del modelo cinético de orden cero se representa por una línea continua para la etapa II y una línea discontinua para la etapa III.97
- Figura IV.16. Concentración de compuestos nitrogenados en el efluente durante la operación del MSBR.100
- Figura IV.17. Cantidad consumida de isómeros de nonilfenol. Cinética con alitiourea. Las líneas continua y discontinua representan el ajuste a un modelo cinético de orden cero.102
- Figura IV.18. Cromatogramas obtenidos durante el muestreo del ciclo de operación del MSBR. Los tiempos laterales (0 a 24 h) representan los tiempos de muestreo durante un ciclo de operación del MSBR. A) 360 mg/L N-NH₄⁺ en la alimentación; B) 40 mg/L N-NH₄⁺ en la alimentación.104
- Figura IV.19. Actividad nitrificante del enriquecimiento 'C/N 1.7 USC' a diferentes concentraciones de tNP con lodo nitrificante y mezcla de lodo nitrificante+heterótrofo (1:1) a 43 días de exposición continua a 50 µg tNP·L⁻¹. ...111

Indice de Tablas

Tabla I.1. Propiedades fisicoquímicas del nonilfenol.....	12
Tabla I.2. Cambio de energía libre en la reacción de oxidación del amoniaco	19
Tabla I.3. Cambio de energía libre en la reacción de oxidación del nitrito.	20
Tabla I.4. Constantes de biodegradación (k_1) de nonilfenol con lodo, sedimento de río y suelo.....	26
Tabla III.1. Condiciones de operación del cromatógrafo de gases.....	46
Tabla III.2. Iones seleccionados para monitorear los compuestos en modo SIM	47
Tabla III.3. Composición del medio mineral para el enriquecimiento de bacterias nitrificantes	50
Tabla III.4. Condiciones de operación del cromatógrafo de iones.....	51
Tabla III.5. Tiempos de operación del MSBR durante la prueba de adsorción	57
Tabla III.6. Tiempos de operación del MSBR	58
Tabla III.7. Muestreo realizado en el MSBR	59
Tabla III.8. Composición del medio mineral empleado para la prueba de biodegradabilidad con aliltiurea.....	63
Tabla III.9. Composición de la solución tampón para ensayos de respirometría	64
Tabla III.10. Concentraciones de nonilfenol empleadas en los ensayos respirométricos ..	65
Tabla IV.1. Tiempos retención e iones característicos de los compuestos estudiados.....	69
Tabla IV.2. Parámetros calculados para la determinación de 4-n-NP y tNP en líquido	72
Tabla IV.3. Porcentajes de recuperación de 4-n-NP y tNP en lodo.....	73
Tabla IV.4. Límites de repetibilidad	74
Tabla IV.5. Parámetros calculados para la determinación de 4-n-NP y mezcla de nonilfenoles	76
Tabla IV.6. Constantes de Freundlich (k_F y n) y coeficiente de distribución (K_D) del nonilfenol en biomasa y suelos.	81
Tabla IV.7. Constantes de degradación y porcentajes de degradación.	87
Tabla IV.8. Resumen de las etapas de operación del reactor con cambios en la concentración de alimentación de amonio ($N-NH_4^+$).....	95
Tabla IV.9. Constantes de reacción del modelo cinético de orden cero y de pseudo primer orden para los isómeros de nonilfenol y tasa de oxidación de amonio, obtenidas a una temperatura de 30 °C.....	98
Tabla IV.10. Porcentaje de consumo de isómeros de nonilfenol en ausencia y presencia de aliltiurea.....	103
Tabla IV.11. Intermediarios identificados durante la biotransformación de los isómeros de nonilfenol en el MSBR.....	105

Tabla IV.12. Actividad nitrificante y nitrito-oxidante inicial para cada enriquecimiento evaluado.....	106
Tabla IV.13. Porcentaje de inhibición de la actividad nitrificante y nitrito-oxidante para cada uno de los enriquecimientos evaluados.....	108
Tabla IV.14. Evolución de la actividad nitrificante del enriquecimiento C/N 1.7 USC durante la degradación de isómeros de nonilfenol.	109
Tabla IV.15. Actividad heterótrofa del enriquecimiento 'C/N 1.7 USC' después de 43 días de exposición continua a tNP a diferentes concentraciones de isómeros.	110
Tabla VIII.1. Cálculo del límite de detección y de cuantificación a partir de la curva de referencia para 4-n-NP en fase líquida.	143
Tabla VIII.2. Cálculo del límite de detección y de cuantificación a partir de la curva de referencia para la mezcla de isómeros de nonilfenol en fase líquida.	143
Tabla VIII.3. Cálculo del límite de detección y de cuantificación a partir de la curva de referencia para 4-n-NP en fase sólida.	144
Tabla VIII.4. Cálculo del límite de detección y de cuantificación a partir de la curva de referencia para la mezcla de isómeros de nonilfenol en fase sólida.....	144
Tabla VIII.5. Cuantificación de isómeros de nonilfenol en fase sólida y líquida, y porcentaje de recuperación.	145
Tabla VIII.6. Cuantificación de isómeros de nonilfenol en fase sólida y líquida, y porcentaje de recuperación.	145
Tabla VIII.7. Micromoles de la mezcla de isómeros de nonilfenol determinados a cada tiempo de muestreo en la fase líquida y la fase sólida para cada inóculo.	146
Tabla VIII.8. Porcentajes de remoción, adsorción y degradación de la mezcla de isómeros de nonilfenol durante la prueba de biodegradabilidad con el lodo nitrificante C/N 5.0.....	147
Tabla VIII.9. Porcentajes de remoción, adsorción y degradación de la mezcla de isómeros de nonilfenol durante la prueba de biodegradabilidad con la biomasa adaptada a 4-clorofenol.....	148
Tabla VIII.10. Porcentajes de remoción, adsorción y degradación de la mezcla de isómeros de nonilfenol durante la prueba de biodegradabilidad con el lodo activado.....	149

Abreviaturas

4-CF	4-Clorofenol
4-n-NP	4-n-Nonilfenol
AMO	Amonio monooxigenasa
AP	Alquilfenol
APE1	Alquilfenol monoetoxilado
APE2	Alquilfenol dietoxilado
APE3	Alquilfenol trietoxilado
APEC	Alquilfenol etoxicarboxilados
APEO	Alquilfenol polietoxilados
BAO	Bacterias amonio-oxidantes
BNO	Bacterias nitrito-oxidantes
CAE	Compuesto alterador endocrino
E1	Estrona
E2	17 β -estradiol
EE2	Etinilestradiol
EFS	Extracción en fase sólida
FISH	Hibridación fluorescente <i>in situ</i>
HAO	Hidroxilamina oxidorreductasa
MBR	Biorreactor de membrana
MSBR	Reactor discontinuo de membrana sumergida
NAD ⁺	Forma oxidada del dinucleótido de nicotinamida-adenina

NADH	Forma reducida del dinucleótido de nicotiamida-adenina
NADPH	Forma reducida del dinucleótido de nicotinamida-adenina fosfato
NOAEL	Nivel de efectos no adversos
NOR	Nitrito oxidorreductasa
NP	Nonilfenol
NPEO	Nonilfenol polietoxilados
NP9EO	Nonilfenol nonaetoxilado
OD	Oxígeno disuelto
OP	Octilfenol
OPEO	Octilfenol polietoxilados
pNP	<i>para</i> -Nonilfenol
PPCP	Fármacos y productos de higiene personal
PTM	Presión transmembrana
SBR	Reactor discontinuo secuencial
SSLM	Sólidos suspendidos de licor mezclado
SST	Sólidos suspendidos totales
SSV	Sólidos suspendidos volátiles
tNP	Mezcla técnica de nonilfenol
TNPP	Trisnonilfenil fosfito
TRH	Tiempo de retención hidráulico
TRS	Tiempo de retención de sólidos
USEPA	Agencia de protección al medio ambiente de Estados Unidos

Notación

$\%tNP_{\text{Adsorbido}}$	Porcentaje de mezcla de isómeros adsorbido en lodo
$\%tNP_{\text{Biodeg}}$	Porcentaje de biodegradación de mezcla de isómeros
$\%tNP_{\text{Remov}}$	Porcentaje de mezcla de isómeros removido
b	Valor de la ordenada al origen de la curva de calibración
C_0	Concentración inicial del compuesto
C_e	Concentración del compuesto en la fase líquida, en el equilibrio
C_L	Concentración neta del analito
f_d	Fracción celular de desecho
k	Múltiplo de la desviación estándar del blanco de acuerdo al nivel de
k_0	Constante de velocidad de reacción de orden cero
k_1	Constante de velocidad de reacción de primer orden
k_2	Constante de adsorción de pseudo-segundo orden
k_d	Coefficiente de decaimiento para bacterias heterótrofas
k_{dn}	Coefficiente de decaimiento para bacterias nitrificantes
k_F	Coefficiente de adsorción de Freundlich
k_{obs}	Tasa de transformación
K_D	Coefficiente de distribución
L	Número de réplicas de los patrones de calibración empleados
m	Valor de la pendiente de la curva de calibración
m_e	Valor de la pendiente de la respiración endógena
m_t	Valor de la pendiente de la respiración total
n	Coefficiente de regresión del modelo de adsorción de Freundlich
N	Número de patrones de calibración empleados

q	Concentración del compuesto adsorbida en el tiempo 't'
q_e	Concentración de equilibrio de adsorción
Q_0	Flujo volumétrico en el influente
Q_e	Flujo volumétrico en el efluente
Q_{EL}	Flujo volumétrico de exceso de lodo
r	Valor límite de repetibilidad
S_0	Desviación estándar del blanco
S_b	Desviación estándar de la ordenada al origen de la curva de
S_{inf}	Concentración de mezcla de isómeros en el influente
S_e	Concentración de mezcla de isómeros en el efluente
S_m	Desviación estándar de la pendiente de la curva de calibración
S_r	Desviación estándar de las repeticiones
S_Y	Desviación de los residuales de la curva de calibración
SS_0	Concentración de sólidos suspendidos en el influente
SS_e	Concentración de sólidos suspendidos en el efluente
t	Tiempo
$t_{1/2}$	Vida media
tNP	Cantidad de mezcla de isómeros al tiempo 't'
tNP_0	Cantidad de mezcla de isómeros de nonilfenol al inicio
tNP_{inf}	Flujo másico en el influente
tNP_{eff}	Flujo másico en el efluente
tNP_{EL}	Flujo másico de exceso de lodos
$tNP_{líquido}$	Cantidad de mezcla de isómeros de nonilfenol en fase líquida
$tNP_{sólido}$	Cantidad de mezcla de isómeros de nonilfenol en fase sólida

V_R	Volumen del reactor
x	Concentración de los patrones de calibración
\bar{X}	Valor de la media de las concentraciones de los patrones de calibrado
Y	Rendimiento de biomasa para bacterias heterótrofas
Y_n	Rendimiento de biomasa para bacterias nitrificantes

Resumen

El objetivo de este trabajo fue evaluar la degradación de isómeros de nonilfenol empleando bacterias nitrificantes en un reactor discontinuo de membrana sumergida. Los reactores con membrana representan una de las más prometedoras innovaciones en el campo del tratamiento de aguas residuales, dada su alta eficiencia en la remoción de materia orgánica y nutrientes. Además, al manejar mayores tiempos de retención de sólidos, comparado con los sistemas de lodos activados, se incrementa la biodegradación de los microcontaminantes al enriquecer la biodiversidad de la población microbiana con bacterias de lento crecimiento.

Como el nonilfenol es un compuesto hidrofóbico, el reto en el biorreactor es diferenciar la biodegradación real de fenómenos fisicoquímicos como la adsorción y la volatilización. Por tanto, como primera etapa, se desarrollaron e implementaron las técnicas analíticas para determinar la cantidad de isómeros presente en fase líquida y en fase sólida. Para la fase líquida se empleó la extracción en fase sólida, seguida de derivatización e inyección en cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas. El límite de detección y de cuantificación obtenidos fueron de $1.75 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y $5.31 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para 4-n-NP y de $4.24 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y $12.8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para la mezcla de isómeros. La cuantificación de nonilfenol en fase sólida requirió el desarrollo y evaluación de dos metodologías, extracción con solventes empleando ultrasonido y empleando microondas. De los resultados obtenidos se observó que no hubo diferencia significativa entre ambas metodologías. Por su practicidad, se optó por la extracción con solventes empleando ultrasonido. El límite de detección y cuantificación obtenidos fueron de $0.032 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ y $0.096 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ para el isómero lineal y de $0.104 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ y $0.316 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ para la mezcla de isómeros. Los valores obtenidos en cada metodología son comparables a lo reportado en literatura.

Una vez que las metodologías fueron validadas se decidió evaluar la capacidad de tres inóculos para biodegradar la mezcla de isómeros de nonilfenol. Los inóculos evaluados fueron lodo activado, lodo nitrificante y biomasa adaptada a 4-Clorofenol. Partiendo de una concentración inicial de $100 \mu\text{g tNP}\cdot\text{L}^{-1}$, se observó que los tres consorcios bacterianos son capaces de remover el compuesto. Este proceso se dio por dos mecanismos: biodegradación y adsorción. Para el lodo activado, el principal mecanismo de remoción fue la adsorción, alcanzando un 44% al término de la prueba. La degradación en este inóculo sólo representó un 18%. Por el contrario, las bacterias nitrificantes presentaron el mayor porcentaje de degradación (43%) y el mecanismo de adsorción aportó sólo un 36.5%. En el caso de la biomasa adaptada a 4-Clorofenol, los porcentajes calculados para los mecanismos de degradación y adsorción fueron similares, 34.4% y 33.6%, respectivamente.

Un reactor discontinuo secuencial de membrana sumergida se operó durante 284 ciclos, a un tiempo de retención de sólidos de 20 d. El inóculo empleado fue biomasa nitrificante enriquecida a una relación C/N igual que 5. Se cuantificaron los isómeros de nonilfenol en la fase líquida y sólida. Durante la operación del reactor, dos concentraciones de nitrógeno amoniacal fueron alimentadas a fin de evaluar el efecto sobre la degradación de los isómeros de nonilfenol. Se observó que al disminuir la concentración inicial de N-NH_4^+ en el biorreactor, el porcentaje de degradación disminuyó en 9%. Aunque el consumo de isómeros por la biomasa fue superior al 75%, no se presentó una completa degradación del compuesto. Experimentos adicionales, inhibiendo la actividad de la enzima amonio-monooxigenasa, mostraron que las bacterias amonio-oxidantes son las responsables de la oxidación inicial del nonilfenol.

A lo largo de la operación del biorreactor se observó que la actividad nitrito-oxidante disminuyó hasta desaparecer en la última etapa de operación. Esto llevó a evaluar el efecto de la concentración de los isómeros de nonilfenol sobre biomasa nitrificante enriquecida a diferentes relaciones C/N. Se observó que las condiciones de enriquecimiento influyen en la sensibilidad de las bacterias al contaminante. Los valores de IC_{50} obtenidos para la actividad nitrificante fueron de $310 \mu\text{g tNP}\cdot\text{L}^{-1}$ (C/N 1.7 USC) y $407 \mu\text{g tNP}\cdot\text{L}^{-1}$ (C/N 1.7 UNAM). Para la actividad nitrito-oxidante, sólo el enriquecimiento C/N 5.0 presentó un porcentaje de inhibición superior al 50%, calculándose un valor de IC_{50} de $491 \mu\text{g tNP}\cdot\text{L}^{-1}$.

Summary

This study was focused on the degradation of nonylphenol isomers using nitrifying bacteria in a membrane sequencing batch reactor. Membrane reactors are one of the most promising innovations in the field of wastewater treatment because of the high efficiency in removal organics and nutrients. Moreover, the possibility to increase biodegradation of micropollutants because of the higher solids retention times, in comparison to conventional activated sludge treatment, increases the biodegradation of those compounds to augment diversity of the microbial population.

Since nonylphenol is a hydrophobic compound, the challenge is to distinguish the real biodegradation from abiotic physico-chemical phenomena like adsorption and volatilization, during the membrane bioreactor system. In order to achieve it, the analytical techniques to measure the amount of isomers in the liquid phase and on solid phase were implemented. For liquid phase, solid phase extraction, followed by derivatization and injection into gas chromatograph coupled to mass spectrometer was used. The limit of detection and quantification obtained were between $1.75 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and $5.31 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for 4-n-NP, and for the mixture of isomers those values were between $4.24 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and $12.8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. These results are comparable with those found in literature. Quantification of nonylphenol on solid phase required the development and evaluation of two methods of extraction with solvents. One of them is extraction by ultrasonic, another use microwaves as method of extraction. The results showed no significant difference between the methodologies. Solvent extraction ultrasonic-assisted was employed for the quantification of the isomers of nonylphenol adsorbed on biomass. The limit of detection and quantification obtained were between $0.032 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ and $0.096 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ for 4-n-NP, and for the mixture of isomers those values were between $0.104 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ and $0.316 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. These results are comparable with those found in literature.

The ability to biodegrade an isomer mixture of nonylphenol was evaluated with three inocula. Activated sludge, enriched nitrifying sludge, and adapted 4-Chlorophenol biomass were used. With an initial concentration of $100 \mu\text{g tNP}\cdot\text{L}^{-1}$, the three bacterial consortia showed ability for removing the compound. That removal process occurred by two mechanisms: biodegradation and adsorption. For activated sludge, the main removal mechanism was adsorption, reaching 44% at the end of the test. The degradation in this inoculum was only 18%. Otherwise, nitrifying bacteria showed the highest percentage of degradation (43%) and the percentage of adsorption was only 36.5%. In regard to adapted 4-chlorophenol biomass, the percentages calculated for adsorption and degradation mechanisms were similar, 34.4% and 33.6% respectively.

A membrane sequencing batch reactor was operated during 284 cycles, with a solids retention time of 20 days. Enriched nitrifying biomass at C / N equal to 5 was used as inoculum. Isomers of nonylphenol in the liquid and solid phases were quantified. During reactor operation, two concentrations of nitrogen were fed to evaluate their effect on the degradation of the isomers of nonylphenol. Decreasing the initial concentration of N-NH_4^+ in the bioreactor generated a decrease in degradation of 9%. Although the consumption of isomers of nonylphenol was greater than 75%, a complete degradation of the compound was not observed. Additional experiments were performed inhibiting the activity of the enzyme ammonium monooxygenase. The results showed that ammonium-oxidizing bacteria were responsible for the initial oxidation of nonylphenol.

In the course of operation of the bioreactor, a decline of nitrite-oxidizing activity until its fade-out in the final stage of operation was observed, which is why the effect of the concentration of isomer of nonylphenol on enriched nitrifying biomass at different C/N ratios was evaluated. It was noted that enriched conditions of each consortia have an influence over the sensitivity of bacteria to the micropollutant. The IC_{50} values obtained for the nitrifying activity were $310 \text{ mg tNP}\cdot\text{L}^{-1}$ (C/N 1.7 USC) and $407 \text{ mg tNP}\cdot\text{L}^{-1}$ (C/N 1.7 UNAM). For nitrite-oxidizing activity, only the enriched nitrifying biomass at C/N ratio of 5.0 showed an inhibition percentage greater than 50%, the calculated IC_{50} value was $491 \text{ mg tNP}\cdot\text{L}^{-1}$.

Introducción

I. Introducción

1.1. Compuestos alteradores endocrinos

El sistema endocrino junto con el sistema nervioso y el inmune regulan las funciones en humanos y animales. Las hormonas influyen en los mecanismos de regulación, desarrollo, crecimiento y homeostáticos de los organismos. De tal manera que regulan la estructura y función reproductiva, mantienen en niveles normales las concentraciones de glucosa e iones en sangre, controlan el metabolismo corporal, la presión sanguínea, además de otras funciones de los sistemas glandular y nervioso. Entre las principales glándulas endocrinas se pueden mencionar a la pituitaria, la tiroides, el páncreas, los testículos y los ovarios. Otros tejidos endocrinos incluyen a la placenta, el hígado, el riñón y las células del tracto gastrointestinal. Algunos de los órganos y tejidos bajo control endocrino incluyen a las glándulas mamarias, los huesos, los músculos, el sistema nervioso y a los órganos reproductores femenino y masculino.

En 1991, la Comisión Ambiental Europea definió a los compuestos alteradores endocrinos (CAE) como sustancias exógenas que causan efectos adversos a la salud de un organismo intacto o a su progenie como consecuencia de cambios en la función endocrina (Fawell et al., 2001). La Agencia de Protección del Medio Ambiente de Estados Unidos define a estos compuestos como agentes exógenos que interfieren en la síntesis, secreción, transporte, acción o eliminación de hormonas naturales en el cuerpo que son responsables del mantenimiento de la homeostasis, reproducción, desarrollo y/o comportamiento (USEPA, 1997). El catálogo de alteradores endocrinos es muy amplio y crece día a día, dicho catálogo comprende desde sustancias que se encuentran de manera natural en el medio ambiente hasta productos químicos sintetizados por el hombre.

Cuando los alteradores endocrinos ambientales mimetizan o interfieren con la acción de las hormonas endógenas, tienen el potencial de influir en la salud humana y ejercer significativos efectos ecológicos dada su capacidad de actuar a diferentes niveles. Así pues, deterioran el control hormonal al:

- Alterar la síntesis hormonal
- Alterar el almacenamiento y/o liberación hormonal
- Alterar el transporte y depuración hormonal
- Alterar la identificación y enlace con el sitio receptor
- Alterar la respuesta hormonal debida a la activación del sitio receptor.

La presencia de compuestos alteradores endocrinos en las aguas residuales es uno de los retos pendientes en el control medioambiental. Forman parte de los denominados contaminantes emergentes y se encuentran muy extendidos en ríos y lagos, ya que se dispersan a través de las aguas residuales. Durante los últimos años, se han identificado numerosos compuestos alteradores endocrinos y sus metabolitos tanto en aguas residuales como en ríos y otras corrientes superficiales e incluso en aguas potables tratadas. El control de estos contaminantes resulta particularmente difícil debido a la gran dispersión de sus fuentes de emisión que van desde los residuos domésticos, hospitalarios e industriales hasta los vertidos procedentes de la actividad agrícola y ganadera. Los procesos de tratamiento tienen un impacto sobre la remoción de los alteradores endocrinos y los fármacos y productos de higiene personal (PPCP, por sus siglas en inglés), sin embargo, compuestos como la carbamezapina son extremadamente persistentes y se han encontrado incluso en agua potable. Procesos como la oxidación avanzada y la filtración han mostrado, en estudios a escala piloto y escala real, su efectividad para remover o reducir la concentración de estos productos (Kleywegt et al., 2007).

En las últimas décadas se han realizado esfuerzos intensivos para estudiar la amplia variedad de efectos que pueden ser atribuidos a los alteradores endocrinos tanto en humanos como en la fauna. Muchas poblaciones animales han sido afectadas ya por estas sustancias. Entre las repercusiones figuran la disfunción tiroidea en aves y peces; la disminución de la fertilidad en aves, peces, crustáceos y mamíferos; la disminución del éxito de la incubación en aves, peces y tortugas; graves deformidades de nacimiento en aves, peces y tortugas; anormalidades metabólicas en aves, peces y mamíferos; anormalidades de comportamiento en aves; desmasculinización y feminización de peces, aves y mamíferos machos; defeminización y masculinización de peces y aves hembras; y peligro para los sistemas inmunitarios en aves y mamíferos.

Además, la exposición del hombre a los alteradores endocrinos es masiva y universal como consecuencia del empleo mundial de estos compuestos en el revestimientos de las latas de alimentos, en el plástico con el que se fabrican los biberones, en el espermicida que llevan incorporado los preservativos, en algunos materiales de uso sanitario, en detergentes industriales, filtros solares, cosméticos y plaguicidas. Las formas de exposición y las vías de entrada de los CAE son muy diversas, pero debido a su acumulación en la cadena alimentaria, la vía digestiva es la principal ruta de exposición para el hombre. Los CAE se acumulan en el organismo y pueden actuar a pesar de que la exposición no haya tenido lugar en el momento crítico. Contribuyen a ello su baja biodegradabilidad, el transporte a otros lugares por el aire y el agua, y la bioacumulación en la cadena trófica. Además, los

compuestos acumulados en el tejido adiposo son transmitidos a la descendencia a través de la madre durante la gestación y después por la lactancia (Jensen et al., 1995; Tilson y Kodavanti, 1997; Crisp et al., 1998; Schmutzler et al., 2004).

1.2. Nonilfenol como alterador endocrino

1.2.1. Nonilfenol

Los surfactantes no iónicos, entre los que se encuentran los nonilfenol y octilfenol etoxilados (NPEO y OPEO), se emplean en una amplia variedad de aplicaciones, las cuales incluyen la fabricación de detergentes, limpiadores, desengrasantes, emulsificantes, agentes humectantes, adhesivos, agroquímicos, plaguicidas caseros, cosméticos, formulaciones para el procesamiento de papel, textiles, pinturas y recubrimientos, entre otros.

Los alquilfenoles polietoxilados (APEO) son hidrofílicos en un extremo de la molécula e hidrofóbicos en el extremo opuesto. La cabeza hidrofílica atrae el agua y la cola hidrofóbica atrae las sustancias poco solubles como aceites y grasas. Esta habilidad para atraer simultáneamente agua y sustancias hidrofóbicas convierte a este tipo de compuestos en útiles surfactantes. La demanda estadounidense en 2007 fue de 3400 millones de kilogramos de surfactantes. El consumo estimado de NPEO en Estados Unidos y Canadá se sitúa entre los 136 a 181 millones de kg anuales (USEPA, 2008). Para el 2010, la demanda estimada de nonilfenol en los Estados Unidos ascendió a 172x10⁶ kg (USEPA, 2009a, 2009b).

En Estados Unidos, la USEPA ha establecido un criterio de calidad del agua para el nonilfenol de 6.6 µg·L⁻¹ para breves exposiciones y de 1.7 µg·L⁻¹ para exposiciones crónicas. De manera similar, la agencia ambiental canadiense ha establecido un nivel de 0.7 µg·L⁻¹ de nonilfenol para exposiciones “indefinidamente crónicas” (CEQG, 2002; USEPA, 2005).

Se ha determinado que cerca del 60% de los APEO termina en el ambiente acuático, principalmente como parte del tratamiento de residuos donde la degradación de estos compuestos se lleva a cabo a través de un mecanismo que involucra la pérdida del grupo etoxilado (Figura 1.1). Esta biodegradación produce alquilfenoles de cadena corta, alquilfenoles etoxicarboxilados (APEC) y los alquilfenoles como el nonilfenol (NP) y el octilfenol (OP) y los alquilfenoles mono a trietoxilados (APE1, APE2 y APE3). Las propiedades particulares de cada nonilfenol polietoxilado dependen del número de grupos etoxilados que le son añadidos, variando desde unos pocos hasta cerca de cien. Los NPEO más comúnmente usados son aquellos que tienen de 8 a 10 grupos etoxilados, lo que los

hace altamente solubles en agua. Con menos de tres grupos etoxilados, el material es menos soluble en agua

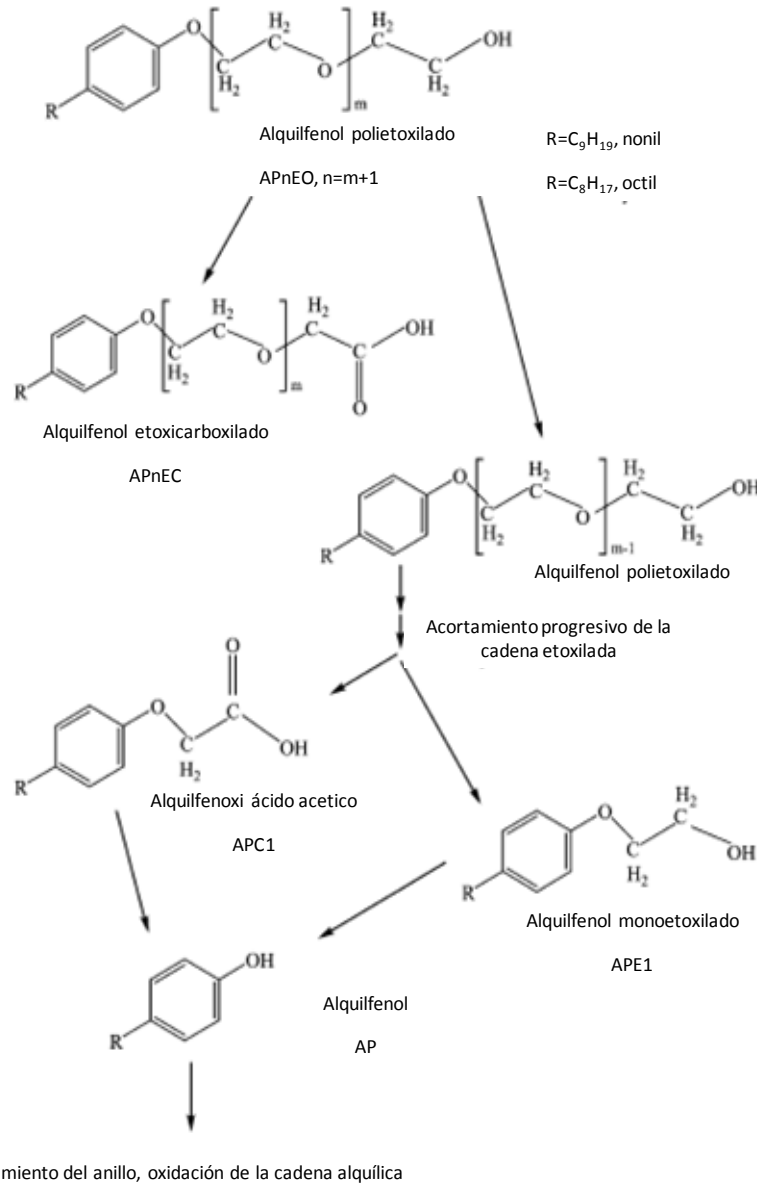


Figura I.1. Ruta de degradación de los alquilfenoles polietoxilados. Tomado de Ying et al., 2002.

El nonilfenol es un compuesto xenobiótico formado por un anillo de fenol y una cadena de nueve carbonos en la posición *para*. Se estimaba que las descargas directas de compuestos derivados de nonilfenol provenientes del sector industrial en Canadá en 1996 eran del 0.5% (96 ton) de la producción total (Soares et al., 2008). La mayoría de las

investigaciones enfocadas a la identificación del nonilfenol en ambientes acuáticos concuerdan en que su presencia es el resultado de actividades antropogénicas. La principal fuente de contaminación por nonilfenol en cuerpos acuíferos, océanos y sedimentos está relacionada con la descarga de los efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales, la proximidad de las áreas urbanas e industriales, entre otras (Ahel et al., 1994; Hale et al., 2000).

En la producción de NPEO se emplean mezclas técnicas de nonilfenol. La mayoría de las estructuras pueden identificarse empleando métodos analíticos como CGxCG-EM o CL/CL-EM (Moeder et al., 2006; Zhang et al., 2007). La mezcla técnica de nonilfenol está compuesta por más de 100 isómeros que difieren en la estructura y posición del fragmento alquílico unido al anillo fenólico. Se ha reportado que más del 90% de la mezcla está conformado por nonilfenoles *para*-sustituídos (Ieda et al., 2005) La mezcla técnica está formada por isómeros que son recalcitrantes a la biodegradación ya que más de 85% de ellos presentan una estructura cuaternaria en el carbono α de la cadena alquílica ramificada, de tal manera que la estructura resultante es estable y resistente a la ω - y β -oxidación (Wheeler et al., 1997).

La diferencia en concentraciones de nonilfenol que se puedan encontrar en cada elemento del medio ambiente (suelo, agua, aire) se debe a sus características fisicoquímicas, lo que también influye en su degradación. El NP es un compuesto hidrofóbico dada la presencia de la cadena nonil ($\log K_{ow} = 4.48$) (Tabla I.1) por lo tanto, tiende a adsorberse en diversos materiales siendo favorable su adsorción en suelos y en el lodo biológico de los sistemas de tratamiento de aguas residuales (Ahel et al., 1993; John et al., 2000). Esta fuerte adsorción puede llevar a errores en la cuantificación de la concentración de NP en muestras ambientales así como en medio mineral. Este comportamiento ha llevado a diversos autores a sobreestimar las tasas de degradación del nonilfenol (Clara et al., 2005a; Terzic et al., 2005).

Generalmente, la remoción de microcontaminantes por mecanismos como la volatilización durante el proceso de tratamiento depende de la constante de Henry y el coeficiente de partición octanol/agua de dicho microcontaminante y se vuelve significativa cuando la constante de Henry se encuentra entre 10^{-2} y 10^{-3} (Stenstrom et al., 1989). La tasa de volatilización se ve afectada por la velocidad de flujo del gas empleado en la aireación, por lo que la presencia de nonilfenol en la atmósfera está directamente relacionada con la operación de plantas de tratamiento (Cincinelli et al., 2003).

Tabla I.1. Propiedades fisicoquímicas del nonilfenol

Fórmula condensada:	$C_{15}H_{24}O$
Peso molecular:	$220.34 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Densidad a 25 °C:	$0.925 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$
Solubilidad en agua:	$4.9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$
pKa:	10.28
log Kow:	4.48
Presión de vapor a 25 °C:	$2.07 \times 10^{-2} \text{ Pa}$
Punto de ebullición:	310 °C
Viscosidad a 20 °C:	3160 mPa·s
Constante de Henry:	$8.39 \times 10^{-1} \text{ Pa}\cdot\text{m}^3\cdot\text{mol}^{-1}$

Fuente: Cirja, 2007

1.2.2. Vías de exposición

La exposición del hombre a los nonilfenoles polietoxilados y al nonilfenol se puede dar por la absorción cutánea, la ingestión de alimentos contaminados o por inhalación. La ruta oral es significativa, ya que incluye al agua potable, alimentos marinos contaminados, por la migración del NP hacia los alimentos desde los materiales de envasado y empaçado o indirectamente a través del lodo que se emplea como reconstituyente de suelos.

Al parecer la dieta es la principal fuente de consumo humano de alquilfenoles polietoxilados. Un estudio alemán encontró que las concentraciones de nonilfenol en muestras alimentarias se situaban entre 0.1 y $19.4 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Guenther et al., 2002), esta amplia variedad en las concentraciones del NP es independiente del contenido de grasa y de los materiales de empaque. En muestras de comida de Taiwán, las concentraciones de nonilfenol se ubicaron en un rango de 5.8 a $235 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Lu et al., 2007). Ferrara et al. (2005) cuantificaron una concentración media de nonilfenol de $354 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ en comida marina italiana. Diversas hipótesis se manejan con respecto al origen de esta contaminación en los alimentos, una de ellas tiene su origen en el hecho de que los NPEO se emplean como surfactantes no iónicos en los agentes desinfectantes o como emulsificantes en las formulaciones de los plaguicidas. Después de su aplicación en la industria agrícola y alimentaria, la degradación de los nonilfenoles polietoxilados podría llevar a la acumulación de NP en alimentos. Otra fuente puede encontrarse en los materiales plásticos de envasado desde donde el nonilfenol, empleado por ejemplo en el trisnonilfenil fosfito (TNPP) como antioxidante, podría migrar hacia los alimentos (McNeal et al., 2000).

Los niveles de nonilfenol en diferentes materiales de envasado se estudiaron recientemente y se encontraron en un rango entre 0.03 a 287 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ en agua embotellada en PET (Fernandes et al., 2008). También se detectaron niveles de nonilfenol superiores a 78 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ en botellas de agua mineral embotellada en PET (Toyo'Oka y Oshige, 2000), concentraciones por arriba de 40 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ en leche ultrapasteurizada en envase de cartón y superiores a 32.3 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ en leche embotellada en polietileno de alta densidad (HDPE) (Casajuana y Lacorte, 2004).

El análisis de muestras de leche materna y leche de vaca en Taiwán mostró la presencia de 4-n-nonilfenol en estos productos, y aunque dadas las concentraciones cuantificadas, 1.7 a 11.6 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ para leche materna y 2.9 a 8.8 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ para leche de vaca, la ingesta de 4-n-nonilfenol no excede el nivel de efectos no adversos (NOAEL, por sus siglas en inglés) estimado en diversas investigaciones, aún debe discutirse la actividad estrogénica de dicho compuesto considerando que la leche es el principal alimento de los neonatos y muchos adultos (Lin et al., 2009).

1.2.3. Toxicidad y bioacumulación

Los xenoestrógenos deben competir con el estrógeno natural al enlazarse con el sitio activo del receptor, por lo que se requiere que los xenoestrógenos conserven cierta estructura esencial para unirse. Se ha observado que la afinidad del receptor de estrógeno por los alquilfenoles se incrementa al aumentar la longitud de la cadena del grupo alquílico, independientemente del grado de ramificación que presente (Tabira et al., 1999). Se sabe que el nivel de hidrofobicidad de los alquilfenoles es directamente proporcional a la longitud de la cadena alquílica. Así pues, n-octilfenol y n-nonilfenol resultan ser las moléculas más afines al receptor de estrógeno debido a la estructura química, donde el fenol y la cadena alquílica se combinan covalentemente. El 17β -estradiol (E2) requiere un grupo hidroxilo libre del fenol para enlazarse con el receptor del estrógeno, esta característica también es necesaria en los alquilfenoles los cuales exhiben una afinidad de enlace al receptor de estrógeno mayor que la que presenta el fenol (Tabira et al., 1999).

Otros estudios han mostrado que la mayor potencia estrogénica relativa se asoció con un alquilfenol *para*-sustituido, siendo las sustancias con más de una cadena lateral las que presentaron una menor afinidad y potencia estrogénica. Por lo tanto, la potencia fue mayor para los alquilfenoles ramificados en el α -carbono y con una cadena lateral de 8 a 9 carbonos. El 4-*tert*-octilfenol es el alquilfenol más potente por lo que se ha sugerido que la baja actividad estrogénica del *p*-nonilfenol comparada con la que presenta el 4-*tert*-octilfenol

puede deberse a la heterogeneidad en sus isómeros (Routledge y Sumpter, 1997). Estudios con mezclas técnicas de nonilfenol han mostrado que los isómeros con ramificaciones en la cadena alquílica exhibieron mayores potencias y eficacias estrogénicas que los isómeros no ramificados o cuya ramificación se ubica al final de la cadena alquílica. De igual manera, los isómeros que tienen un grupo etilo en el α -carbono de la cadena lateral exhiben una clara potencia estrogénica, mientras que los isómeros con un grupo metilo en dicha posición presentan poca o ninguna actividad estrogénica (Preuss et al., 2006). Esta característica parece ser importante en la relación estructura-actividad de los alquilfenoles.

En comparación con el estrógeno natural E2, el NP tiene una respuesta estrogénica aproximadamente 1000 a 100 000 veces menor (Müller y Schlatter, 1998; Moffat et al., 2001; White et al., 1994; Servos, 1999). También se ha observado a través de estudios *in vitro*, que el nonilfenol nonaetoxilado (NP9EO) tiene una respuesta estrogénica menor a la del nonilfenol por 1 a 3 órdenes de magnitud, sugiriendo que en los nonilfenoles polietoxilados el efecto estrogénico parece disminuir conforme aumenta el número de grupos etoxilados (Servos, 1999; Sohoni y Sumpter, 1998). En células humanas de cáncer de seno MCF-7, la proliferación de éstas se consiguió estimulándolas con OP, NP, NP2E y NP1EC (Blom et al., 1998; White et al., 1994).

Soto et al. (1991) accidentalmente observaron que el nonilfenol, el cual se empleaba en la manufactura de tubos de prueba empleados en sus experimentos, era capaz de iniciar la proliferación de células de tumores de seno de manera similar a los estrógenos que para ese fin se empleaban. De igual manera, se encontró que el nonilfenol mimetiza a la hormona natural 17β -estradiol al competir por el sitio de unión del receptor (White et al., 1994) debido a la similitud en sus estructuras. Sin embargo, no todos los isómeros del nonilfenol son capaces de inducir la actividad estrogénica, al parecer es determinante que la posición cadena alquílica se encuentre en la posición *para*- con respecto al grupo hidroxilo del fenol (Tabira et al., 1999; Kim et al., 2004).

En la actualidad, se han desarrollado numerosos procedimientos para estudiar el efecto del nonilfenol sobre el sistema endocrino. Las pruebas *in vitro* son baratas, consumen menos tiempo y generalmente requieren menos especialización. Entre los sistemas que se han desarrollado se encuentran ensayos con células recombinantes de levadura, células de hepatocitos de peces y células humanas de cáncer de seno (MCF-7). El ensayo con células recombinantes de levadura es el procedimiento más ampliamente usado para los análisis de rutina pero su límite de detección es más bajo en comparación con las células MCF-7.

Las pruebas *in vivo* son mucho más precisas para estudiar el efecto de los xenoestrógenos, ya que se deben considerar muchas variables como supervivencia, crecimiento, desarrollo sexual secundario, peso, vitelogenina, esteroides secundarios en el plasma, fecundidad, viabilidad de los gametos e histología. El mecanismo de acción se puede estimar midiendo a través del tiempo las concentraciones de vitelogenina, las características secundarias sexuales y la histología de los órganos sexuales. Los efectos adversos en las poblaciones pueden predecirse al medir las tasas de supervivencia, crecimiento y reproducción, así como la proporción entre machos y hembras. Sin embargo, este tipo de pruebas consumen tiempo, son caras y requieren equipo altamente especializado sin mencionar que el potencial de error de estimación incrementa.

Los efectos del nonilfenol sobre la fauna se han estudiado ampliamente a lo largo de los años. Por ejemplo, el nonilfenol era capaz de inducir la producción de proteínas femeninas en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) a $20.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Jobling et al., 1996), en el pez medaka (*Oryzias latipes*) expuesto a $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de nonilfenol (Tabata et al., 2001). Sin embargo, Watanabe et al. (2004) han revelado recientemente que no está claro si todos los efectos del nonilfenol en los organismos se deben únicamente a su actividad estrogénica. Estos investigadores observaron que bajas dosis de nonilfenol ($0.5\text{-}5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) tuvieron efecto sobre las células del útero de ratones y los mismos genes se activaron con el 17β -estradiol y el nonilfenol.

En un estudio de exposición a nonilfenol por vía oral a ratas Sprague-Dawley durante dos generaciones con dosis de 2, 10 y $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, se observaron incrementos en el peso del hígado y riñón en machos bajo la dosis más alta, sin embargo, este fenómeno no se observó en las hembras (Nagao et al., 2001). En la generación F0, además del incremento de peso en hígado y riñón en machos, se encontró un incremento relativo del peso del cerebro, pulmones, glándula tiroidea y pituitaria y una disminución en el peso relativo del timo. En hembras hubo un menor peso relativo en los ovarios tanto en las generaciones F0 y F1 a una dosis de $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$.

Investigaciones *in situ* han establecido que las anormalidades en las carpas macho como el bajo índice gonadosomático, el incremento en la vitelogenina plasmática (VTG), la disminución en los niveles de testosterona y las alteraciones histológicas en las gónadas sugieren la presencia de xenoestrógenos en el río (Lavado et al., 2004). Petrovic et al. (2002) han reportado que existe una correlación entre la producción de VTG y las anormalidades en las gónadas de las carpas macho y la presencia de compuestos nonilfenólicos en los ríos que reciben los efluentes de las plantas de tratamiento.

De Jager et al. (1999) suministraron dosis orales de nonilfenol (0, 100, 250 y 400 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) a ratas hembra durante el periodo de gestación y hasta el destete (tercera semana después del parto) y a las crías macho desde el destete hasta la madurez (10 semanas de edad) se les suministró NP a dosis de 1, 100 y 250 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, para determinar tanto los efectos sobre la “maternidad” como los efectos sobre el aparato reproductor masculino. Dentro de los resultados que obtuvieron estos investigadores se puede destacar la ausencia de descendencia en el grupo que recibió la dosis más alta, así como una disminución en el peso corporal y en la masa testicular, de igual manera se observaron efectos estructurales en los órganos reproductivos en dosis de 100 y 250 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$. Nagao et al. (2000), después de inyectar subcutáneamente una 500 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ a ratas recién nacidas (1 a 5 días) se evaluaron los efectos sobre la función reproductiva después de la pubertad. Estos efectos incluyen alteraciones del ciclo hormonal e histopatológicas en los ovarios y el útero. En machos, hubo un menor número de células en los túbulos seminíferos y un incremento de células germinales dañadas en los epidídimos. No se encontraron efectos adversos en la movilidad de los espermatozoides o en el nivel de testosterona en plasma.

En Taiwán, 786 estudiantes entre los 10 y los 15 años participaron en un estudio que pretendía correlacionar el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios y la presencia de NP en sus organismos. El promedio de edad fue de 12.3 años. Alrededor de 30% de las muestras de orina analizadas mostraron la presencia de nonilfenol en concentraciones hasta de 178.25 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de creatinina. Los investigadores concluyeron que la exposición a nonilfenol pudo causar alguna perturbación en el desarrollo sexual, además de que las niñas muestran más sensibilidad a dichas perturbaciones que los niños (Chen et al., 2009)

La exposición a diversos microcontaminantes presentes en la leche materna se ha asociado a efectos sobre el sistema regulador hipotálamo-pituitaria-tiroides (Koppe et al., 1991; Pluim et al., 1994). Otros estudios mostraron que las elevadas concentraciones de alteradores endocrinos en leche materna junto con una dieta rica en comida marina ocasionan efectos adversos en el desarrollo neurológico, el crecimiento fetal y posnatal y las funciones de la memoria sobre los lactantes (Jacobs et al., 1996; Lunden y Noren, 1998).

Un estudio realizado con voluntarios a los que se les administró por vía intravenosa y oral un isótopo de 4-n-Nonilfenol (4-n-NP) mostró que el compuesto tiene una vida media en la sangre de 2 a 3 horas. Sin embargo, el nonilfenol se distribuye en la capa lipídica del cuerpo en las primeras 2 horas. En este mismo estudio, se analizaron muestras humanas de tejido adiposo proveniente de personas cuyas ocupaciones no las exponían directamente al 4-n-nonilfenol ni al 4-n-octilfenol observando concentraciones de 19 a 85 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ para NP y de

0.58 a 4.07 ng·g⁻¹ para OP, lo que indica una exposición y contaminación de fondo (Müller et al., 1998).

Aunque no hay estudios concluyentes en humanos, se ha reportado que los alteradores endocrinos en general tienen un impacto sobre la etiología de la obesidad, basados en estudios con modelos animales. Estos estudios muestran que la exposición *in utero* a los alteradores endocrinos altera el desarrollo del tejido adiposo y el sistema regulador de la ingesta de alimentos (Heindel y vom Saal, 2009).

1.3. Nitrificación

La remoción de nitrógeno de las aguas residuales es un proceso deseable a fin de evitar la eutrofización de los cuerpos acuíferos receptores, eliminar los efectos tóxicos que el amonio (NH₄⁺) puede ocasionar en los organismos acuáticos, reducir la alta demanda de oxígeno disuelto (OD) que ejerce el NH₄⁺ y mantener un control del nitrógeno al reusar el agua para otras aplicaciones (Rittman y McCarty, 2001; Metcalf y Eddy, 2003). En el proceso de lodos activados, la remoción del nitrógeno se consigue por medio de dos procesos biológicos, la nitrificación autótrofa y la desnitrificación heterótrofa.

La nitrificación es un proceso aerobio de dos etapas en el que las bacterias oxidan el amonio a nitrito (NO₂⁻) y posteriormente a nitrato (NO₃⁻), en sistemas completamente aireados en los que la concentración de oxígeno supera los 2 mg•L⁻¹. En la desnitrificación, el nitrato obtenido es reducido a nitrógeno gaseoso (N₂), bajo condiciones anóxicas, empleando compuestos orgánicos como metanol, acetato o propionato que aporten los electrones necesarios. Sin embargo, la adición de materia orgánica encarece y complica el proceso.

1.3.1. Microbiología del proceso nitrificante

Las bacterias nitrificantes son organismos autótrofos, es decir, emplean carbono inorgánico (CO₂) como fuente de carbono para el crecimiento. También son llamadas organismos quimiolitótrofos ya que su fuente de energía se deriva de la reacción química de compuestos inorgánicos. Estos microorganismos están ampliamente distribuidos en el suelo y el agua donde exista una concentración de amonio considerable, por ejemplo donde se produce una descomposición proteica (amonificación) o donde se lleva a cabo el tratamiento de aguas residuales.

Aunque la oxidación de NH_4^+ a NO_2^- puede ser realizada por bacterias heterótrofas, éstas requieren mucha energía para oxidar el amonio, lo cual las coloca en desventaja en comparación con las bacterias amonio-oxidantes. Hasta la fecha, no se conoce ningún quimiolitótrofo que lleve a cabo la oxidación completa desde amoniaco hasta nitrato; por ello la nitrificación es el resultado de la acción secuencias de dos grupos de organismos, las bacterias amonio-oxidantes (BAO) y las bacterias nitrito-oxidantes (BNO), las verdaderas bacterias nitrificantes o productoras de nitrato. Durante mucho tiempo se pensó que estos organismos eran aerobios obligados, sin embargo, desde hace años se tienen reportes de especies que pueden vivir en ambientes con bajas concentraciones de oxígeno o anóxicos llevando a cabo la reducción del nitrito y el nitrato (Bock, 1988, 1995; Bodelier et al., 1996; Poth, 1986).

Por mucho tiempo se aceptó que las bacterias del género *Nitrosomonas* y *Nitrobacter* eran las bacterias responsables de la nitritación y la nitratación, respectivamente. Sin embargo, con frecuencia se cuestiona el predominio de las especies de *Nitrosomonas* en las comunidades amonio-oxidantes presentes en muestras de suelo (Laanbroeck y Woldendorp, 1995). A partir de muestras de lodos activados, se han aislado y descrito más de 16 especies de bacterias amonio-oxidantes litoautótrofas (Juretschko et al., 1998; Van Loosdrecht y Jetten, 1998). El empleo de técnicas de biología molecular como la hibridación fluorescente *in situ* (FISH, por sus siglas en inglés) ha permitido identificar la presencia de *Nitrosococcus mobilis* y *Nitrospira spp.* en muestras de lodo activado (Head et al., 1993; Wagner et al., 1996; Schramm et al., 1998; Hall et al., 2003).

De manera similar, la oxidación del nitrito ha sido atribuida a *Nitrobacter agilis* (Van Loosdrecht y Jetten, 1998). Sin embargo, diversos estudios empleando FISH han encontrado que bacterias del tipo *Nitrospira* están presentes en un número significativo en los sistemas convencionales de lodo activado (Juretschko et al., 1998; Schramm et al., 1998; Kim et al., 2004b). Blackall (2000) y Daims et al. (2000) concluyeron que las bacterias del tipo *Nitrospira* son las BNO predominantes en los sistemas nitrificantes enriquecidos y a gran escala.

1.3.2. Bioquímica de la nitrificación

En la Tabla I.2 se muestran las reacciones consecutivas para llevar a cabo la oxidación de amoniaco:

Tabla I.2. Cambio de energía libre en la reacción de oxidación del amoníaco

	ΔG^0 , kJ·mol ⁻¹	
$\text{NH}_3 + 0.5 \text{O}_2 \rightarrow \text{NH}_2\text{OH}$	17	Reacción I.1a
$0.5 \text{O}_2 + 2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^- \rightarrow \text{H}_2\text{O}$	-137	Reacción I.1b
$\text{NH}_3 + \text{O}_2 + 2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^- \rightarrow \text{NH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$	-120	Reacción I.1
$\text{NH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HNO}_2 + 4 \text{H}^+ + 4 \text{e}^-$	23	Reacción I.2a
$0.5 \text{O}_2 + 2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^- \rightarrow \text{H}_2\text{O}$	-137	Reacción I.2b
$\text{NH}_2\text{OH} + 0.5 \text{O}_2 \rightarrow \text{HNO}_2 + 2 \text{e}^- + 2 \text{H}^+$	-114	Reacción I.2
$\text{NH}_3 + 1.5 \text{O}_2 \rightarrow \text{HNO}_2 + \text{H}_2\text{O}$	-234	Reacción I.3

Fuente: Kowalchuk y Stephen, 2001; Bernet, 2002; Schmidt et al., 2003

La Reacción I.1 describe la oxidación del amoníaco a hidroxilamina llevada a cabo por la amoníaco monooxigenasa (AMO). Los sustratos de la AMO son el amoníaco, el oxígeno y dos electrones. Un átomo de oxígeno molecular se reduce a agua, mientras que el segundo átomo se incorpora a la hidroxilamina (Arp et al., 2002).

En la oxidación de hidroxilamina que es llevada a cabo por la hidroxilamina oxidoreductasa (HAO) no se consume oxígeno (Reacción I.3; Figura I.2); dos de los cuatro electrones removidos del sustrato deben regresar a la reacción catalizada por la AMO de la siguiente forma: 1.65 electrones pasan a la oxidasa terminal (o a una reductasa del nitrito) y 0.35 pasan al NAD^+ (Whittaker et al., 2000), el resto de los electrones se emplean en la fijación de CO_2 y en la cadena respiratoria. En la Figura I.2 se esquematiza dicha cadena respiratoria y de transporte de electrones en *Nitrosomonas europea*.

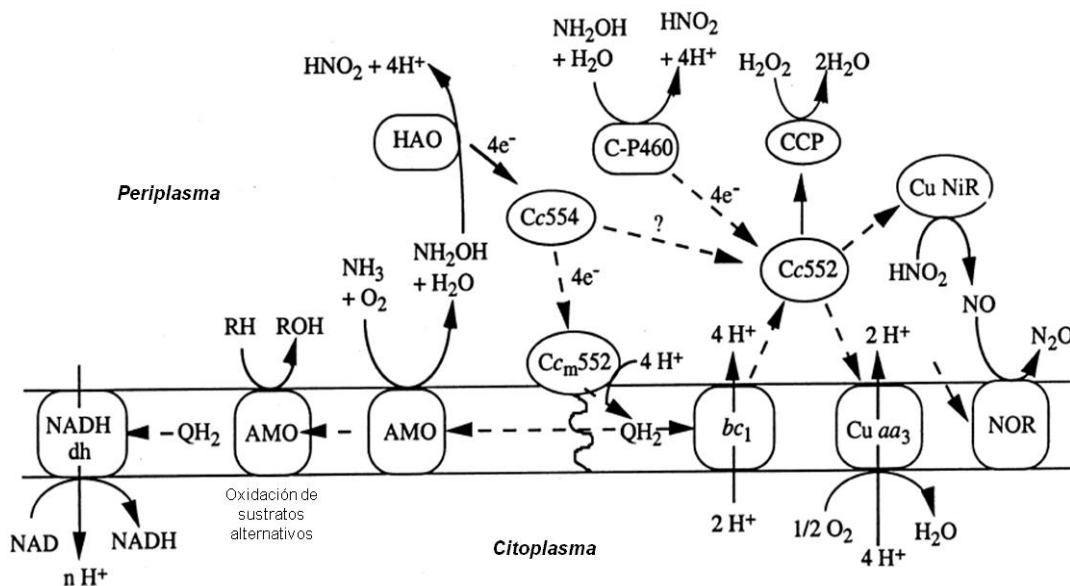


Figura I.2. Transporte de electrones en *Nitrosomonas europaea*. Las rutas establecidas están representadas con líneas continuas y las rutas hipotéticas se representan con líneas punteadas. AMO, amoníaco monooxigenasa; HAO, hidroxilamina oxidorreductasa; C-P460, citocromo P460; Q, Ubiquinona-8; Cu NiR, nitrito reductasa con cobre; CCP, citocromo c peroxidasa; NOR nitrito oxidorreductasa; Cu aa3, citocromo c oxidasa; CcM552, citocromo membranal Cc552, bc₁, complejo citocromo bc₁. Tomado de Whittaker et al. (2000).

El segundo paso de la nitrificación, la oxidación de nitrito, se lleva a cabo por la acción de la enzima nitrito oxidorreductasa (NOR), una enzima unida a la membrana (Tabla I.3). Esta enzima oxida el nitrito a nitrato empleando agua como fuente oxígeno, los electrones liberados de esta reacción se transfieren a un citocromo oxidasa tipo aa3 (Cu aa3) a través de citocromos tipo a y c.

Tabla I.3. Cambio de energía libre en la reacción de oxidación del nitrito.

	$\Delta G^0, \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	
$\text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NO}_3^- + 2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^-$	83	Reacción I.4a
$0.5 \text{O}_2 + 2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^- \rightarrow \text{H}_2\text{O}$	-137	Reacción I.4b
$\text{NO}_2^- + 0.5 \text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_3^-$	-54	Reacción I.4

Fuente: Schmidt et al., 2003

Aunque la nitrificación es un proceso estudiado por más de un siglo, los microbiólogos modernos aún no entienden completamente cuál es la secuencia con la que se inicia la nitrificación (Philips et al., 2002). En literatura se reportan trabajos mostrando que el sustrato de las bacterias amonio-oxidantes es tanto la forma no ionizada del amoniaco (NH_3) como la forma ionizada del amonio. Suzuki et al. (1974) sugieren que es el NH_3 más que el NH_4^+ el verdadero sustrato de la AMO, mientras que Smith et al. (1997), de acuerdo a sus resultados, exponen que el NH_4^+ es el verdadero sustrato de la nitrificación. Suzuki et al. (1974) basan su suposición en la observación de que el valor de la constante media de saturación (K_m) de $(\text{NH}_3+\text{NH}_4^+)\text{-N}$ disminuye cuando el pH se incrementa, mientras que el valor de K_m para el NH_3 permanece constante, independiente del valor de pH. Sin embargo, los experimentos realizados por Groeneweg et al. (1994) no mostraron un valor constante de K_m para el NH_3 al evaluar un amplio rango de pH, aunque estos autores sugieren que el pico de actividad refleja un valor de pH óptimo para el complejo AMO/HAO. Otros hallazgos que apoyan las conclusiones de Suzuki et al. (1974) muestran que las membranas bacterianas son permeables al amoniaco más no al amonio (Kleiner, 1985). Sin embargo, se cuestiona que el transporte del amoniaco a través de la membrana citoplasmática sea un prerrequisito para la oxidación del amoniaco (Groeneweg et al., 1994) ya que la enzima AMO se localiza en el lado externo de la membrana. Stein et al. (1997) coinciden con Suzuki et al. (1974), pero encuentran que el NH_3 se comporta de una manera fisiológicamente relevante a valores de pH entre 6 y 8, debido a que el equilibrio $\text{NH}_3\text{-NH}_4^+$ se desplaza hacia NH_4^+ , principalmente.

Además de emplear el amonio para la generación de energía, éste se asimila para la producción celular. Para las bacterias autotróficas, la fijación de CO_2 consume cerca del 80% de la energía generada por la oxidación del sustrato (Kelly, 1978), así que por cada átomo de carbono fijado, los nitrificantes deben oxidar cerca de 35 moléculas de NH_3 o 100 moléculas de NO_2^- (Wood, 1986), de tal suerte que el rendimiento celular de este tipo de bacterias es bajo. Más aún, la tasa de crecimiento es muy lenta comparado con la que presentan los organismos heterótrofos. Asumiendo que $\text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_2$ representa la fórmula empírica de la composición celular para las bacterias nitrificantes, las reacciones de síntesis para las BAO y las BNO se puede observar en las reacciones I.5 y I.6 (Sharma y Ahlert, 1977).



1.3.3. Cometabolismo

Los procesos biológicos que se llevan a cabo durante la degradación de los compuestos orgánicos se clasifican en dos tipos. El primero de ellos se presenta cuando el compuesto orgánico se emplea como sustrato primario o como principal fuente de carbono y energía. El segundo tipo de reacción se denomina cometabolismo (Horvath, 1972).

El cometabolismo es un proceso importante que se realiza en la degradación de muchos compuestos tóxicos en el ambiente. De acuerdo con la USEPA, el cometabolismo se define como un proceso en el que se presenta un metabolismo simultáneo de dos compuestos donde la degradación de un compuesto secundario depende de la presencia o degradación del compuesto primario. Así pues, el cometabolismo depende de la acción de enzimas que son producidas por los microorganismos para otro propósito principal, por lo que puede considerarse al cometabolismo como una “reacción fortuita” (USEPA, 1995). El cometabolismo puede ser o no benéfico para los organismos y tiene lugar si hay un número suficiente de microorganismos para producir las enzimas necesarias. Otro requisito es la presencia del sustrato primario el cual es la principal fuente de carbono y energía. Es necesario que el sustrato se encuentre en una cantidad suficiente para prevenir los efectos tóxicos que puedan ocurrir durante el cometabolismo. En muchos casos, este proceso requiere energía adicional la cual puede suministrarse a través de reacciones enzimáticas complejas en forma de NADH y NADPH (Horvath, 1972).

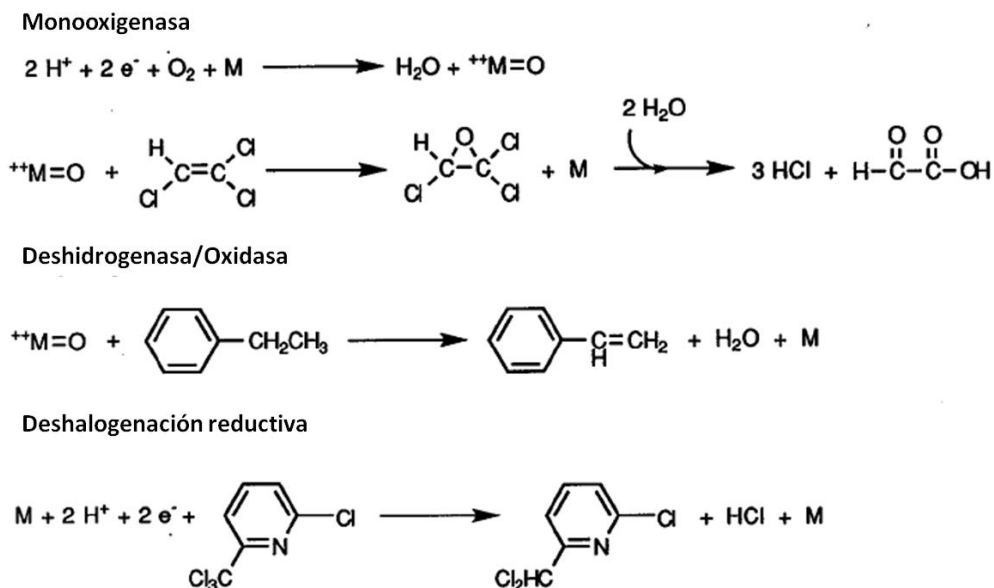


Figura I.3. Reacciones catalizadas por la enzima amonio monooxigenasa de *Nitrosomonas*. Tomado de Hooper et al., 1997.

Muchas monooxigenasas y dioxigenasas pueden oxidar diferentes compuestos a través de las reacciones cometabólicas. Se sabe que muchos organismos que expresan oxigenasas, como los metano-oxidantes, tolueno-oxidantes, amonio-oxidantes y fenol o cresol-oxidantes pueden catalizar reacciones cometabólicas (Bédard y Knowles, 1989). De manera similar a lo que ocurre con la enzima metano monooxigenasa, la AMO es capaz de biotransformar un amplio rango de sustratos, entre los que se encuentran hidrocarburos aromáticos y clorados, alcanos y alquenos (Keener y Arp, 1993). Como puede observarse en la Figura I.3, los sustratos o inhibidores competitivos de la AMO son de naturaleza no polar, principalmente (Hooper et al., 1997).

Esta habilidad de las bacterias amonio-oxidantes para cometabolizar compuestos orgánicos sugiere que la reacción se inicia con la activación enzimática del oxígeno más que la activación proporcionada por el sustrato. Sin embargo, para que esta interacción pueda llevarse a cabo se requiere el poder reductor que se genera cuando la hidroxilamina se oxida a nitrito por medio de la acción de la hidroxilamina oxidorreductasa (Reacción I.2a). Los electrones generados entran en un ciclo catalítico que involucra al sitio binuclear de cobre localizado en el sitio activo de la AMO. El oxígeno reacciona para convertir el Cu(I) a Cu(II), de tal manera que el oxígeno queda enlazado al sitio binuclear como un radical altamente electrofílico, similar al que se forma en el citocromo P-450 (Figura I.4). Esta forma oxidada de la enzima reacciona con los sustratos orgánicos, principalmente contra enlaces N-H, C-H o π del sustrato (Hooper et al., 1997; Yi y Harper, 2007).

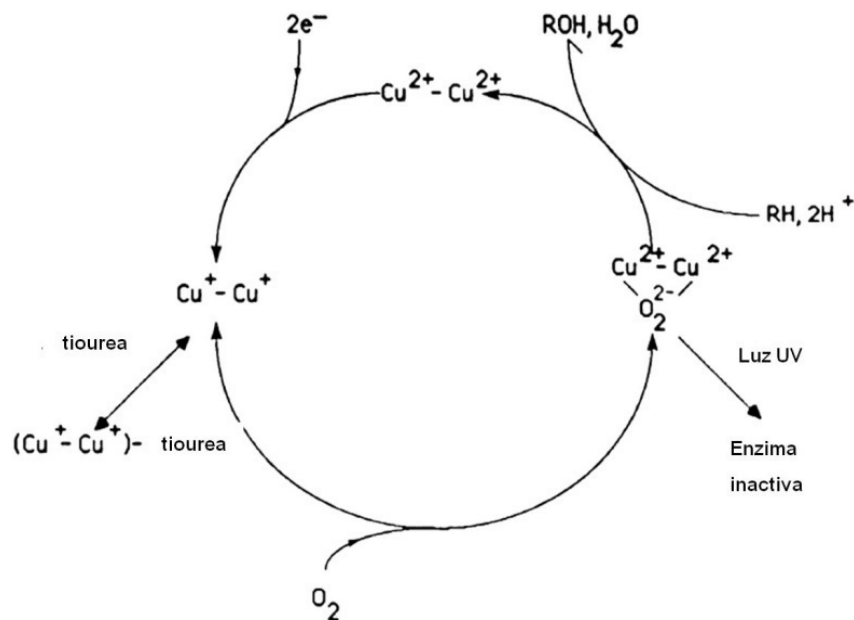


Figura I.4. Ciclo catalítico propuesto para la enzima amonio monooxigenasa, incluye la oxidación y reducción del sitio binuclear de cobre. Tomado de Bédard y Knowles, 1989.

I.4. Biodegradación del nonilfenol

I.4.1. Degradación de nonilfenol con cepas del género *Sphingomonas*

El nonilfenol puede ser degradado bajo condiciones aerobias por microorganismos como bacterias, levaduras y hongos (Yuan et al., 2004; Chang et al., 2005). Sin embargo, desde hace unos años se han aislado bacterias capaces de crecer con isómeros de nonilfenol como única fuente de carbono y energía. Dichos organismos degradadores pertenecen al género *Sphingomonas* y fueron aislados de plantas de tratamiento municipales e identificados como *Sphingomonas* sp. cepa TTNP3, *Sphingomonas cloacae*, *Sphingomonas xenophaga* cepa Bayram (Tanghe et al., 1999; Fujii et al., 2001; Gabriel et al., 2005). Las tasas volumétricas de degradación del NP van desde 29 mg NP·L⁻¹·d⁻¹ (Tanghe et al., 1999) hasta 140 mg NP·L⁻¹·d⁻¹ (Gabriel et al., 2005a).

Algunos investigadores asumen que la degradación del *para*-Nonilfenol (pNP) inicia con la fisión del anillo aromático (Tanghe et al., 1999; Fujii et al., 2001). Corvini et al. (2004) mostraron evidencia de que la hidroquinona es el metabolito principal en la ruta de degradación de los isómeros del nonilfenol (Figura I.5). Los experimentos de crecimiento con la cepa Bayram mostraron que los isómeros α -cuaternarios del nonilfenol se emplean como sustratos de crecimiento, mientras que los isómeros que contienen α -hidrógenos no lo son (Gabriel et al., 2005a, 2005b). Estos hallazgos, junto con experimentos elaborados con isótopos de oxígeno (¹⁸O) permitieron dilucidar la ruta de degradación. El mecanismo de degradación es una *ipso*-sustitución tipo II que requiere un grupo hidroxilo libre en la posición *para*. La hidroquinona se forma por la hidroxilación en la posición C4 de la cadena alquílica, donde el quinol alquilado deja la molécula como un carbocatión (Corvini et al., 2006b; Gabriel et al., 2005b). La reacción electrofílica del carbocatión formado junto con una molécula de agua produce el correspondiente nonanol (Figura I.5A). Como el carbocatión sólo se forma si está suficientemente estabilizado por la cadena ramificada α -alquílica, las cadenas laterales que contienen α -hidrógenos no se liberan (Figura I.5B). Esto explica parcialmente el comportamiento divergente en la biodegradación de los isómeros de nonilfenol con diferente α -sustitución. La hidroquinona, posteriormente, se degrada a ácidos orgánicos como succinato y ácido 3,4-dihidroxibutanodioico (Figura I.5C).

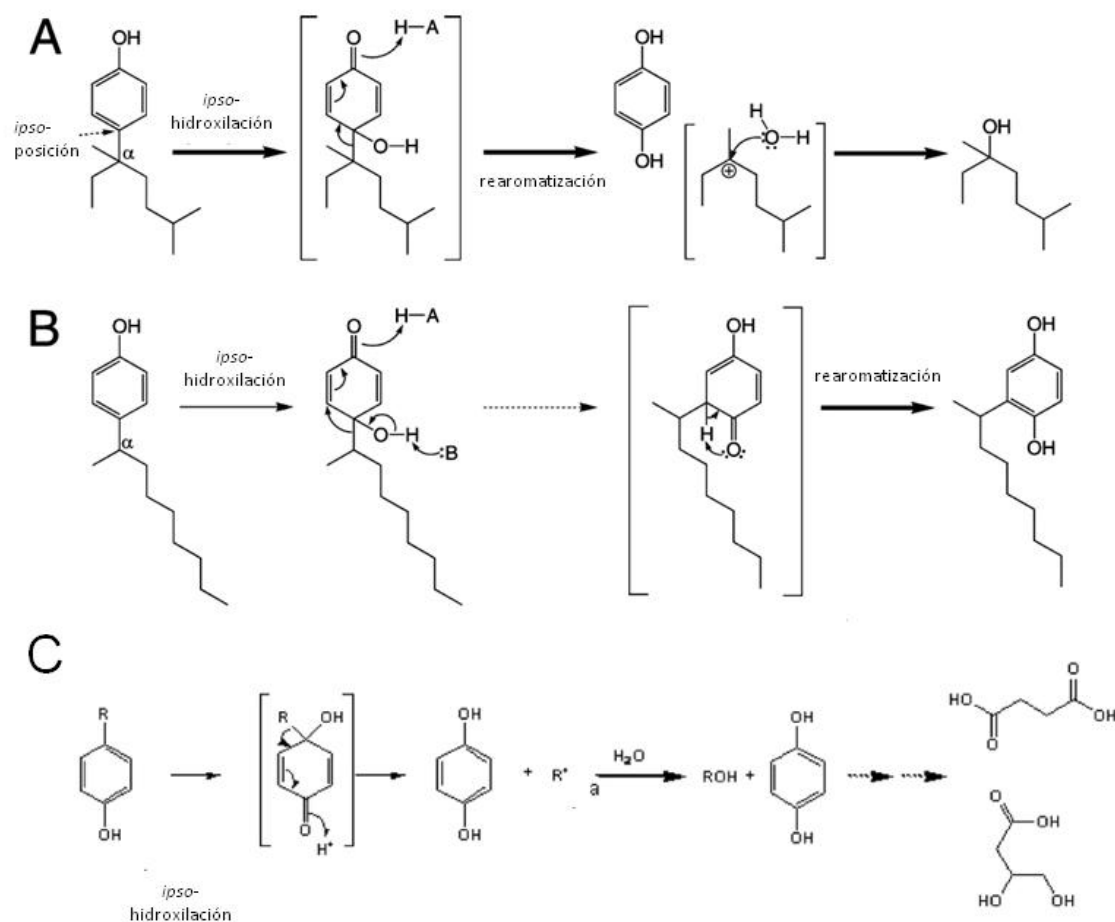


Figura I.5. Ruta de degradación de los isómeros de NP. A) Metabolismo de un isómero α -cuaternario por *Sphingomonas xenophagum* Bayram; B) Metabolismo de un isómero α -terciario por la cepa anterior; C) Metabolismo de degradación por *Sphingomonas sp.* cepa TTNP3 (Corvini et al., 2006a, Gabriel et al., 2008)

La actividad de la nonilfenol *ipso*-hidroxilasa de la cepa Bayram se ha agrupado dentro de la familia de las enzimas flavina monooxigenasa (Porter y Hay, 2007). Sin embargo, Gabriel et al. (2008) concluyen que las tasas de *ipso*-hidroxilación están probablemente gobernadas por efectos estéricos más que por efectos electrónicos como ocurre en las monooxigenasas. Además, la longitud de la cadena alquílica principal parece jugar un importante papel en este efecto estérico, ya que los isómeros con pocas ramificaciones en la posición alfa pero con cadenas alquílicas largas son transformados de manera relativamente más lenta (Gabriel et al., 2005a).

Factores como la posición, estructura y longitud de la cadena alquílica, la concentración del nonilfenol en el medio, la concentración de oxígeno o la temperatura influyen sobre la degradación del nonilfenol (Tanghe et al., 1999; Fujii et al., 2001; Gabriel et al., 2005; Corvini et al., 2006).

1.5. Degradación de nonilfenol con consorcios mixtos

La degradación anaerobia de nonilfenol se ha estudiado con diferentes inóculos, entre ellos se puede citar, lodo de una planta de tratamiento, mezclas de composta y suelo, sedimento de río y sedimento de manglares subtropicales (Chang et al., 2004, 2005a, 2005b, 2007a, 2007b, 2008a, 2008b). Los autores reportaron que la tasa de degradación del nonilfenol se correlaciona positivamente con la temperatura y se inhibe a valores de pH menores que 6 y mayores que 9, independientemente de la procedencia del inóculo, mostrando que la mayor tasa de degradación se obtuvo a 50°C y un pH igual que 7. Además de evaluar la capacidad de degradación del nonilfenol que las bacterias presentes en cada inóculo mostraron, los autores realizaron pruebas de biodegradabilidad bajo condiciones metanogénicas, sulfatorreductoras y nitratorreductoras. Para ello, suplementaron el medio mineral con bicarbonato de sodio, sulfato de sodio y nitrato de sodio, respectivamente. Los resultados de esas pruebas se muestran en la Tabla I.4, donde se puede observar que la mayor tasa de degradación se presentó bajo condiciones sulfatorreductoras. Experimentos adicionales con sedimento de manglar como inóculo, mostraron que existe una correlación positiva entre la concentración inicial de nonilfenol y la tasa de degradación (Chang et al., 2008a). Los autores reportaron una tasa de degradación de hasta 0.683 d⁻¹ con una concentración inicial de NP de 250 µg·g⁻¹.

Tabla I.4. Constantes de biodegradación (k_1) de nonilfenol con lodo, sedimento de río y suelo.

Inóculo	[NP]	Condiciones	k_1 , d ⁻¹	$t_{1/2}$, d	Referencia
Sedimento de río	2 µg·g ⁻¹	Control	0.046	15.1	Chang et al., 2004
		Sulfatorreducción	0.179	3.9	
		Metanogénesis	0.043	16.1	
		Nitratorreducción	0.034	20.4	
Lodo PTAR	5 mg·L ⁻¹	Control	0.029	23.9	Chang et al., 2005
		Sulfatorreducción	0.036	19.3	
		Metanogénesis	0.024	28.9	
		Nitratorreducción	0.022	31.5	
Suelo	50 µg·g ⁻¹	Control	0.034	20.4	Chang et al., 2007
		Sulfatorreducción	0.044	15.8	
		Metanogénesis	0.039	17.8	
		Nitratorreducción	0.023	30.1	

Diversos autores han estudiado la biodegradación de isómeros de nonilfenol bajo condiciones aerobias, reportando que este proceso puede llevarse a cabo por rutas degradativas diferentes. La ruta convencional para la degradación de compuestos fenólicos inicia con la dihidroxilación del anillo aromático para producir catecol seguido de su ruptura en la posición *orto*- o *meta*-. Esta ruta de degradación es empleada por un gran número de bacterias, las cuales pertenecen, principalmente, al género *Pseudomonas*, para biodegradar alquilfenoles de cadena corta y media (Zaki, 2006; Takeo et al., 2006; Reichlin y Kohler, 1994; Viggiani et al., 2006). Otros autores han reportado que bacterias pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Inquilinus*, *Methylobacterium* y *Shinella* presentan la capacidad de degradar alquilfenoles de cadena larga (Tuan et al., 2011). Ajthkumar et al. (2003) aislaron una bacteria del género *Pseudomonas* capaz de degradar cometabólicamente el 4-n-nonilfenol. Estos autores asumen que la continua exposición al fenol indujo esta habilidad. Al parecer, aunque los alquilfenoles de cadena larga son degradados por diferentes rutas, el mecanismo para producir alquilcatecol a partir de los alquilfenoles aún permanece incierto (Tuan et al., 2011).

Otra ruta de degradación del nonilfenol sugiere que este proceso se inicia con un ataque en el anillo fenólico por la actividad monooxigenasa, a través del desprendimiento inicial de la cadena alquílica produciéndose ácido *p*-hidroxibenzoico como probable intermediario aromático final. Sin embargo, este mecanismo es más probable que ocurra cuando la mezcla de nonilfenoles no está altamente ramificada. Esta ruta es llevada a cabo por bacterias como *Pseudomonas* sp. (Soares et al., 2003, Yuan et al., 2004).

Una tercera ruta de degradación involucra la producción de un intermediario a partir del nonilfenol y un grupo nitro en la posición *orto*. El grupo nitro que se adiciona al nonilfenol es aportado por la oxidación del amonio a nitrito, sin embargo, se desconoce si este mecanismo es realizado por bacterias amonio-oxidantes. Sin embargo, a pesar de que las bacterias nitrificantes han mostrado ser organismos versátiles para la degradación de diversos microcontaminantes como son los estrógenos, el bisfenol A, el triclosán y el nonilfenol, entre otros, no se ha reportado que las bacterias amonio-oxidantes posean la capacidad de romper el anillo aromático del nitro-nonilfenol, por lo que la degradación de este compuesto debe ser llevada a cabo por otro tipo de bacterias (Telscher et al., 2005, Zhang et al., 2009, De Weert et al., 2010).

Kim et al. (2007) estudiaron la degradación de nonilfenol con un consorcio de bacterias nitrificantes a una concentración de $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ($10 \text{ g NP}\cdot\text{kg}^{-1} \text{ SS}^{-1}$), observando que dicha degradación está asociada a la oxidación del amonio más que a la oxidación del nitrito, obteniendo tasas de degradación de 0.38 d^{-1} y 0.16 d^{-1} , respectivamente. Sin embargo, los

estudios de la capacidad de las bacterias amonio-oxidantes para degradar el nonilfenol son escasos, aunque abundan aquellos que asocian a dichas bacterias con la degradación de estrógenos (De Gussemme et al., 2009; Yi y Harper Jr, 2007; Forrez et al., 2008; Shi et al., 2004; Skotnicka-Pitak et al., 2009).

Por otra parte, diversos estudios han reportado que el proceso nitrificante puede verse afectado por la presencia de compuestos xenobióticos. Amor et al. (2005) reportan que a concentraciones iniciales mayores de $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de fenol, la nitrificación disminuye. y a concentraciones de fenol entre 1400 y $2500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, se presentó una acumulación de las cantidades de NO_2^- en el sistema de estudio, así como una disminución en las cantidades de NO_3^- , lo que sugiere que la actividad nitrito-oxidante resulta inhibida a ese rango de concentraciones de fenol. Por otra parte, Suárez-Ojeda et al. (2010) realizaron estudios de inhibición de la actividad nitrificante con compuestos de quinonas. El valor donde la actividad metabólica se inhibe al 50% (IC_{50}) fue de $3.1 \pm 0.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para la quinona, mientras que para compuestos como la p-benzoquinona y el catecol, el IC_{50} fue de $2.8 \pm 0.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y $11 \pm 1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente.

Los surfactantes son otro tipo de compuestos que han mostrado efectos inhibitorios sobre el proceso amonio-oxidante. Se ha observado que hay una mínima producción de NO_2^- en *N. europaea* a concentraciones de $15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de surfactantes alquilbencénicos lineales (LAS, por sus siglas en inglés), para *N. mobilis* y *N. multiformis* la inhibición ocurre a concentraciones de $9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de LAS y para *Nitrosospira* sp. a los $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ se observa inhibición del proceso. Las IC_{50} reportadas para la tasa de crecimiento oscilan entre 3 y $9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; en cuanto a la formación de colonias, los autores determinaron valores de IC_{50} entre 3 a $14 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Brandt et al., 2001). Mazuza et al. (2010) realizaron una evaluación del efecto inhibitorio de surfactantes aniónicos como el sulfato dodecil sódico (SDS) y el sulfonato dodecil benceno sódico (SDBS) en muestras de lodo activado de una planta de tratamiento. Los autores determinaron valores de IC_{50} de $193.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y $74.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para SDS y SDBS, respectivamente. Estos autores también evaluaron el efecto inhibitorio de surfactantes no iónicos sobre la nitrificación. Las sustancias empleadas cuentan en su formulación con la presencia de nonilfenoles etoxilados. Se observó un porcentaje de inhibición del 26 al 33% a concentraciones de Tergitol NP-9 entre 1 y $25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. En el caso de Tergitol NP-7, los autores reportan un porcentaje de inhibición de 50% a concentraciones entre 1 y $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. En presencia de Trigotol 15-S-9, los autores determinaron un porcentaje de inhibición de 45% a concentraciones entre 1 y $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Para las tres sustancias probadas, el porcentaje de inhibición fue superior al 60% a concentraciones de $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

1.6. Tratamiento de aguas residuales con presencia de nonilfenol

1.6.1. Factores que afectan la remoción de nonilfenol

Adsorción. Al hablar del proceso de adsorción se debe hacer referencia a dos fenómenos, la hidrofilia y la hidrofobia. La hidrofobia se refiere a la propiedad física que tiene una molécula para repeler una masa de agua. Muchos microcontaminantes orgánicos encontrados en las aguas residuales son compuestos hidrofóbicos, esta característica determina la biodisponibilidad de un compuesto en ambientes acuáticos y está íntimamente involucrada en la remoción de los contaminantes durante el tratamiento de aguas residuales ya que permite diferenciar los procesos de adsorción y biodegradación (Ilani et al., 2005; Yu y Huang, 2005).

El coeficiente de partición octanol-agua (K_{ow}), permite establecer cuál es el equilibrio de partición de un soluto orgánico entre la fase orgánica (octanol) y la fase acuosa. Valores altos de K_{ow} son característicos de los compuestos hidrofóbicos e implican una pobre hidrosolubilidad y una alta tendencia a adsorberse en matrices orgánicas (Stangroom et al., 2000; Yoon et al., 2004). Para compuestos con $\log K_{ow}$ menores que 2.5 no se espera que el proceso de adsorción en lodo biológico sea la principal vía de remoción. Para compuestos con valores de $\log K_{ow}$ entre 2.5 y 4.0 se deben considerar procesos de adsorción moderados. Si el compuesto tiene un valor de $\log K_{ow}$ superior a 4.0, la adsorción será el proceso de remoción predominante (Ter Laak et al., 2005).

Biodisponibilidad. Cuando la biodegradación es la principal ruta de eliminación para los compuestos orgánicos durante el tratamiento de aguas residuales, la biodisponibilidad de los microcontaminantes se convierte en un importante requisito (Burgess et al., 2005). En términos generales, dicha biodisponibilidad se define en dos tipos, biodisponibilidad externa e interna.

La biodisponibilidad externa se define como el acceso a una sustancia por parte de los microorganismos, mientras que la biodisponibilidad interna se limita al consumo de los compuestos dentro de la célula. En general, estos procesos se dan por la combinación de aspectos fisicoquímicos relacionados a la fase de distribución y a la transferencia de masa, así como a los aspectos fisiológicos de los microorganismos como son la permeabilidad de sus membranas, la presencia de sistemas de consumo activos, la maquinaria enzimática de la que dispongan y la habilidad para excretar enzimas y biosurfactantes (Cavret y Feidt, 2005; Ehlers y Loibner, 2006).

Procesos de sorción. La sorción se da principalmente por dos vías, los mecanismos de absorción y los de adsorción. La absorción involucra interacciones hidrofóbicas de los grupos alifáticos y aromáticos de los compuestos con la membrana celular lipofílica de algunos organismos o con las fracciones grasas del lodo. En cambio, la adsorción se da por interacciones electrostáticas de grupos cargados positivamente con las cargas negativas de la membrana superficial de los microorganismos (Siegrist et al., 2004).

Biodegradación. La biodegradación se define como los procesos de reacción mediados por la actividad microbiana. En procesos aerobios, los microorganismos pueden transformar las moléculas orgánicas por medio de reacciones de oxidación a productos más simples llegando incluso a la mineralización de los éstos (Siegrist et al., 2004; van der Meer, 2006). A bajas concentraciones, las cinéticas de descomposición de los microcontaminantes se ajustan a una reacción de primer orden:

$$R_{\text{degradación}} = K_{\text{degradación}} \cdot SS \cdot C_{\text{microcontaminante}} \quad \text{Ecuación I.1}$$

Donde, $R_{\text{degradación}}$ es la tasa de degradación, $K_{\text{degradación}}$ expresa la constante de dicha degradación, SS es la concentración de sólidos suspendidos y $C_{\text{microcontaminante}}$ indica la concentración de microcontaminante a ser degradado.

La biodegradación de los contaminantes se da por dos mecanismos. El primero es el crecimiento en sustratos mixtos donde las bacterias usan las sustancias traza como fuentes de carbono y energía y por tanto, el compuesto se mineraliza. El segundo mecanismo es el cometabolismo en el que la bacteria emplea otro sustrato y solo convierte el contaminante a formas más simples pero no lo emplea como fuente carbono.

Tiempo de retención de sólidos. El tiempo de retención de sólidos (TRS) es el tiempo medio de residencia de los microorganismos en sistemas de tratamiento de aguas residuales. Se ha mencionado en diversos estudios que tener un TRS suficientemente alto es esencial para la remoción y biodegradación de los microcontaminantes presentes en aguas residuales (Reporte Poseidón, 2004; Joss et al., 2005).

Altos TRS permiten en enriquecimiento de bacterias de lento crecimiento, estableciendo de esta manera un inóculo diverso que sea capaz de biodegradar un gran número de compuestos. Se ha demostrado que a TRS menores a 8 días, las bacterias de lento crecimiento son removidas de los sistemas de tratamiento y en estos casos la

biodegradación es el mecanismo menos predominante en la remoción de los microcontaminantes (Jacobsen et al., 1993).

El tiempo de retención de sólidos es uno de los parámetros de fácil manejo para mejorar la eficiencia en los procesos de remoción de fármacos de las aguas residuales. Dos reactores de membrana operados a TRS de 26 días mostraron eficiencias de remoción para benzotiazol de 43% (Kloepfer et al., 2004). Tiempos de retención de sólidos entre 5 y 15 días se requirieron para transformar biológicamente algunos fármacos como benzafibrano, sulfametoxazol, ibuprofeno y ácido acetilsalicílico (Ternes et al., 2004). Sin embargo, debe tomarse en cuenta que la aplicación de TRS altos no llevará automáticamente a la remoción de contaminantes. Para TRS de dos días, Clara et al. (2005b) reportaron que ninguno de los fármacos estudiados (ibuprofeno, benzotiazol, diclofenaco y carbamezapina) se removió y al aplicar TRS de 82 días en un reactor de membranas y de 550 días en un proceso de lodos activados las tasas de remoción fueron del 80%. Sin embargo, la remoción de carbamezapina se mantuvo por debajo del 20% para ambos TRS.

1.7. Remoción de nonilfenol

La remoción del nonilfenol en el tratamiento de aguas residuales se da por dos vías principales, los mecanismos de sorción y la biodegradación. Muchas investigaciones se han enfocado a la remoción del nonilfenol en plantas de tratamiento convencionales (lodos activados) y en biorreactores de membrana (MBR, por sus siglas en inglés) (Wintgens et al., 2002, 2004; Clara et al., 2005a; Nakada et al., 2006). Sin embargo, las tasas de remoción en estos estudios se basan, principalmente, en la diferencia entre la concentración a la entrada y la salida del reactor, lo que da lugar a un desconocimiento del proceso de sorción o biodegradación que ocurre dentro del mismo.

Para estimar la remoción del nonilfenol, con frecuencia se hace una correlación entre esta remoción y el tiempo de residencia de sólidos al que se esté operando el sistema de tratamiento. Johnson et al. (2005) operaron varios tratamientos convencionales para evaluar la remoción del NP y otros alteradores endocrinos del agua residual y observaron una buena degradación de los microcontaminantes a un TRS de 30 días. El mismo estudio mostró que no había diferencias significativas en cuanto a biodegradación entre el tratamiento convencional y un MBR. Terzic et al. (2005) compararon la eficiencia de remoción de NPEO en un tratamiento convencional y en un MBR y observaron una eficiencia de remoción superior en este último.

El tiempo de residencia de sólidos que se aplique al proceso controla la concentración de biomasa que se tenga en el sistema. Esta concentración juega un papel importante en la remoción del NP a través de los mecanismos de sorción y biodegradación. Ahel et al. (1994) midieron la concentración de NP en el lodo de plantas de tratamiento y determinaron que de 44 a 48% del NP del influente era adsorbido en el lodo. Tasas de remoción similares se observaron durante estudios que comparaban el desempeño de tratamientos convencionales y MBR operando paralelamente (Clara et al., 2005b). González et al. (2007) reportaron que la remoción de NP y NPEO fue más alta en un MBR (96%) con una concentración de sólidos de licor mezclado entre 11 y 20 g·L⁻¹, mientras que en un tratamiento convencional se obtuvo una remoción del 54% con una concentración de biomasa de 4 g·L⁻¹. En un MBR a escala piloto, con membranas de nanofiltración y una concentración de sólidos suspendidos totales de 22 g·L⁻¹, se obtuvo una remoción de 80 a 85% de NP (Wintgens et al., 2002). En este caso, los autores asumen que la principal vía de remoción del compuesto fue la adsorción de éste en el lodo del biorreactor.

En México, el agua residual se reusa en la agricultura, lo que da como resultado la recarga de los acuíferos cercanos a la Cd. de México. Esta metrópoli genera cerca de 52 m³·s⁻¹ de agua residual la cual se descarga principalmente, sin tratamiento al Valle de Tula en el estado de Hidalgo, al norte de la ciudad donde el agua se distribuye a través de canales y estanques de almacenamiento para irrigar zonas de cultivo (Chavez et al., 2011). Estos autores reportan que los microcontaminantes orgánicos pueden ser removidos por percolación del agua residual a través del suelo por medio del mecanismo de adsorción, con el cual las moléculas se enlazan a la materia orgánica refractaria o sobre la superficie de la arcilla por fuerzas de van der Waals. La adsorción irreversible es posible, además, la degradación química y biológica puede dar como resultado la transformación a otros productos, su incorporación en la materia orgánica del suelo o una completa mineralización. De esta manera, los acuíferos se protegen de la contaminación de cualquier analito.

En un estudio realizado en la comunidad de Santa María Nativitas, cercana al municipio de Texcoco en el estado de México (Belmont et al., 2006), se reportaron concentraciones de nonilfenol de hasta 13.02 µg·L⁻¹ en el agua residual de dicha comunidad. Después de pasar por un sistema de tratamiento compuesto de lagunas de estabilización y humedales artificiales, la concentración de NP disminuyó en la fase acuosa en cada paso del sistema de tratamiento de agua, pasando de 13.2 a 4.1 µg NP·L⁻¹ como valor máximo. La mayor reducción ocurrió en las terrazas de sedimentación y la laguna de estabilización, con porcentajes de reducción de 39 a 52% y de 65 a 75%, respectivamente. El resto del sistema de tratamiento sólo contribuyó marginalmente a las tasas de remoción totales. Estos

resultados muestran que la adsorción de estos compuestos a los sedimentos y sólidos es la principal ruta de remoción de la fase acuosa.

En la ciudad de México, las concentraciones de nonilfenol pueden alcanzar valores hasta de $14.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, mayores a las concentraciones reportadas en otros países (Molina et al., 2008). En los sistemas de tratamiento por lodos activados la remoción fue cercana al 70% de la concentración inicial de estos compuestos. Dado el valor del coeficiente de partición octanol/agua (4.48) que presentan estos compuestos, es fácil asumir que la remoción se debe, principalmente, a la adsorción en el lodo (Molina et al., 2008).

A la luz de estas investigaciones, es obvio que no puede evitarse la remoción del nonilfenol por medio de la adsorción en los sólidos suspendidos del sistema de tratamiento. Las consecuencias son positivas si se analiza sólo el efluente, pero la fuente de contaminación permanece activa debido a que en muchos países éste lodo se emplea en las tierras de cultivo.

1.8. Reactor discontinuo de membranas sumergidas

1.8.1. Reactor de membranas

La primera vez que las membranas se combinaron con el tratamiento biológico de aguas residuales fue en la década de los 40's. Una membrana de ultrafiltración se empleó para separar el lodo activado del efluente final, recirculando la biomasa al tanque de aireación (Brindle y Stephenson, 1996). Desde entonces, se han desarrollado diferentes configuraciones de reactores de membrana.

Reactores de membrana externa. En este tipo de sistemas, la recirculación del licor mezclado se realiza a través de un módulo de membranas que están fuera del reactor (Cornel y Krause, 2006). La fuerza motriz se da por la presión creada a una alta tasa de flujo cruzado a lo largo de la superficie de las membranas y la limpieza de éstas se realiza aplicando una alta tasa de flujo de permeado a través de los canales de filtración.

Reactores de membrana sumergidos. Este tipo de reactores emplea módulos de membranas, principalmente de fibra hueca, que se encuentran sumergidos dentro del reactor (Cicek, 2003). La fuerza motriz de las membranas se consigue a través de la presurización del tanque o bien ejerciendo una presión negativa (succión) en el permeado. A través de ciclos de retrolavado, aireación y lavado químico se puede conseguir la limpieza de la membrana.

Al incorporar una membrana sumergida en los reactores convencionales, se facilita una separación sólido-líquido directa sin la necesidad de una bomba de recirculación lo que reduce los costos de operación y hace competitivo al proceso frente al sistema convencional de lodos activados. Sin embargo, algunos investigadores sugieren que debido a los altos tiempos de retención celular que se pueden tener en este tipo de reactores, se pueden presentar dos problemas. Primero, un alto tiempo de retención celular da como resultado una disminución en la viabilidad de la biomasa cuando el reactor se opera por largos tiempos. Segundo, la retención y acumulación de ciertos compuestos en el biorreactor debido a la membrana puede originar una inhibición de la actividad microbiana (Canales et al., 1994; Chaize y Huyard, 1990).

Ventajas de los reactores de membrana. Entre las ventajas que presentan estos sistemas es posible mencionar su menor tamaño en comparación con los procesos convencionales de lodos activados (Trusell et al., 2005); la eficiente separación sólido-líquido por lo que se obtienen efluentes de mejor calidad debido a la retención de microorganismos patógenos (Adham et al., 2001); y la remoción de compuestos orgánicos tóxicos y recalcitrantes ya que permiten la proliferación de comunidades bacterianas de lento crecimiento capaces de biotransformar o mineralizar contaminantes orgánicos (Cicek et al., 2001; Clara et al., 2005b; Gonzalez et al., 2007).

Desventajas de los reactores de membrana. La colmatación de las membranas representa la principal desventaja en la operación de estos sistemas. La colmatación define al proceso por el cual las partículas y materiales biológicos se depositan sobre y dentro de los poros de las membranas ocasionando su deterioro, así como la disminución del flux de permeado conforme aumenta el tiempo de filtración (Liao et al., 2004; Zonvervan et al., 2007)

En la práctica, la colmatación afecta la eficiencia de filtración, disminuye el flux e incrementa los costos debidos a la necesidad de la limpieza o reemplazo de las membranas (Chang et al., 2002). Este proceso se ha dividido en dos categorías, la colmatación reversible e irreversible. En la primera de ellas, los sólidos forman una capa superficial sobre la superficie de la membrana que es fácilmente removida a través de un lavado físico. Por otra parte, la colmatación interna de la membrana es causada por la adsorción de material disuelto dentro de los poros se denomina colmatación irreversible y, generalmente, se remueve por medio de lavados químicos.

Entre los factores que influyen en el proceso de colmatación de las membranas podemos citar a las condiciones hidrodinámicas en el reactor (flujo crítico y subcrítico), el

diseño del módulo de membranas, las condiciones de operación del proceso biológico, los materiales de construcción de la membrana y las propiedades fisicoquímicas del lodo biológico (Lesjean et al., 2004).

1.8.2. Reactor discontinuo secuencial

El reactor discontinuo secuencial (SBR, por sus siglas en inglés) es una variación del proceso de lodos activados. Su diferencia radica en el hecho de que todos los pasos de tratamiento se llevan a cabo en un solo tanque, lo que le proporciona versatilidad. La operación del SBR se basa en el principio de llenado-vaciado, el cual consta de cinco pasos: Llenado, reacción, sedimentación, decantación y tiempo muerto. Estos pasos pueden modificarse en función de la aplicación deseada (NEIWPCC, 2005).

Llenado. Durante la fase de llenado, el tanque recibe el agua residual. El influente trae consigo la alimentación a los microorganismos, creando un ambiente propicio para que las reacciones bioquímicas se lleven a cabo. Durante esta fase, puede tomar lugar el mezclado y la aireación.

Reacción. En esta fase, el reactor ha alcanzado su volumen de operación y las unidades de mezclado y aireación inician su funcionamiento. La mayor parte de la remoción de la materia orgánica se lleva a cabo en esta etapa y para sistemas nitrificantes, se permite que el mezclado y la aireación continúen operando.

Sedimentación. Durante esta fase no hay mezclado ni aireación a fin de permitir que el lodo activado sedimente. Esta fase es crítica en el ciclo ya que si los sólidos no sedimentan rápido, el lodo puede desecharse durante la siguiente fase de vaciado, lo que afectará la calidad del efluente.

Decantación. Una vez que la fase de sedimentación se completa, se inicia la descarga del influente. El volumen que se decanta es equivalente al volumen que ingresa al tanque durante la fase de llenado.

Tiempo muerto. Este es un paso intermedio entre la fase de decantación y el llenado. La duración de esta etapa varía de acuerdo al flujo del influente y la estrategia de operación.

El SBR se ha desarrollado bajo la base científica de que la exposición periódica de los microorganismos a unas condiciones de proceso definidas es alcanzada efectivamente en un sistema de lote alimentado en el que el tiempo de exposición, la frecuencia de exposición y la

amplitud de la concentración pueden ajustarse independientemente de la condición de influente (Venkata Mohan et al., 2005). Esto lleva, a largo plazo, a un estado estacionario estable con respecto a la composición y las propiedades metabólicas de la población microbiana del reactor al controlar la distribución y el estado fisiológico de la misma.

El reactor de lote secuenciado ha probado su eficacia al tratar aguas residuales domésticas, lixiviados de basureros y aguas residuales industriales (Pochana et al., 1999; Buitrón et al., 2001; Chang et al., 2000; Daims et al., 2001; Rajagaru et al., 2000). Sin embargo, son escasos los estudios sobre su uso en el tratamiento de aguas residuales de mezclas complejas de la industria farmacéutica, las cuales contienen compuestos alteradores endocrinos (Hao et al., 2009).

1.8.3. Reactor discontinuo de membrana sumergida

El reactor discontinuo de membrana sumergida (MSBR, por sus siglas en inglés) plantea la combinación de las tecnologías antes citadas. El empleo de las membranas puede reducir el tiempo de operación ya que las fases de sedimentación y decantación se reemplazan por la filtración con la membrana, sin que se modifiquen las fases de llenado y reacción. Se obtienen, de esta manera, efluentes de mejor calidad, reduciendo el ciclo SBR.

Otra ventaja se relaciona con la sedimentación de los microorganismos, ya que el empleo de la membrana permite que éstos se retengan en el reactor consiguiendo con esto un incremento en el tiempo de retención de sólidos lo que finalmente se traduce en un incremento en la capacidad de tratamiento ya que permite el crecimiento de bacterias de lento crecimiento como son las nitrificantes, las cuales han probado su capacidad para biodegradar diversos compuestos xenobióticos.

1.9. Justificación.

El nonilfenol es un compuesto capaz de alterar el funcionamiento del sistema endocrino aún a concentraciones del orden de los $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Su uso se extiende a una amplia variedad de aplicaciones, las cuales incluyen la fabricación de detergentes, limpiadores, desengrasantes, emulsificantes, agentes humectantes, adhesivos, agroquímicos, plaguicidas caseros, cosméticos, formulaciones para el procesamiento de papel, textiles, pinturas y recubrimientos, entre otros. Dado el alto valor de K_{OW} que presenta el nonilfenol, la adsorción de éste sobre el lodo biológico o los sedimentos cobra importancia como mecanismo de remoción.

En diversos estudios realizados en plantas de tratamiento convencionales y biorreactores de membrana se ha observado que la remoción del nonilfenol es factible, sin embargo, el cálculo de las tasas de remoción sólo contempla la diferencia entre las concentraciones de entrada y salida en la fase líquida, sin hacer una diferenciación entre los procesos de adsorción y degradación. Por otra parte, los estudios que han incluido la evaluación del proceso de adsorción mencionan que éste puede llegar a disminuir hasta en un 48% la concentración de nonilfenol presente inicialmente.

La ruta de degradación del nonilfenol se ha estudiado ampliamente con bacterias aisladas del género *Sphingomonas*, las cuales son capaces de emplear los isómeros del nonilfenol como fuente de carbono y energía. Esta degradación se realiza por medio de la actividad de la enzima *ipso*-hidroxilasa, la cual se ha agrupado dentro de la familia de las enzimas flavina monooxigenasa. Las bacterias heterótrofas y autótrofas cuentan con enzimas monooxigenasas y dioxigenasas que podrían atacar la estructura del nonilfenol y sus isómeros. Los estudios de degradación de nonilfenol con consorcios mixtos han mostrado que las bacterias nitrificantes presentan tasas de degradación mayores a las obtenidas con bacterias heterótrofas, además de que esta degradación parece estar ligada a la actividad de la enzima amonio monooxigenasa. Esta enzima ha mostrado su versatilidad al biotransformar un amplio rango de sustratos como son los hidrocarburos aromáticos y clorados, así como los alcanos y alquenos.

Para minimizar la importancia del proceso de adsorción como mecanismo de remoción de los microcontaminantes se ha propuesto operar los sistemas de tratamiento con altos tiempos de retención de sólidos. De esta manera, se permite el enriquecimiento de bacterias de lento crecimiento, estableciendo un inóculo diverso que sea capaz de biodegradar un gran número de compuestos. Una tecnología que permite mantener altos tiempos de retención de sólidos en el sistema con una efectiva separación sólido-líquido, es el biorreactor de membranas.

Hipótesis y Objetivos

II. Hipótesis y objetivos

II.1. Hipótesis.

Tomado en consideración las características fisicoquímicas del nonilfenol, el mecanismo predominante de remoción de los isómeros de será la adsorción, seguida de degradación.

Las bacterias nitrificantes obtenidas bajo ciertas condiciones de enriquecimiento serán capaces de biodegradar los isómeros de nonilfenol. Además, la continua exposición de este consorcio microbiano a estos compuestos, en un reactor discontinuo de membrana sumergida, permitirá su adaptación a fin de que la fracción removida por adsorción en el lodo sea mínima.

La relación carbono inorgánico/nitrógeno presente durante el enriquecimiento de las bacterias nitrificantes condicionará el grado de inhibición al nonilfenol sobre las poblaciones amonio-oxidante y nitrito-oxidante.

II.2. Objetivo general

Evaluar la biodegradación de los isómeros de nonilfenol por medio de un consorcio nitrificante empleando un reactor discontinuo con membranas sumergidas.

II.3. Objetivos específicos

Desarrollar e implementar una metodología para la determinación de 4-n-Nonilfenol e isómeros de nonilfenol adsorbidos en matrices sólidas.

Evaluar la biodegradabilidad de isómeros de nonilfenol utilizando bacterias nitrificantes, lodos activados convencionales y un inóculo adaptado a la degradación de 4-clorofenol.

Evaluar la biodegradación de isómeros de nonilfenol en un reactor discontinuo de membrana sumergida

Evaluar la biotransformación de los isómeros de nonilfenol por la población microbiana presente en el reactor discontinuo de membrana sumergida a través de cinéticas en lote

Evaluar el efecto de la concentración de isómeros de nonilfenol sobre la actividad nitrificante y nitrito-oxidante.

Metodologia

III. Metodología

III.1. **Reactivos y materiales**

Las sales minerales $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaHCO_3 , KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, así como el metanol (grado HPLC) y la acetona se adquirieron con J.T. Baker. La mezcla de isómeros de nonilfenol (tNP), grado técnico, y los reactivos derivatizantes, piridina y Bis(trimetilsilil)Trifluoroacetamida-Trimetilclorosilano (BSTFA-TMCS) 1%, fueron suministrados por Sigma Aldrich. El 4-n-Nonilfenol se adquirió con Riedel-de Haën. Katase et al. (2008) determinaron, para este tipo de mezcla comercial de isómeros, que estaba conformada por, al menos, 75% de isómeros en la posición *para*.

La purificación del agua se llevó a cabo con un sistema Millipore. Los cartuchos OASIS HLB (200 mg/6 cc) fueron adquiridos con WATERS. El material de vidrio empleado así como los viales color ámbar de 2 mL y 40 mL fueron lavados con Extran MA02 (Merck) y enjuagados sucesivamente con agua, agua destilada y acetona. Las soluciones estándar individuales de 4-n-Nonilfenol, mezcla técnica de nonilfenoles y Bisfenol F se prepararon en metanol y se almacenaron en frascos color ámbar a 4 °C hasta su uso.

III.2. **Cuantificación de 4-n-Nonilfenol e isómeros de nonilfenol en muestras acuosas**

III.2.1. Análisis de muestras acuosas

Se empleó la extracción en fase sólida (EFS) como un método para limpiar y/o concentrar el analito a analizar. La metodología empleada se modificó de aquella reportada por Ballesteros et al. (2006). Un volumen de 100 mL de muestra se filtró a través de filtros de fibra de vidrio (GF/A, tamaño de poro 1.6 μm , Whatman). Posteriormente se disminuyó el pH de las muestras a 2.0 adicionando H_2SO_4 concentrado. Los cartuchos OASIS HLB (200 mg/6 cc, WATERS) se fijaron a una cámara de vacío (Alltech) y se acondicionaron con 5 mL de acetona y 5 mL de agua destilada. La muestra filtrada se hizo pasar a través de estos cartuchos a un flujo entre 1.5 y 2.0 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Para remover cualquier interferencia, los cartuchos se lavaron con 2 mL de agua destilada y se secaron al vacío durante 1 hora. Para eluir el compuesto de interés, los cartuchos se lavaron con 6 mL de acetona a un flujo entre 1.5 y 2.0 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$. El disolvente recuperado se evaporó totalmente bajo una corriente de N_2

a un flujo de $2.0 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ a temperatura ambiente. Antes de su inyección en el cromatógrafo de gases, el residuo obtenido se sometió a una reacción de derivatización.

III.2.2. Derivatización

Se agregaron $50 \mu\text{L}$ de BSTFA-TMCS 1% y $50 \mu\text{L}$ de piridina a los viales que contenían el residuo seco de la EFS. Los viales se agitaron 1 minuto en vórtex y se colocaron en baño seco a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 20 minutos, a fin de que la reacción se llevara a cabo. El producto obtenido se enfrió hasta la temperatura ambiente y se inyectó en el cromatógrafo de gases.

III.2.3. Cromatografía de gases acoplada a detector de espectrometría de masas (CG-EM)

Para llevar a cabo la cuantificación de los contaminantes de interés, se utilizó un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6890N acoplado a un espectrómetro de masas Agilent Technologies 5975. Las condiciones de operación se muestran en la Tabla III.1.

Tabla III.1. Condiciones de operación del cromatógrafo de gases

Columna	HP5MS 30 m x 0.25 mm x 0.25 micron
	Temperatura inicial: $120 \text{ }^\circ\text{C}$
	Tiempo inicial: 1 min
	1ª rampa: $15 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$
Condiciones de la columna	Temperatura final: $230 \text{ }^\circ\text{C}$
	Tiempo final: 0.0 min
	2ª rampa: $30 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$
	Temperatura final: $260 \text{ }^\circ\text{C}$
	Tiempo final: 8 minutos
Temperatura del inyector	$250 \text{ }^\circ\text{C}$
Temperatura de la línea de transferencia	$270 \text{ }^\circ\text{C}$
Temperatura de la fuente de impacto de e^-	$250 \text{ }^\circ\text{C}$
Energía de ionización	70 eV
Gas acarreador	Helio, $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$
Modo de inyección	Splitless

Para el análisis cualitativo se utilizó el cromatógrafo de gases en modo SCAN haciendo un barrido de masa desde 50 hasta 550. Además del espectro de masas, se usó el tiempo de retención de cada compuesto para confirmar su presencia, ya que este parámetro presentó una excelente reproducibilidad (<0.2% para todos los compuestos). El análisis cuantitativo se llevó a cabo a través del monitoreo de iones seleccionados (SIM, por sus siglas en inglés). Se seleccionaron los iones más abundantes para cada compuesto de acuerdo a su espectro (Tabla III.2). Debido a que el estándar de nonilfenoles es una mezcla de isómeros, la señal obtenida es un cromatograma con varios picos. El parámetro analítico para estos compuestos fue la suma del área de dichos picos.

Tabla III.2. Iones seleccionados para monitorear los compuestos en modo SIM

Compuesto	Iones seleccionados
4-n-Nonilfenol	179, 277 y 292
Nonilfenoles	193, 207 y 221
Bisfenol F	179, 329 y 344

III.2.4. Cuantificación de 4-n-Nonilfenol e isómeros de nonilfenol en muestras de lodo

El lodo empleado para el desarrollo del método se obtuvo del reactor biológico de la planta de tratamiento de aguas residuales ubicada a un costado de la Terminal de Autobuses de la ciudad de Querétaro. El lodo presentó un contenido de sólidos volátiles de 77.08%. Como paso preliminar a su exposición a los contaminantes, los sólidos suspendidos del licor mezclado (SSLM) se ajustaron a $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y se inactivaron al adicionar $1.5 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ de Hg_2SO_4 ($200 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). El lodo se enjuagó con solución salina al 0.9% y centrifugó a 1400xg antes de emplearlo en las pruebas de extracción. Se colocaron 50 g de lodo inactivado y un volumen de 75 mL de agua destilada a la que se adicionaron los contaminantes a una concentración conocida en matraces Erlenmeyer forrados con aluminio y tapones de caucho recubiertos de teflón a fin de evitar la fotólisis de los compuestos. Los matraces se colocaron en un agitador orbital a 180 r.p.m. durante 3 h. Al término de este proceso, el lodo se centrifugó a 1400xg durante 5 minutos. El sobrenadante obtenido se sometió a un proceso de limpieza con extracción en fase sólida con cartuchos OASIS HLB como se describió en el apartado III.2.

Las metodologías evaluadas se describen a continuación, se basan en las condiciones reportadas por Fountoulakis et al (2005). Cada patrón de la curva de calibración se realizó por triplicado. El blanco empleado para cada prueba de extracción fue lodo inactivado sin exposición a los contaminantes. Se evaluó la extracción con una mezcla de disolventes acetona/hexano (1:1).

Extracción por ultrasonido con lodo seco. El sedimento obtenido tras la centrifugación se secó en horno a 35 °C en recipientes de vidrio. Posteriormente, el lodo seco se pulverizó y se colocaron muestras de 1 – 1.5 g en tubos de vidrio ámbar de 40 mL. A continuación se adicionaron 5 mL de la mezcla de disolventes a cada tubo y se colocaron en baño de ultrasonido. El procedimiento de extracción fue similar al descrito en el apartado anterior.

Extracción en horno de microondas con lodo seco. El sedimento obtenido tras la centrifugación se secó en horno a 35 °C en recipientes de vidrio. Posteriormente, el lodo seco se pulverizó y se pesó. La muestra (1-1.5 g) se colocó en un tubo de extracción de PFTA y se adicionaron 20 mL de la mezcla de disolventes. La extracción se llevó a cabo en un horno de microondas (MARS 5, CEM) equipado con sensores de temperatura y presión. La temperatura y potencia de trabajo fueron de 120 °C y 1200 W, respectivamente. El tiempo de extracción fue de 40 minutos divididos de la siguiente manera, una rampa de 20 minutos para alcanzar la temperatura de trabajo y 20 minutos de sostenimiento. Después de enfriarse, los extractos se colectaron en tubos de vidrio ámbar de 40 mL y se evaporaron bajo corriente de N₂ (2 L·min⁻¹) hasta un volumen de 2 mL y se resuspendieron en 100 mL de agua destilada. Finalmente, las muestras se sometieron a un proceso de limpieza con extracción en fase sólida empleando cartuchos OASIS HLB seguido de derivatización antes de su inyección en el cromatógrafo de gases (Ver apartados III.2, III.2.2 y III.2.3).

III.2.5. Cálculos

Los resultados del desarrollo del método de extracción se compararon para encontrar diferencias significativas usando el análisis de varianza (ANOVA) con el software NCSS 2007, además del software MATLAB 7.8.0.347 para el análisis de mínimos cuadrados bivariantes. Los límites de detección y cuantificación se calcularon de acuerdo a las ecuaciones reportadas por Currie (1997). Este autor expone que la curva de referencia o de calibración puede emplearse para determinar la desviación estándar del blanco (Ecuación III.1).

$$S_0 = \frac{S_y}{m} \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{L} + \frac{\bar{x}^2}{\sum (x - \bar{x})^2}}$$

Ecuación III.1

Donde,

S_0 y S_Y , representan la desviación estándar del blanco y de los residuales de la calibración, respectivamente.

m , indica el valor de la pendiente de la calibración.

N es el número de patrones de calibración empleados.

L , indica el número de réplicas de los patrones de calibración empleados.

x , representa la concentración de los patrones de calibrado.

\bar{x} , indica el valor de la media de las concentraciones de los patrones de calibrado.

Para determinar el límite de detección y de cuantificación se empleó la ecuación dada por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC, por sus siglas en inglés):

$$C_L = \frac{k S_0}{m} \quad \text{Ecuación III.2}$$

Donde,

C_L , representa una concentración neta del analito.

k , representa el múltiplo de la desviación estándar del blanco de acuerdo al nivel de confianza. Se recomienda que el valor de este múltiplo sea 3.29 para el cálculo del límite de detección y de 10 para el cálculo del límite de cuantificación.

Por otra parte, Long y Winefordner (1983) mencionan que cuando el menor punto en la curva de calibración está demasiado alejado del límite de detección, se debe hacer uso del modelo de aproximación por propagación de errores para obtener una mejor aproximación de los límites de cuantificación y de detección de un analito. En dicho modelo, se incluyen los errores del cálculo de la pendiente y la ordenada al origen de la curva de calibración. Este modelo también puede emplearse cuando la curva de calibración no es lineal, es decir, que aunque el procedimiento de ajuste de la regresión lineal de como resultado un valor de ' m ', esto no implica que sea una representación real de la sensibilidad analítica en todo el rango de concentraciones empleadas. Las curvas de calibración no lineales, generalmente, presentan valores significativos en la ordenada al origen, así como en la desviación estándar de la pendiente y la ordenada.

$$C_L = \frac{k \sqrt{S_0^2 + S_b^2 + \left(\frac{b}{m}\right)^2 S_m^2}}{m} \quad \text{Ecuación III.3}$$

Donde,

b , representa el valor de la pendiente de la curva de referencia.

S_b , representa la desviación estándar de la pendiente de la curva de referencia.

S_m , representa la desviación estándar de la ordenada al origen de la curva de referencia.

III.3. Enriquecimiento de bacterias nitrificantes a partir de lodo activado

III.3.1. Inóculo

El enriquecimiento se realizó a partir de lodos activados del reactor biológico de la planta de tratamiento de aguas residuales de Santa Rosa Jauregui, Qro. La biomasa se cultivó en lote secuenciado alimentándola con NH_4^+ y HCO_3^- como únicas fuentes de nitrógeno y carbono para favorecer el crecimiento de las bacterias nitrificantes litoautotróficas. Cada lote tuvo una duración de 24 horas y se suministró aireación suficiente a fin de mantener una concentración de oxígeno disuelto cercana a la saturación. Al final de cada lote se determinó la concentración de amonio residual, nitrito y nitrato producidos. Se realizaron enriquecimientos a diferentes relaciones C/N, la composición del medio mineral de cada una se describe en la Tabla III.3.

Tabla III.3. Composición del medio mineral para el enriquecimiento de bacterias nitrificantes

C/N = 1.7		C/N = 2.5		C/N = 5.0	
Compuesto	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Compuesto	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Compuesto	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
NH_4Cl	4.14	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.18	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5.11
Na_2HPO_4	0.443	NH_4Cl	0.94	NaHCO_3	39.37
KH_2PO_4	0.214	KH_2PO_4	1.40	KH_2PO_4	3.0
NaHCO_3	12.89	MgSO_4	0.60	MgSO_4	0.185
$\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.075	NaCl	1.0	CaCl_2	0.029
H_3BO_3	0.008	NaHCO_3	9.33	FeSO_4	0.003
$\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.003			EDTA	0.006
KI	0.003			CuSO_4	0.006
$\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.006				
$\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.008				
$\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.006				
Temperatura	25 °C	Temperatura	Ambiente	Temperatura	30 °C

III.3.2. Análisis de las muestras

Para realizar la cuantificación de N-NH_4^+ se utilizó el kit AmVer High Rate de HACH, el cual proporciona una respuesta colorimétrica que fue medida en un espectrofotómetro DR 2010 de HACH. El N-NO_2^- y N-NO_3^- se cuantificaron por cromatografía de iones en un cromatógrafo DIONEX 1500 IC. Las condiciones de operación se describen en la Tabla III.4.

Tabla III.4. Condiciones de operación del cromatógrafo de iones

Precolumna	IonPac AG23 4x50 mm
Columna	Ion Pac AS23 4x250 mm
Temperatura de la columna	30 °C
Supresor de iones	ASRS 300 4mm
Corriente del supresor	25 mA
Fase Móvil	Carbonato 4.5 mM/Bicarbonato 0.8 mM
Flujo	1 mL·min ⁻¹
Tiempo de análisis	16 min

III.4. **Pruebas de biodegradabilidad de los isómeros de nonilfenol**

III.4.1. Inóculos empleados

Se emplearon tres inóculos diferentes para evaluar la biodegradación de la mezcla técnica de nonilfenoles en pruebas en lote, enriquecimiento de bacterias nitrificantes a una relación C/N=5.0, consorcio degradador de 4-clorofenol (4CF) y lodo activado de una planta de tratamiento municipal.

Las bacterias nitrificantes se obtuvieron por enriquecimiento a partir de lodo activado como se describe en el apartado III.3.1. La biomasa nitrificante se mantuvo en un reactor discontinuo secuencial operado por 150 días hasta obtener una tasa de nitrificación de $0.6 \pm 0.05 \text{ gN-NH}_4^+ \cdot \text{g}^{-1} \text{ SSV} \cdot \text{h}^{-1}$. El consorcio degradador de 4-clorofenol se obtuvo de un reactor discontinuo de membrana sumergida operado en el laboratorio con una tasa de degradación de $39.3 \pm 1 \text{ mg 4CF} \cdot \text{g}^{-1} \text{ SSV} \cdot \text{h}^{-1}$. El lodo activado se colectó de la planta de tratamiento de agua residual ubicada a un costado de la Terminal de Autobuses de la ciudad de Querétaro. La tasa de respiración del lodo activado fue de $12 \text{ mg O}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{ SSV} \cdot \text{h}^{-1}$.

III.4.2. Ensayo de biodegradabilidad

La prueba de biodegradabilidad se realizó en botellas con un volumen nominal de 300 mL, las cuales se envolvieron con papel aluminio para prevenir la fotólisis. Cada botella contenía medio mineral y la mezcla técnica de nonilfenoles a una concentración inicial de $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. La concentración de cada inóculo se fijó en $1 \text{ g SS}\cdot\text{L}^{-1}$, con una fracción de sólidos volátiles de $79 \pm 3\%$. El pH inicial se ajustó en 7.5 y se mantuvo así empleando una solución 0.5 M de NaHCO_3 . Las botellas se incubaron a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ y se suministró aire suficiente a fin de mantener el medio saturado de O_2 . Adicionalmente, se establecieron dos controles, el primero contenía únicamente medio mineral y el contaminante; el segundo control contenía medio mineral y el consorcio a evaluar.

Todas las pruebas se corrieron por triplicado, considerando que en cada muestreo las botellas eran sacrificables. El muestreo se realizó cada 48 h durante 10 d y se determinó la concentración de isómeros de nonilfenol en la fase líquida y en la fase sólida de acuerdo a las técnicas analíticas descritas previamente (III.2 y III.2.4). Para la cuantificación de los isómeros de nonilfenol, el volumen de cada botella (150 mL) se centrifugó a $1400\times\text{g}$ para separar ambas fases.

III.4.3. Medio mineral

La composición del medio mineral, por litro fue: NaHCO_3 950 mg, KH_2PO_4 750 mg, K_2HPO_4 1500 mg, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 185 mg, $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 29 mg, $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3 mg, $\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 6 mg y $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 6 mg. Durante la prueba de biodegradabilidad con las bacterias nitrificantes, se adicionaron $660 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al medio mineral.

III.4.4. Cálculos

Para determinar los porcentajes de biodegradación (Ecuación III.4), adsorción (Ecuación III.5) y remoción (Ecuación III.6) de la tNP en cada inóculo, se procedió a realizar un balance de masa como a continuación se describe:

$$\%t\text{NP}_{\text{Biodeg}} = \left(\frac{t\text{NP}_0 - (t\text{NP}_{\text{liquido}} - t\text{NP}_{\text{sólido}})}{t\text{NP}_0} \right) \times 100 \quad \text{Ecuación III.4}$$

$$\%t\text{NP}_{\text{Adsorb}} = \left(\frac{t\text{NP}_{\text{sólido}}}{t\text{NP}_0} \right) \times 100 \quad \text{Ecuación III.5}$$

$$\%tNP_{\text{Remov}} = \left(1 - \frac{tNP_{\text{líquido}}}{tNP_0} \right) \times 100 \quad \text{Ecuación III.6}$$

Donde,

tNP_0 , $tNP_{\text{líquido}}$ y $tNP_{\text{sólido}}$ expresan las cantidades de tNP al inicio del experimento y en la fase líquida y sólida en μmol .

Diversos autores han reportado que la degradación del nonilfenol se ajusta a una cinética de primer orden (Chang et al., 2004, 2005a, 2008; Kim et al., 2007). Por tanto, se analizó si los datos obtenidos de la remoción y la degradación de los isómeros podían ajustarse a los modelos cinéticos de orden cero (Ecuación III.7) y de primer orden (Ecuación III.8):

$$tNP = k_0 t + tNP_0 \quad \text{Ecuación III.7}$$

$$tNP = tNP_0 e^{-k_1 t} \quad \text{Ecuación III.8}$$

La vida media para cada modelo cinético se calculó de la siguiente manera:

$$t_{1/2} = \frac{tNP_0}{2k_0} \quad \text{Ecuación III.9}$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_1} \quad \text{Ecuación III.10}$$

Donde,

$t_{1/2}$ representa el valor de vida media en h.

tNP_0 y tNP expresan la cantidad de tNP al inicio y al tiempo 't' en μmol , respectivamente.

k_0 y k_1 son las constantes de velocidad de reacción en $\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}$ y h^{-1} , respectivamente.

III.5. Coeficiente de sorción de la mezcla técnica de nonilfenoles

III.5.1. Sorbente

Para determinar el coeficiente de sorción de la tNP se empleó como matriz sólida parte del consorcio nitrificante a una relación C/N igual que 5 obtenido por enriquecimiento a partir del lodo activado como se describió en el apartado III.3.1. El lodo se centrifugó y se enjuagó con solución salina al 0.9%. Los sólidos suspendidos del licor mezclado (SSLM) se ajustaron a $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y se inactivaron al adicionar $1.5 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ de Hg_2SO_4 ($200 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). El lodo se enjuagó nuevamente con solución salina al 0.9% antes de emplearlo en la prueba de adsorción.

III.5.2. Determinación del equilibrio de sorción

La prueba se realizó en un volumen de trabajo de 75 mL. Los matraces se envolvieron en papel aluminio para evitar la fotodegradación de los compuestos y los tapones de los matraces se envolvieron con teflón a fin de reducir las pérdidas por la adsorción en los materiales. Se fijó una concentración de SSLM de $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ empleando una solución 0.01 M de CaCl_2 como fase líquida. Para determinar el equilibrio de sorción se empleó una concentración de $100 \mu\text{g tNP}\cdot\text{L}^{-1}$. Se colocaron en un agitador orbital a 120 rpm. La temperatura se mantuvo a $30 \text{ }^\circ\text{C}$. El muestreo se realizó a las 0.5, 3, 6, 12, 24 y 48 h por duplicado. Se determinó la concentración de tNP en la fase líquida y en la fase sólida, como se describe en los apartados III.2 y III.2.4, a fin de establecer la ausencia de un proceso de biodegradación durante el experimento.

III.5.3. Isoterma de adsorción

Una vez determinado el tiempo en que se estabiliza la adsorción, para cada compuesto se evaluaron concentraciones en un rango de 10 a $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, bajo las condiciones descritas en el apartado anterior. Los experimentos se realizaron por duplicado.

III.5.4. Cálculos

La descripción de las características de adsorción se hace por medio de valores característicos y el cálculo de las isotermas de adsorción. Un valor característico frecuentemente empleado para la evaluación de la adsorción es el coeficiente específico de adsorción K_D . Este coeficiente de distribución se define como la proporción de las concentraciones de equilibrio de una sustancia de prueba disuelta en un sistema de dos

fases que consta de un adsorbente y una fase acuosa. Adicionalmente, la isoterma de adsorción puede determinarse de acuerdo al modelo de Freundlich.

Como primer paso, se debe determinar el equilibrio de adsorción. Después de cierto tiempo de contacto se alcanza una distribución definida del adsorbente entre la fase sólida y líquida. Este equilibrio dinámico de la mezcla de isómeros de nonilfenol en una matriz orgánica como es el lodo biológico, puede calcularse como:

$$q_e = \frac{(C_0 - C_e)}{\text{SSLM}} \quad \text{Ecuación III.11}$$

Donde,

q_e representa la concentración de equilibrio de adsorción, en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ SSLM

C_0 representa la concentración inicial del compuesto, en $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

C_e representa la concentración del compuesto en el equilibrio, en $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

SSLM representa la concentración de sólidos suspendidos de licor mezclado, en $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

1

La cinética de adsorción se analizó empleando el modelo de pseudo-segundo orden descrito por Demirbas et al., (2004). El ajuste entre los datos experimentales y los valores predichos por el modelo se expresan a través del coeficiente de correlación. En la Ecuación III.12 se muestra dicho modelo.

$$\frac{dq}{dt} = k_2 (q_e - q)^2 \quad \text{Ecuación III.12}$$

Donde,

k_2 representa a la constante de adsorción de pseudo-segundo orden, en $\text{g}\cdot\mu\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$

q_e representa la concentración de equilibrio de adsorción, en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ SSLM

q , representa la concentración adsorbida al tiempo 't', en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ SSLM

La Ecuación III.12 puede integrarse con las condiciones límite $t = 0$ hasta $t = t$ y $q = 0$ hasta $q = q_e$. Rearreglando la ecuación se obtiene una forma lineal.

$$\frac{t}{q} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{1}{q_e} t \quad \text{Ecuación III.13}$$

El gráfico de t/q en función de t proporciona una relación lineal donde q_e y k_2 pueden determinarse a partir de los valores de la pendiente y la ordenada al origen, respectivamente.

La isoterma de adsorción se evaluó empleando el modelo de Freundlich (Ecuación III.14) y un modelo lineal (Ecuación III.15) para determinar el coeficiente específico de adsorción (K_D).

$$q = k_F C_e^{\frac{1}{n}} \quad \text{Ecuación III.14}$$

$$K_D = \frac{q}{C_e} \quad \text{Ecuación III.15}$$

Donde,

q expresa la concentración adsorbida, en $\mu\text{g tNP}\cdot\text{g}^{-1}$ SSLM

C_e expresa la concentración en la fase líquida en el equilibrio, en $\mu\text{g tNP}\cdot\text{L}^{-1}$

k_F expresa el coeficiente de adsorción de Freundlich, en $\mu\text{g}^{(1-1/n)}\text{tNP}\cdot\text{L}^{1/n}\cdot\text{g}^{-1}$ SSLM

n expresa el coeficiente de regresión del modelo de adsorción de Freundlich

K_D expresa el coeficiente de distribución, en $\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$ SSLM

III.6. Reactor discontinuo de membranas sumergidas

III.6.1. Material y equipo

El reactor empleado fue un reactor discontinuo de membrana sumergida (MSBR, por sus siglas en inglés) aerobio de acero inoxidable con recubrimiento de teflón cuyo volumen operacional fue de 7.2 L y un volumen de intercambio de 25% (Figura III.1). Para mantener la temperatura estable se colocó un chaqueta al reactor a través de la cual se recirculó agua precalentada. Se empleó la membrana descrita en el apartado III.7.1. El reactor se equipó con un manovacuómetro, bomba peristáltica para llenado (Cole-Parmer “Masterflex” modelo 7523-20), bomba peristáltica para filtrado (Cole-Parmer “Masterflex” modelo 7523-20) y bomba de diafragma para el retro-lavado (ProMinent modelo GALA). La tubería empleada fue de teflón.

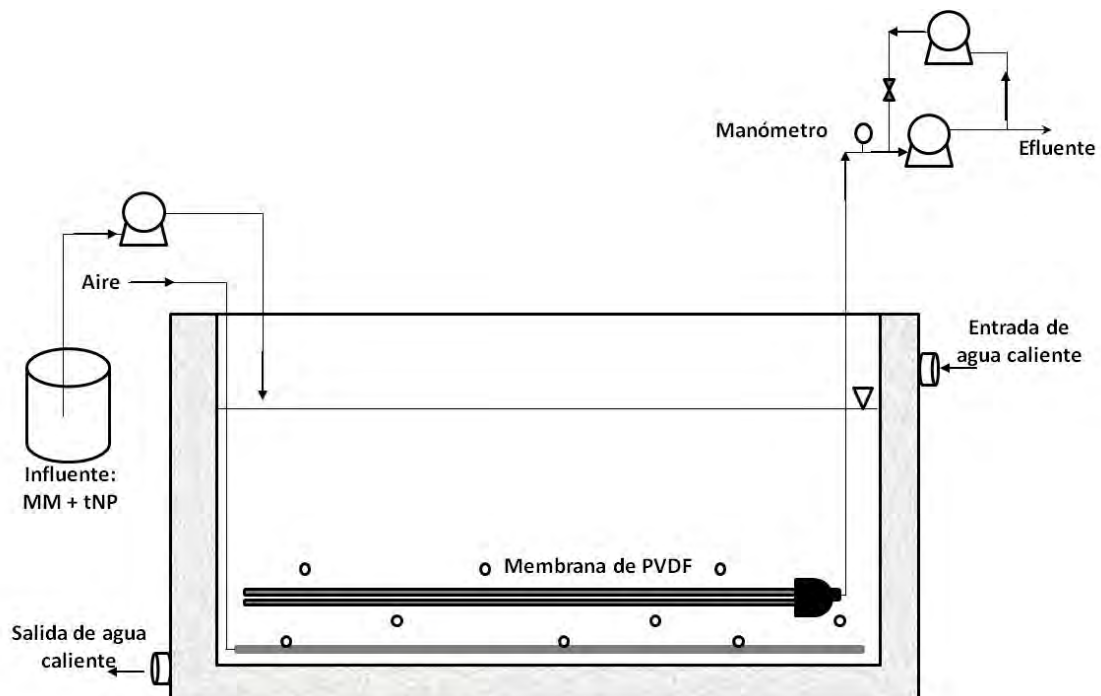


Figura III.1. Diagrama del biorreactor discontinuo de membrana sumergida empleado en este estudio.

III.6.2. Prueba de adsorción

Antes del inicio de operación, el reactor se llenó con alimentación adicionada con mezcla técnica de nonilfenoles (tNP) y 4-n-nonilfenol (4NP) a concentraciones de $500 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. El reactor se operó bajo las condiciones mostradas en la Tabla III.5. La prueba tuvo una duración de 3 ciclos, durante este periodo el reactor, la membrana, los conectores y la tubería se saturaron con ambos contaminantes. El muestreo se realizó a las 1, 24, y 48 h de cada ciclo a fin de determinar la concentración residual de cada contaminante.

Tabla III.5. Tiempos de operación del MSBR durante la prueba de adsorción

Fase de operación	Tiempo, min
Llenado	8
Reacción	2751
Filtración	110
Reposo	10

III.6.3. Inóculo

De acuerdo a los resultados obtenidos de las pruebas de biodegradabilidad se seleccionó el consorcio nitrificante como inóculo para el arranque y operación del MSBR. Previo al arranque, el enriquecimiento nitrificante obtenido a una relación C/N = 5.0 se colocó en un recipiente de vidrio con volumen de 4 L, a una temperatura de 30 °C y con suministro de aire por medio de difusores sumergidos. El lodo nitrificante se expuso a la mezcla de isómeros de nonilfenol durante 48 h adicionando 1 mg·L⁻¹ de tNP y 500 µg·L⁻¹ de 4-n-NP, a fin de que la biomasa adsorbiera dichos contaminantes. Al finalizar el periodo de 48 h, el consorcio nitrificante se colocó en el reactor discontinuo de membrana sumergida. La concentración de sólidos suspendidos volátiles del licor mezclado (SSVLM) del MSBR se fijó en 3.5 g·L⁻¹.

III.6.4. Alimentación

La alimentación se preparó en botellas de vidrio color ámbar de 4 L. La composición del medio mineral se mantuvo igual a la descrita en la Tabla III.3. La mezcla técnica de nonilfenoles se adicionó al medio mineral a una concentración de 2 mg·L⁻¹, de tal manera que la concentración inicial en el reactor sería de 500 µg·L⁻¹. El pH de la alimentación se fijó en 7.0 y se monitoreó durante cada ciclo, ajustándose cuando fuera necesario con la adición de H₂SO₄. Se tomaron muestras de la alimentación y el efluente para determinar la concentración de tNP.

III.6.5. Estrategia de operación

El MSBR, se operó bajo las condiciones descritas en la Tabla III.6. Diariamente se realizó el registro de la presión transmembrana así como del flux crítico a fin de determinar el momento en que el módulo de membrana requeriría limpieza química. La duración del ciclo de operación en el MSBR fue de 24 h.

Tabla III.6. Tiempos de operación del MSBR

Fase de operación	Tiempo, min
Llenado	4
Reacción	1318
Filtración	108
Reposo	10

El volumen de intercambio de fase líquida fue de 25% y se fijó un tiempo de retención de sólidos (TRS) equivalente a 20 d. El calendario del muestreo se describe en la Tabla III.7.

Tabla III.7. Muestreo realizado en el MSBR

Tipo de muestra	Día de muestreo
Alimentación	Lunes y Jueves
MSBR (t_0)	Lunes y Jueves
Efluente	Lunes, Miércoles, Viernes y Sábado
Lodo	Lunes

Las muestras se analizaron empleando las técnicas descritas en los apartados III.2 y III.2.4. La determinación de compuestos nitrogenados se realizó de acuerdo a lo descrito en el apartado III.3.2.

III.6.6. Identificación de intermediarios

Se identificaron los intermediarios producidos durante la biotransformación de los isómeros de nonilfenol a través del muestreo, cada 4 horas, durante el ciclo de operación del MSBR. Para esta determinación se consideraron cuatro ciclos de operación. Los datos obtenidos a partir de estas muestras también se emplearon para determinar las tasas de remoción y degradación de isómeros de nonilfenol en el biorreactor. La muestra se centrifugó a 1400xg para separar la fase sólida (lodo) de la fase líquida. El sobrenadante obtenido después de la centrifugación se analizó de acuerdo a lo descrito en los apartados III.2 al III.2.3. Los intermediarios se seleccionaron al presentarse en un mínimo de 3 ciclos de operación. La identificación se realizó analizando el cromatograma obtenido en modo SCAN y utilizando la biblioteca del equipo para su identificación. Se consideró un porcentaje de similitud entre el cromatograma de iones totales (TIC, por sus siglas en inglés) y el estándar de la biblioteca del equipo superior al 85%.

III.6.7. Cálculos

Sólo los mecanismos de adsorción y degradación se consideraron en este estudio para la realización de los balances de masa. Las ecuaciones para el cálculo del flujo másico

de isómeros de nonilfenol en el reactor discontinuo de membrana sumergida se basan en aquellas reportadas por Clara et al (2005b), donde, además de considerar el flujo másico por el exceso de lodo también se empleó la adsorción a partir del lodo producido. La cantidad de lodo que se producía en cada ciclo del MSBR se calculó de acuerdo con la Ecuación III.19, descrita por Metcalf y Eddy (2003), considerando que en el consorcio existen bacterias heterótrofas y autótrofas.

$$tNP_{inf} = Q_0 S_{inf} (1 + K_D SS_0) \quad \text{Ecuación III.16}$$

$$tNP_{efl} = Q_e S_e (1 + K_D SS_e) \quad \text{Ecuación III.17}$$

$$tNP_{EL} = S_e (Q_{EL} + Q_e K_D P_X) \quad \text{Ecuación III.18}$$

$$P_X = \frac{1}{Q} \left[\frac{QY(DQO_{inf} - DQO_{efl})}{1 + (k_d) TRS} + \frac{(f_d)(k_d) QY(DQO_{inf} - DQO_{efl}) TRS}{1 + (k_d) TRS} + \frac{QY_n(NO_x)}{1 + (k_{dn}) TRS} \right] \quad \text{Ecuación III.19}$$

$$\% \text{ Remoción} = \frac{(tNP_{inf} - tNP_{efl})}{tNP_{inf}} \times 100 \quad \text{Ecuación III.20}$$

$$\text{Fracción removida por adsorción} = \frac{P_X K_D}{1 + SSLM \cdot K_D} \quad \text{Ecuación III.21}$$

$$\text{Biotransformación} = tNP_{inf} - tNP_{efl} - tNP_{EL} = -k_{obs} X_{SSV} V_R \quad \text{Ecuación III.22}$$

$$\% \text{ NO}_2^- \text{ producido} = \frac{[N\text{-NO}_2^-]_{efl}}{[N\text{-NH}_4^+]_{inf} - [N\text{-NH}_4^+]_{efl}} \times 100 \quad \text{Ecuación III.23}$$

$$\% \text{ NO}_3^- \text{ producido} = \frac{[N\text{-NO}_3^-]_{efl}}{[N\text{-NH}_4^+]_{inf} - [N\text{-NH}_4^+]_{efl}} \times 100 \quad \text{Ecuación III.24}$$

Donde,

Q_0 , Q_e , Q_{EL} , representan el flujo volumétrico en el influente, efluente, exceso de lodo, respectivamente en $L \cdot d^{-1}$.

tNP_{inf} , tNP_{eff} , tNP_{EL} , representan el flujo másico en el influente, efluente, exceso de lodo, respectivamente en $\mu g \cdot d^{-1}$

S_{inf} , S_e , representan la concentración de tNP en el influente y en el efluente, respectivamente, en $\mu g \cdot d^{-1}$.

SS_0 , SS_e , representan la concentración de sólidos suspendidos en el influente y en el efluente, respectivamente en $g \cdot L^{-1}$.

K_D , representa el coeficiente de distribución en $L \cdot g^{-1}$.

Y , Y_n , representan el rendimiento de biomasa para bacterias heterótrofas ($0.40 g \text{ SSV} \cdot g^{-1} \text{ DQO}$) y bacterias nitrificantes ($0.12 g \text{ SSV} \cdot g^{-1} \text{ N-NH}_4^+$), respectivamente.

k_d , k_{dn} , representan el coeficiente de decaimiento para bacterias heterótrofas ($0.12 g \text{ SSV} \cdot g^{-1} \text{ SSV} \cdot d^{-1}$) y bacterias nitrificantes ($0.08 g \text{ SSV} \cdot g^{-1} \text{ SSV} \cdot d^{-1}$), respectivamente.

f_d , representa la fracción celular de desecho (0.15).

DQO_{inf} , DQO_{eff} , representan la concentración de materia orgánica en el influente y en el efluente, respectivamente, en $mg \cdot L^{-1}$.

TRS, representa el tiempo de retención de sólidos en d.

P_x , representa la producción de lodo en cada ciclo de operación en $g \cdot L^{-1}$.

SSLM, representa la concentración de sólidos suspendidos en el licor mezclado, en $g \cdot L^{-1}$.

k_{obs} , representa la tasa de transformación, en $\mu g \text{ tNP} \cdot g^{-1} \text{ SSV} \cdot d^{-1}$.

X_{SSV} representa la concentración de sólidos suspendidos volátiles en el reactor, en $g \text{ SSV} \cdot L^{-1}$.

V_R , representa el volumen del reactor, en L.

$[N-NH_4^+]_{infl}$, $[N-NH_4^+]_{eff}$, representa el flujo másico de nitrógeno amoniacal en el influente y en el efluente, respectivamente, en $mg \cdot d^{-1}$.

$[N-NO_2^-]_{eff}$, representa el flujo másico de nitrógeno de nitrito en el efluente, en $mg \cdot d^{-1}$.

$[N-NO_3^-]_{eff}$, representa el flujo másico de nitrógeno de nitrato en el efluente, en $mg \cdot d^{-1}$.

III.7. Flux crítico y presión transmembrana

III.7.1. Materiales

La membrana que se utilizó fue un módulo de membrana sumergida para pruebas piloto de ultrafiltración (MEMOS GmbH) con un peso molecular de corte de 250 kDa, área superficial de $0.04 m^2$ y construida de fluoruro de polivinilideno (PVDF). El filtrado se realizó

con una bomba peristáltica (Cole-Parmer modelo 7523-20) y el monitoreo de la presión transmembrana se realizó con un manovacuómetro análogo. El lodo activado se colectó del reactor biológico de la planta de tratamiento de aguas residuales de la Terminal de Autobuses de la ciudad de Querétaro.

III.7.2. Procedimiento

Como pruebas preliminares en el montaje y puesta en marcha del reactor discontinuo de membrana sumergida se realizaron pruebas de filtración con la membrana. Dichas pruebas consistieron en dos tipos de filtraciones, la primera con agua y la segunda con lodo a una concentración de $3500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Esta filtración tuvo una duración de 30 minutos, variando la succión de la bomba peristáltica de una prueba a otra y monitoreando los cambios en el flux y la presión transmembrana (PTM). Estas pruebas permitieron determinar el flux crítico (Ognier et al., 2004). El límite máximo de PTM se estableció de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, el cual menciona que la membrana soporta una presión máxima de operación de 60 kPa.

III.7.3. Limpieza química

El lavado químico de la membrana fue aplicado cuando la PTM alcanzó un valor cercano al límite de operación. La limpieza química fue realizada sometiéndola a dos tratamientos como lo indica el fabricante: (1) tratamiento alcalino: la membrana se sumergió en una solución de NaOH 1 N a pH 11 durante 12 h seguido de un retrolavado de 15 min con agua destilada; (2) tratamiento ácido: la membrana se sumergió en una solución de HNO_3 1 N a pH 1.5 durante 12 h seguido de un retrolavado de 15 min con agua destilada.

III.8. *Inhibición con alitiourea en pruebas en lote.*

III.8.1. Inóculo

El consorcio empleado para esta prueba provino del MSBR. Se cosechó durante la fase de reposo y se mantuvo en estado de inanición durante 24 horas. Parte de la biomasa cosechada se inactivó con la adición de azida de sodio ($2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$).

III.8.2. Biodegradabilidad de la mezcla técnica de nonilfenoles en presencia de aliltiourea.

La prueba de biodegradabilidad se realizó por triplicado en botellas con un volumen nominal de 300 mL, las cuales se envolvieron con papel aluminio para prevenir la fotólisis de los compuestos. Se incubaron a 30 °C bajo condiciones aerobias. Cada botella contenía medio mineral, mezcla técnica de nonilfenoles (500 µg·L⁻¹) y aliltiourea (ATU) a una concentración de 10 mg·L⁻¹. La concentración de sólidos se fijó en 0.75 g SST·L⁻¹ para todas las botellas. La composición del medio mineral se muestra en la Tabla III.8. El pH inicial se ajustó en 7.5. Adicional a las botellas de prueba, se manejaron tres controles, el primero contenía únicamente medio mineral y la mezcla técnica y en el segundo control se tuvo medio mineral más la biomasa. El tercer control contenía biomasa inactiva, medio mineral, ATU y tNP. El muestreo se realizó cada 48 h durante 10 días y se analizaron las fases líquida y sólida para determinar el contenido de tNP.

Las muestras se analizaron empleando las técnicas descritas en los apartados III.2 y III.2.4. La determinación de compuestos nitrogenados se realizó de acuerdo a lo descrito en el apartado III.3.2.

Tabla III.8. Composición del medio mineral empleado para la prueba de biodegradabilidad con aliltiourea.

Compuesto	g·L ⁻¹	Solución	mL·L ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.30	MgSO ₄ 1M	0.75
NaHCO ₃	0.7	CaCl ₂ 1M	0.20
KH ₂ PO ₄	0.4	FeSO ₄ 30 mM/EDTA 50mM	0.33
		CuSO ₄ 50 mM	0.02

III.9. **Efecto de la concentración de nonilfenol sobre la actividad nitrificante y nitrito-oxidante.**

III.9.1. Inóculos

Los inóculos empleados se obtuvieron por enriquecimiento a partir de lodos activados del reactor biológico de la planta de tratamiento de aguas residuales de Santa Rosa Jauregui, Qro. La biomasa se cultivó en lote secuenciado alimentándola con NH₄⁺ y HCO₃⁻ como únicas fuentes de nitrógeno y carbono para favorecer el crecimiento de las bacterias nitrificantes litoautotróficas. Cada lote tuvo una duración de 24 horas y se

suministró aireación suficiente a fin de mantener una concentración de oxígeno disuelto cercana a la saturación. Al final de cada lote se determinó la concentración de amonio residual, nitrito y nitrato producidos. Se realizaron enriquecimientos a diferentes relaciones C/N, la composición del medio mineral de cada una se describe en la Tabla III.3.

III.9.2. Disolución tampón

Se evaluaron las actividades autótrofas (nitrificante y nitrito-oxidante) y heterótrofas de los consorcios nitrificantes empleados. Para ello se prepararon soluciones tampón a fin de realizar lavados a la biomasa antes del inicio de los ensayos en respirómetro. La composición de cada solución tampón se describe en la Tabla III.9.

Tabla III.9. Composición de la solución tampón para ensayos de respirometría

Actividad autótrofa		Actividad heterótrofa	
Compuesto	g·L ⁻¹	Compuesto	g·L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	0.33	KH ₂ PO ₄	3.31
K ₂ HPO ₄	0.40	K ₂ HPO ₄	3.97
MgSO ₄	0.90	MgSO ₄	0.90
MgCl ₂ ·10H ₂ O	1.52	MgCl ₂ ·10H ₂ O	1.52
NaCl	0.80	NaCl	0.80
NaHCO ₃	3.0	NaHCO ₃	0.21
Elementos traza	5 mL·L ⁻¹		

III.9.3. Ensayos en respirometría

Para evaluar el efecto que los isómeros de nonilfenol (tNP) y el 4-n-nonilfenol (4-n-NP) ejercen sobre la actividad nitrificante, la actividad nitrito-oxidante y la actividad heterótrofa se realizaron ensayos empleando un método respirométrico. Este método se basa en el seguimiento de la tasa de consumo de oxígeno a través de un monitor de oxígeno biológico (BOM, YSI modelo 5300). La biomasa se lavó 3 veces con la solución tampón correspondiente de acuerdo a la actividad a evaluar. Posteriormente, se concentró hasta un valor aproximado de 1 g·L⁻¹ para cada ensayo.

Las concentraciones evaluadas de los isómeros estuvieron en el intervalo de 100 a 1000 µg·L⁻¹ (Tabla III.10). El vial de reacción tiene un volumen de 65 mL, agitado

magnéticamente. Cada inóculo se evaluó a su temperatura de enriquecimiento. La actividad amonio-oxidante se evaluó con una concentración de sustrato de 20 mg N-NH₄⁺·L⁻¹. Para la actividad nitrito-oxidante, la concentración de sustrato empleada fue de 10 mg N-NO₂⁻·L⁻¹. La actividad heterótrofa se evaluó con una concentración de sustrato de 100 mg DQO·L⁻¹. Para descartar el efecto que el disolvente ejerza sobre la actividad biológica del consorcio en las pruebas realizadas con la solución estándar en metanol, se realizaron ensayos con los diferentes volúmenes de metanol añadidos. Cada ensayo se hizo por duplicado. Al finalizar cada ensayo se determinó el contenido de biomasa en los viales por gravimetría con un volumen de muestra de 10 mL. El resto de la muestra se filtró (0.45 µm) para la determinación de amonio, nitrito y nitrato de acuerdo a lo descrito en el apartado III.3.2.

Tabla III.10. Concentraciones de nonilfenol empleadas en los ensayos respirométricos

Solución	0 µg·L ⁻¹	50 µg·L ⁻¹	250 µg·L ⁻¹	500 µg·L ⁻¹	1000 µg·L ⁻¹
tNP en metanol	x	x	x	x	x
tNP acuosa	x	x	x	x	x
Metanol	x	x	x	x	x

III.9.4. Cálculos

Las actividades autótrofas y heterótrofa se determinaron de acuerdo a las ecuaciones descritas a continuación.

$$\text{Actividad Nitrificante} = \frac{V(m_t - m_e) \left(0.2188 \frac{\text{mg N}}{\text{mg O}_2} \right)}{\text{SSV}} \quad \text{Ecuación III.25}$$

$$\text{Actividad Nitrito-oxidante} = \frac{V(m_t - m_e) \left(0.877 \frac{\text{mg N}}{\text{mg O}_2} \right)}{\text{SSV}} \quad \text{Ecuación III.26}$$

$$\text{Actividad Heterótrofa} = \frac{V(m_t - m_e)}{\text{SSV}} \quad \text{Ecuación III.27}$$

$$\% \text{ Inhibición} = \left(\frac{q_{\text{Control}} - q_{\text{tNP}_i}}{q_{\text{Control}}} \right) \times 100 \quad \text{Ecuación III.28}$$

Donde,

m_t y m_e representan la pendiente de la respiración total y la respiración endógena, respectivamente, en $\text{mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

SSV, representa la concentración de sólidos suspendidos volátiles en el vial de experimentación, en $\text{g SSV} \cdot \text{L}^{-1}$.

$q_{\text{tNP},}$ representa la tasa específica de nitrificación o nitrito-oxidación en presencia de la concentración ' I ' de isómeros de nonilfenol.

q_{Control} , representa la tasa específica de nitrificación o nitrito-oxidación sin presencia de isómeros de nonilfenol.

V , representa el volumen del vial de reacción, en L.

La determinación del IC50 se calculó a través del modelo logístico de cuatro parámetros (4PLM, por sus siglas en inglés). Este modelo de regresión no lineal es comúnmente empleado en el análisis de ajuste de curvas en bioensayos o inmunoensayos como ELISA o para curvas de dosis-respuesta.

$$f(x) = D + \left(\frac{A - D}{1 + \left(\frac{x}{C} \right)^B} \right)$$

Ecuación III.29

Donde,

A, representa el valor mínimo de la variable de respuesta a la concentración mínima empleada en el estudio.

B, representa la pendiente de la curva.

C, representa el punto de inflexión de la curva, es decir, donde la curva cambia de dirección o de signo.

D, representa el valor de la variable de respuesta a la máxima concentración empleada en el estudio.

Resultados y Discusión

IV. Resultados y discusión

IV.1. Implementación de técnicas analíticas.

De acuerdo a la IUPAC, los límites de detección (cantidades mínimas detectables) se derivan de la teoría de la prueba de hipótesis y las probabilidades de obtener falsos positivos (α), y falsos negativos (β). Los límites de cuantificación se definen en términos de un valor específico de desviación estándar relativa de la cantidad estimada. Los valores por defecto para α y β son de 0.05; y el valor por defecto de la desviación estándar relativa para la cuantificación es de 10%.

IV.1.1. Extracción de 4-n-Nonilfenol y Nonilfenoles de muestras acuosas.

Como paso preliminar a la cuantificación del 4-n-Nonilfenol y sus isómeros, se hizo un análisis cualitativo. Para ello, se prepararon soluciones individuales de los analitos en metanol a una concentración de $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y $300 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. Se tomó 1 mL de cada solución y se colocó en un vial de vidrio recubierto con aluminio, bajo corriente de N_2 ($1.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) a fin de evaporar todo el disolvente.

El residuo seco se derivatizó adicionando un volumen de $50 \mu\text{L}$ de de BSTFA-TMCS 1% y $50 \mu\text{L}$ de piridina. El vial se agitó durante 1 minuto en vórtex y se colocó en baño seco a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 20 minutos. El producto obtenido de esta reacción se inyectó en el cromatógrafo de gases con el programa de operación descrito en la Tabla III.4 del capítulo de metodología. De acuerdo a lo reportado en la literatura, se seleccionaron tres iones precursores (Tabla IV.1) para la mezcla de isómeros de nonilfenol, así como para el isómero lineal (4-n-NP). En la Figura IV.1 se observa el cromatograma obtenido en modo SIM para cada uno de los compuestos analizados.

Tabla IV.1. Tiempos retención e iones característicos de los compuestos estudiados.

Compuesto	Tiempo de retención, min	Ión precursor y característicos (m/z)	Referencia
4-n-Nonilfenol	8.786	179, 277 y <u>292</u>	Ballesteros et al., 2006
Isómeros de nonilfenol	6.884 – 8.073	193, 207 y <u>221</u>	Gibson et al., 2007

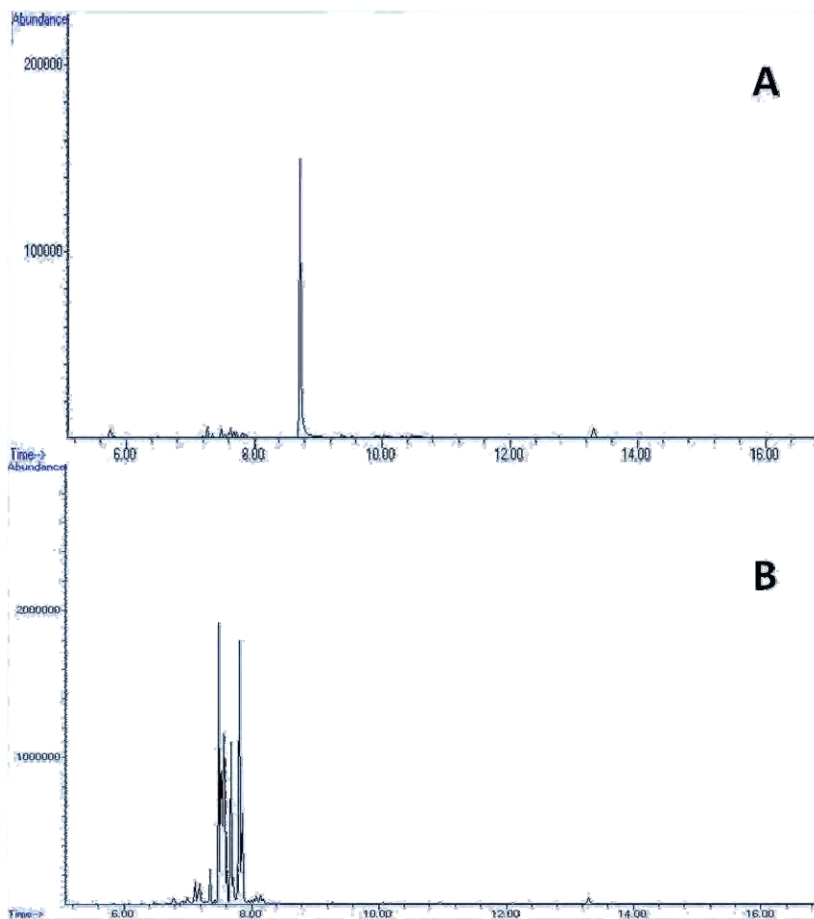


Figura IV.1. Cromatograma obtenido en modo SIM para A) 4-n-Nonilfenol + mezcla de isómeros de nonilfenol; B) Mezcla de isómeros de nonilfenol.

Como puede observarse a partir de la Figura IV.1A, el cromatógrafo detectó los dos compuestos sin que exista interferencia alguna entre ellos. La respuesta obtenida en el detector como abundancia de iones se graficó en función de la concentración del microcontaminante puesta al inicio en cada muestra y se determinó la regresión lineal de cada relación (Figura IV.2).

La linealidad de las curvas de referencia fue aceptable, presentando coeficientes de correlación (r^2) de 0.97 y 0.99 para 4-n-Nonilfenol y tNP, respectivamente. En la Tabla IV.2 se presenta la linealidad de la metodología seguida para las muestras acuosas. El coeficiente de variación fue del 9.7% para el 4-n-Nonilfenol y del 11.73% para la mezcla técnica de nonilfenol, por lo que no hay una pérdida significativa de los compuestos durante el procedimiento de extracción en fase sólida. Se determinó la desviación estándar y el coeficiente de variación (C.V.) de las mediciones de cada curva de referencia, el cual fue menor al 10% en todos los casos. De igual manera, se realizó un análisis de varianza

(ANOVA) que mostró que no había diferencias significativas ($\alpha=0.05$) entre los triplicados de las curvas realizadas.

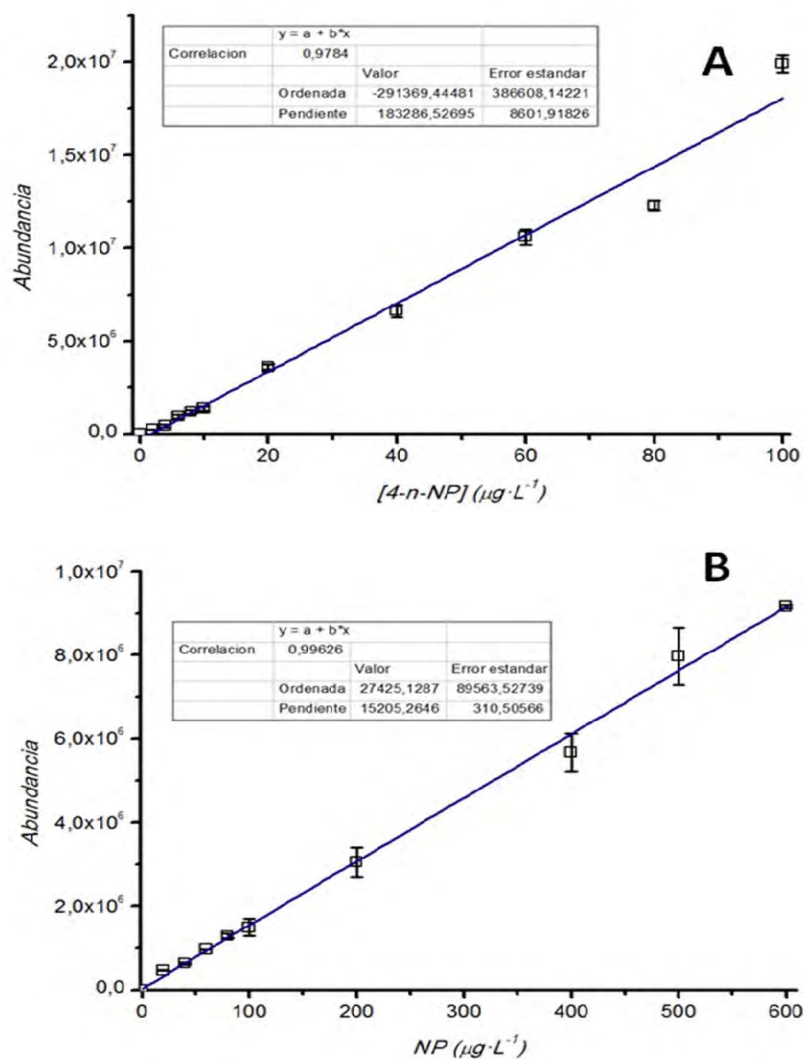


Figura IV.2. Curvas de referencia de A) 4-n-Nonilfenol y B) mezcla de isómeros de nonilfenol, en fase líquida.

Una vez que se observó que las curvas de calibración eran confiables, se procedió a calcular el límite de detección y de cuantificación para ambos compuestos. Primero se calculó la desviación estándar de los residuales del ajuste lineal de acuerdo a la Ecuación III.1. En el Anexo VIII.1 se presenta la hoja de cálculo de esta determinación. En la Tabla IV.2. Parámetros calculados para la determinación de 4-n-NP y tNP en líquido se presentan los valores del límite de detección y de cuantificación a partir de las ecuaciones III.2 y III.3. También se presentan los valores obtenidos para la recuperación y reproducibilidad de la

metodología. Puede observarse que los valores obtenidos a partir del modelo de aproximación por propagación de errores son mayores comparado con los obtenidos a partir de la ecuación proporcionada por la IUPAC. Los límites de detección y cuantificación obtenidos son comparables con los reportados en literatura. El límite de detección se sitúa entre $0.025 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ y $30 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$, y el límite de cuantificación se encuentra entre $20 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ y $110 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ (Ballesteros et al., 2006; Gibson et al., 2007; Gatidou et al., 2007).

Tabla IV.2. Parámetros calculados para la determinación de 4-n-NP y tNP en líquido

Parámetro	4-n-NP	Mezcla de isómeros
Límite de detección, IUPAC	$0.025 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$	$0.762 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$
Límite de detección, propagación de errores	$1.752 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$4.238 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
Límite de cuantificación, IUPAC	$0.076 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$	$2.31 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$
Límite de cuantificación, propagación de errores	$5.310 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$12.843 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
Intervalo de trabajo	$0 - 100 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$0 - 600 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
Intervalo lineal	$0 - 60 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$0 - 400 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
Recuperación	>90%	>90%
Reproducibilidad (CV)	<9.7%	<11.73%
Repetibilidad (CV)	<9.3%	<9.8%

La eficiencia de extracción de los compuestos se calculó a través de la comparación de las relaciones de área entre los compuestos eluidos, después del procedimiento de EFS, y de los estándares sin extraer. Las recuperaciones se obtuvieron a partir de 12 muestras de 300 mL fortificadas con los estándares a tres niveles de concentración, 0.5, 20 y $50 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Las recuperaciones promedio variaron del 90 al 102% para la fortificación más baja y del 93 al 105% para las fortificaciones de 20 y $50 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. De igual manera, los coeficientes de variación fueron menores que el 13% para la fortificación menor y menores que el 11% para las fortificaciones más altas. Esto nos indica que las recuperaciones obtenidas son altas y confiables, de tal manera que la metodología de extracción en fase sólida permite limpiar de impurezas y retener los compuestos de interés, generando elevadas y reproducibles recuperaciones para el 4-n-nonilfenol y sus isómeros.

IV.1.2. Extracción de 4-n-Nonilfenol y nonilfenoles a partir de lodo seco.

El nonilfenol es un compuesto con un coeficiente de partición de 4.48 (Tabla I.1), lo que permite que migre hacia las matrices orgánicas en un sistema, como son los suelos, los sedimento de ríos y los lodos activados en los sistemas de tratamiento. Por lo que se han desarrollado diversos métodos de extracción que incluyen la extracción por líquidos presurizados, la extracción por Soxhlet, la extracción asistida con microondas y la extracción empleando sonicación. En este estudio se desarrollaron metodologías con los dos últimos tipos de extracciones citadas.

Diez muestras de lodo se expusieron a una concentración de 4-n-nonilfenol y mezcla de isómeros de nonilfenol de $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y $400 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente, durante 3 horas. Posteriormente, se realizó la extracción del microcontaminante de acuerdo a los procedimientos descritos en el apartado III.2.4. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla IV.3.

Tabla IV.3. Porcentajes de recuperación de 4-n-NP y tNP en lodo.

Metodología	4-n-Nonilfenol		Mezcla de nonilfenoles	
	% Recuperación	C.V.	% Recuperación	C.V.
Microondas	76.76	6.98	93.52	5.68
Ultrasonido 30 min	80.51	8.73	79.09	8.70
Ultrasonido 20 min	71.52	20.46	38.22	22.96

Como puede observarse, el procedimiento de extracción empleando ultrasonido por 20 minutos presenta los menores porcentajes de recuperación, así como coeficientes de variación superiores al 20%, lo que muestra que esta metodología no es adecuada para la cuantificación de los compuestos de interés adsorbidos en la matriz orgánica. Los mejores porcentajes de recuperación se obtuvieron con la extracción empleando microondas y la extracción con 30 minutos de ultrasonido, mostrando además coeficientes de variación menores que el 10%. Por lo tanto, los análisis estadísticos subsiguientes se realizaron con estas dos metodologías a fin de determinar si existía una diferencia significativa en cuanto a porcentajes de recuperación y reproducibilidad entre ellas.

Para determinar si existía una diferencia significativa ($\alpha=0.05$) en el porcentaje de recuperación se procedió a realizar una prueba *t* para dos muestras. El análisis demostró

que no existe diferencia significativa en el porcentaje de recuperación de 4-n-Nonilfenol empleando la metodología de extracción por microondas o por ultrasonido. Sin embargo, ese mismo análisis mostró, con un nivel de confianza de 95%, que las metodologías muestran una diferencia en el porcentaje de recuperación de la mezcla de nonilfenoles.

Otra manera de determinar si existe diferencia entre dos métodos de análisis, consiste en determinar el límite de repetibilidad, el cual se calcula a partir de la desviación estándar de la repetibilidad (Ecuación IV.1). Los resultados se muestran en la Tabla IV.4.

$$r = 2.8 S_r \quad \text{Ecuación IV.1}$$

Donde, r indica el valor del límite de repetibilidad; S_r es la desviación estándar de las repeticiones.

Tabla IV.4. Límites de repetibilidad

Metodología	4-n-nonilfenol	Mezcla de nonilfenoles
Microondas	0.09919	1.17998
Ultrasonido 30 minutos	0.13008	1.52825

El análisis de varianza de los límites de repetibilidad mostró que no existe diferencia significativa ($\alpha=0.05$) entre ambos métodos de análisis al cuantificar la concentración de 4-n-nonilfenol y de la mezcla de nonilfenoles. Basados en estos resultados, se decidió emplear la metodología de extracción con ultrasonido para la determinación de los microcontaminantes adsorbidos en la matriz sólida.

IV.1.3. Curva de referencia de 4-n-nonilfenol y mezcla de nonilfenoles en matriz sólida.

Se construyó una curva de referencia de 5 puntos por triplicado en un rango de concentraciones de 10 a 150 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para el 4-n-nonilfenol y de 50 a 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para la mezcla de nonilfenoles empleando el método de extracción por ultrasonido descrito en el apartado III.2.4. La respuesta obtenida en el detector como abundancia de iones se graficó en función de la concentración específica del microcontaminante adsorbido y se determinó la regresión lineal de cada relación (Figura IV.3).

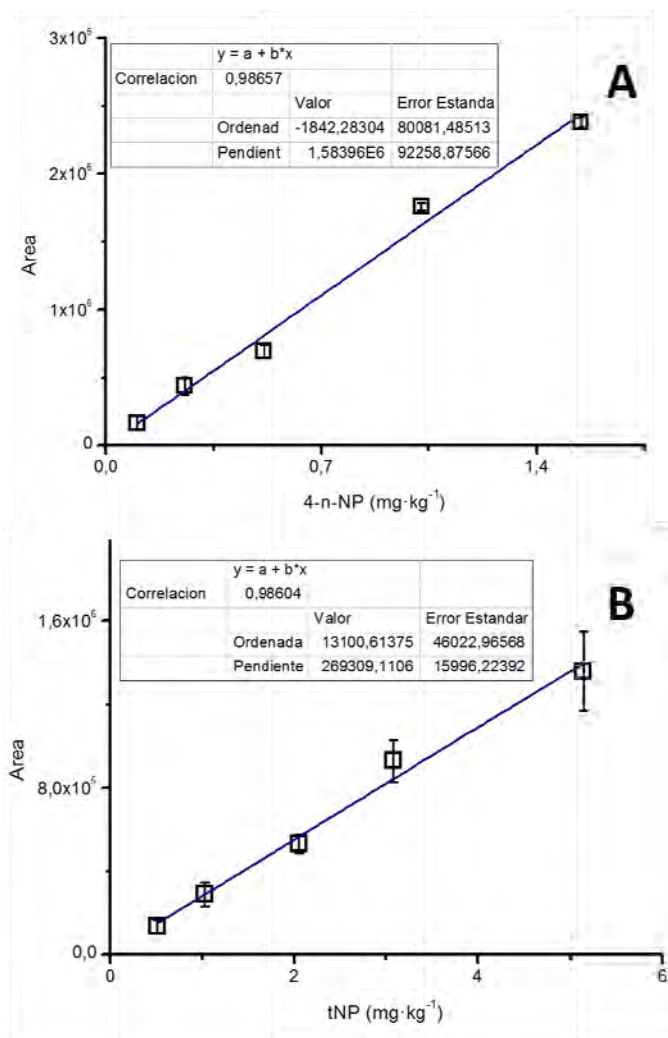


Figura IV.3. Curvas de referencia de A) 4-n-nonilfenol, y B) mezcla de nonilfenoles en matriz sólida.

Como en el caso de las muestras acuosas, se determinó la desviación estándar y el coeficiente de variación (C.V.) de las mediciones de cada curva de referencia, el cual fue menor al 10% en todos los casos. De igual manera, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) que mostró que no había diferencias significativas ($\alpha=0.05$) entre los triplicados de las curvas realizadas. Los límites de detección y de cuantificación se calcularon a partir de la curva de calibración empleando la desviación estándar de los residuales del ajuste lineal para estimar la desviación estándar del blanco (Ecuación III.1). Las recuperaciones se obtuvieron a partir de 15 muestras de lodo fortificadas con tres niveles de concentración, 20, 50 y 75 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Las recuperaciones promedio variaron del 60 al 93% para la fortificación más baja y del 78 al 115% para las fortificaciones de 50 y 75 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. De igual manera, los coeficientes de variación fueron menores que el 20% para la fortificación menor y menores

que el 17% para las fortificaciones más altas. Esto nos indica que las recuperaciones obtenidas son altas y confiables, de tal manera que la metodología de extracción por ultrasonido seguido del proceso de extracción en fase sólida permite limpiar de impurezas y retener los compuestos de interés, generando elevadas y reproducibles recuperaciones para el 4-n-nonilfenol y sus isómeros. Los resultados se muestran en la Tabla IV.5.

Tabla IV.5. Parámetros calculados para la determinación de 4-n-NP y mezcla de nonilfenoles

Parámetro	4-n-nonilfenol	Mezcla de nonilfenol
Límite de detección, IUPAC	$5.10 \times 10^{-8} \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	$8.23 \times 10^{-7} \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$
	$0.0005 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$	$9.61 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$
Límite de detección, propagación de errores	$0.032 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	$0.104 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$
	$3.09 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$9.89 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
Límite de cuantificación, IUPAC	$1.55 \times 10^{-7} \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	$2.49 \times 10^{-6} \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$
	$1.47 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$	$29.1 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$
Límite de cuantificación, propagación de errores	$0.096 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	$0.316 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$
	$9.36 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$29.96 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
Repetibilidad (CV)	<12.7%	<14.26%
Reproducibilidad (CV)	<18.43%	<19.32%
Recuperación	76-84%	78-87%

En este caso, los valores de límite de detección reportados en la literatura varían entre $0.04 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ y $2.86 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. El límite de cuantificación se sitúa entre $0.13 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ y $7.72 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (Fountoulakis et al. 2005; Aparicio et al., 2007; Gatidou et al., 2007).

IV.2. Biodegradación de isómeros de nonilfenol con tres consorcios bacterianos

IV.2.1. Remoción de isómeros de nonilfenol

La evolución en la fase líquida de la mezcla técnica de nonilfenol con respecto al tiempo para cada inóculo se muestra en la Figura IV.4. Se puede observar que hay una

rápida remoción de la mezcla en las primeras 100 horas del ensayo, disminuyendo dicha tasa de remoción después de ese tiempo. Al término de la prueba se obtuvieron porcentajes de remoción de $79.5 \pm 0.6\%$, $68 \pm 1.3\%$ y $61.2 \pm 0.7\%$ para el consorcio nitrificante, las bacterias aclimatadas a la degradación de 4-Clorofenol (4-CF) y lodo activado, respectivamente. Aproximadamente, el 30% de la cantidad inicial de tNP permanece en el lodo activado y el consorcio degradador de 4-CF después de 250 h.

La constante de primer orden ha sido empleada para explicar la biodegradación de nonilfenol bajo condiciones anaerobias y en las pruebas de respirometría OECD (Chang et al., 2005a, 2005b, 2007, 2008; Staples et al., 1999; Stasinakis et al., 2008b). Así pues, los datos obtenidos en este estudio se analizaron para determinar si era posible ajustarlos a un modelo cinético de primer orden (Tabla IV.7). Las vidas medias calculadas fueron de 3.6, 6.0 y 5.9 días para el lodo nitrificante, lodo adaptado a 4-CF y lodo activado, respectivamente. La mayor tasa de remoción se observó con el lodo nitrificante (0.192 d^{-1}), degradando casi 40% más rápido que los otros dos inóculos evaluados

Resultados similares se han obtenido cuando la degradación del nonilfenol se ha estudiado a mayores concentraciones iniciales (Stasinakis et al., 2008; De Weert et al., 2010). Stasinakis et al., (2008b), evaluaron la biodegradabilidad de 30 mg NP/L a través de la prueba OECD 301F, inhibiendo la actividad nitrificante, y observaron que después de 28 días de incubación, 65% del nonilfenol inicial ($30 \text{ mg NP}\cdot\text{L}^{-1}$) había sido biodegradado por acción de las bacterias heterótrofas con una constante de reacción de primer orden de 0.16 d^{-1} . También se ha evaluado la degradación del nonilfenol con enriquecimientos de bacterias obtenidas a partir de sedimentos de ríos contaminados con este tipo de compuestos, reportándose tasas de remoción de 0.25 a $0.4 \mu\text{M}\cdot\text{d}^{-1}$ y vidas medias de 4 a 5 días (De Weert et al., 2010). En este caso, los estudios de biología molecular revelaron que en el enriquecimiento había bacterias pertenecientes a los géneros *Nitrosomonas*, *Alcaligenes*, *Comamonadaceae* y *Xanthomonas*. Kim et al., (2007) evaluaron la remoción del nonilfenol con un enriquecimiento de bacterias nitrificantes obteniendo tasa de remoción de $4.1 \mu\text{M}\cdot\text{d}^{-1}$ o $0.20 \mu\text{mol}\cdot\text{d}^{-1}$. En todos estos estudios, no hay una diferenciación entre los procesos de adsorción y biodegradación que normalmente ocurren durante la remoción del nonilfenol.

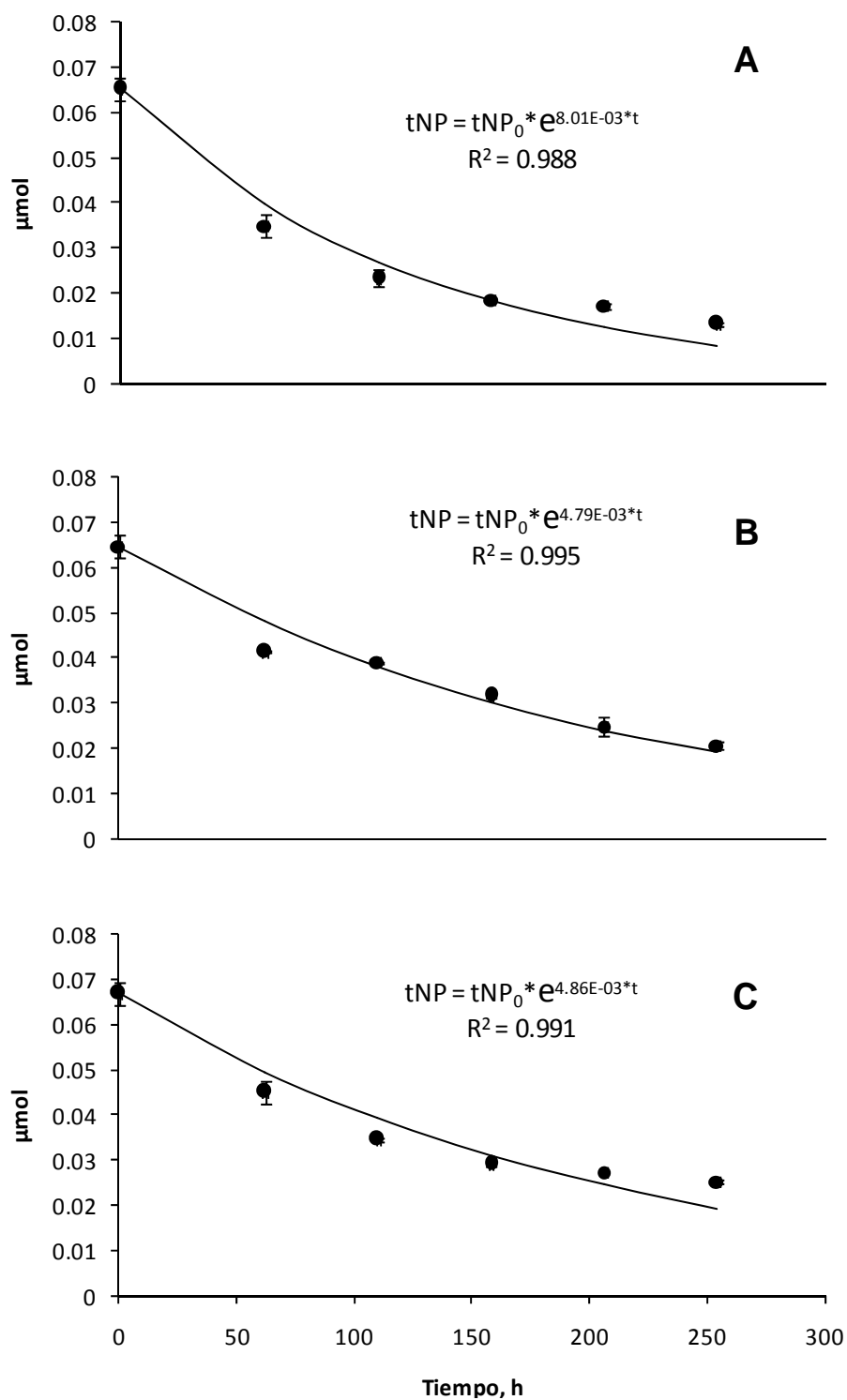


Figura IV.4. Evolución de la mezcla técnica de nonilfenol en función del tiempo para la fase líquida. A) Lodo nitrificante, B) Biomasa adaptada a 4-Clorofenol, y C) Lodo activado. Los círculos representan los datos experimentales y la línea el modelo ajustado.

IV.2.2. Coefficiente de adsorción de la mezcla de isómeros

La evaluación de la cantidad de isómeros de nonilfenol en el lodo mostró que del 31% al 44% de la tNP inicial se adsorbía y además era una función del tiempo de reacción. El mayor porcentaje de adsorción ($44.0\% \pm 1.3\%$) se observó en el lodo activado. Considerando que el coeficiente de partición octanol-agua ($\log K_{OW}$) del nonilfenol es de 4.48 (Ahel y Giger, 1993), puede esperarse que la capacidad de la mezcla de isómeros de nonilfenol para adsorberse en la biomasa sea alta.

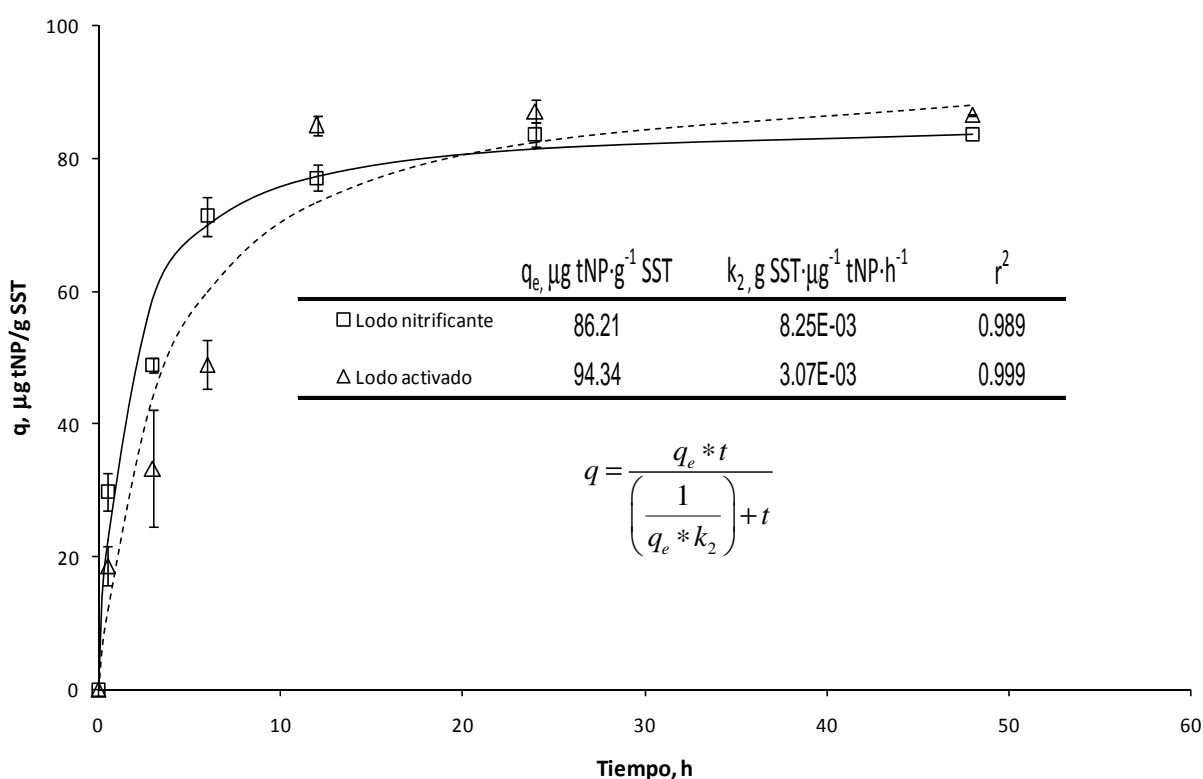


Figura IV.5. Evolución de la cantidad adsorbida de tNP sobre lodo activado y lodo nitrificante. Las líneas punteada y discontinua representan el ajuste a un modelo de pseudo-segundo orden para lodo nitrificante y activado, respectivamente.

La evolución del proceso de adsorción se evaluó para dos biomasas, el lodo nitrificante enriquecido a una relación C/N=5 y el lodo activado usado en las pruebas de biodegradabilidad, ajustando los datos obtenidos a un modelo de pseudo-segundo orden. Los datos obtenidos de la cuantificación en la fase líquida y en la fase sólida confirmaron que no hubo consumo de los isómeros durante el experimento (Anexo VIII.2) Considerando que la concentración inicial de isómeros de nonilfenol fue de $100 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{SST}$, se observó

que la remoción de dichos compuestos debido a la adsorción fue superior al 80%. Este alto porcentaje de adsorción del nonilfenol y sus isómeros ya ha sido observado en estudios previos. Langford et al. (2005) evaluaron la adsorción de $0.3 \text{ mg NP}\cdot\text{L}^{-1}$ sobre lodo activado que presentaba un tiempo de retención de sólidos equivalente a 5 días. Los investigadores observaron que el nonilfenol puede alcanzar porcentajes de adsorción cercanos al 70% después de 10 minutos de exposición. Adicionalmente, este valor puede incrementarse hasta un 80% con un tiempo de exposición de 7 horas. Resultados similares fueron reportados por Hung et al. (2004), quienes observaron que después de 12 horas de exposición se alcanzó el equilibrio de adsorción sobre lodo activado. La concentración inicial manejada en ese estudio fue de $4 \text{ }\mu\text{g NP}\cdot\text{L}^{-1}$. Este equilibrio de adsorción tuvo un valor superior al 90% del valor máximo de q_e , el cual se calcula bajo el supuesto de que todo el compuesto evaluado presente en la fase acuosa se adsorbe sobre la matriz orgánica. En estudios de adsorción de nonilfenol sobre sedimentos se ha reportado que después de una hora de exposición al compuesto, la concentración inicial de nonilfenol disminuye hasta un 83%, y después de 24 horas, la cantidad adsorbida puede ubicarse entre 82.3% y 90.7% (Hou et al., 2006).

Como etapa inicial, se evaluó la cantidad de tNP adsorbida por gramo de sólidos suspendidos totales –capacidad de adsorción (q , en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)- en función del tiempo (Figura IV.5). La tasa de adsorción fue alta en las primeras 10 horas del experimento y gradualmente se redujo hasta alcanzar el equilibrio. Se observó un buen ajuste de los datos experimentales con el modelo, obteniéndose coeficientes de correlación de 0.999 y 0.989 para el lodo nitrificante y el lodo activado, respectivamente. Se encontró que la capacidad de adsorción en el equilibrio, q_e , para el lodo activado fue 8.6% mayor que el valor observado para el lodo nitrificante. Sin embargo, la tasa inicial de adsorción, $k_2\cdot q_e^2$, fue 2.2 veces mayor para la biomasa nitrificante ($61.35 \text{ }\mu\text{g tNP}\cdot\text{g}^{-1} \text{ SST}\cdot\text{h}^{-1}$) que para el lodo activado ($27.32 \text{ }\mu\text{g tNP}\cdot\text{g}^{-1} \text{ SST}\cdot\text{h}^{-1}$). La tasa de adsorción, k_2 , fue casi tres veces más alta para las bacterias nitrificantes ($8.25\times 10^{-3} \text{ g SST}\cdot\mu\text{g}^{-1} \text{ tNP}\cdot\text{h}^{-1}$) que para el lodo activado ($3.07\times 10^{-3} \text{ g SST}\cdot\mu\text{g}^{-1} \text{ tNP}\cdot\text{h}^{-1}$). Se observó que después de 24 se alcanzó el equilibrio de adsorción, indicado por los valores constantes de q con respecto al tiempo. Estos resultados indican que la mezcla de isómeros de nonilfenol se adsorbió más rápidamente sobre la biomasa nitrificante que sobre el lodo activado, aunque este último presentó la máxima capacidad de adsorción.

Las isotermas de adsorción a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ se determinaron para el lodo nitrificante y el lodo activado (Figura IV.6A). Se encontró un buen ajuste de los datos con el modelo de adsorción de Freundlich (Ecuación III.14). El valor de k obtenido para el lodo nitrificante ($13.2 \text{ }\mu\text{mol tNP}\cdot\text{g}^{-1} \text{ SST}$) fue mayor que el que presentó el lodo activado ($11.8 \text{ }\mu\text{mol tNP}\cdot\text{g}^{-1}$

SST). Cuando se trabaja con compuestos altamente hidrofóbicos, el mecanismo de adsorción cobra interés durante la remoción de estos compuestos de las aguas residuales. Compuestos con valores del coeficiente de distribución (K_D) menores o iguales que $0.1 \text{ L}\cdot\text{g}^{-1}$ se consideran hidrofílicos. Cuando el valor de K_D es superior a $2 \text{ L}\cdot\text{g}^{-1}$, la adsorción del compuesto sobre las matrices orgánicas es fuerte (Joss et al., 2006). De acuerdo al análisis obtenido a partir de la regresión lineal presentada en la Figura IV.6B, se considera que la pendiente muestra el valor de K_D . El lodo activado presentó el valor más alto del coeficiente de distribución ($6.437 \text{ L}\cdot\text{g}^{-1}$), seguido del consorcio nitrificante ($5.025 \text{ L}\cdot\text{g}^{-1}$), lo cual corrobora los datos obtenidos del análisis cinético.

La determinación de la constante de Freundlich y el coeficiente de distribución indican una alta tendencia de los isómeros de nonilfenol a adsorberse. El proceso de adsorción para los compuestos alteradores endocrinos es un fenómeno complejo que incluye factores como el tamaño de la partícula, el contenido de sustancias exopoliméricas, las propiedades físico-químicas de la superficie de lodo o el tiempo de retención de sólidos (Liao et al., 2001; Lashermes et al., 2010). Estudios recientes han mostrado que el ajuste lineal del coeficiente de distribución describe una mejor correlación en comparación con la aportada por el modelo de Freundlich para contaminantes no polares como es el caso del nonilfenol (Barret et al., 2010; Di Gioglia et al., 2009). De acuerdo a los datos presentados en la, los valores determinados para las constantes de Freundlich y para el coeficiente de distribución, en este trabajo son similares a los reportados en la literatura (Tabla IV.6).

Tabla IV.6. Constantes de Freundlich (k_F y n) y coeficiente de distribución (K_D) del nonilfenol en biomasa y suelos.

	Modelo de Freundlich			Modelo lineal		Referencia
	k_F	n	r^2	$K_D, \text{L}\cdot\text{g}^{-1}$	r^2	
Lodo activado	5.1	0.95	0.962	6.0	0.875	Stasinkis et al., 2010
Suelo				2.57 – 33.6	0.949	Hou et al., 2006
Lodo activado	7.39	0.83	0.959	5.84	0.984	Hung et al., 2004
Lodo nitrificante	13.2	1.52	0.975	5.025	0.943	Este trabajo
Lodo activado	11.8	1.33	0.963	6.437	0.950	Este trabajo

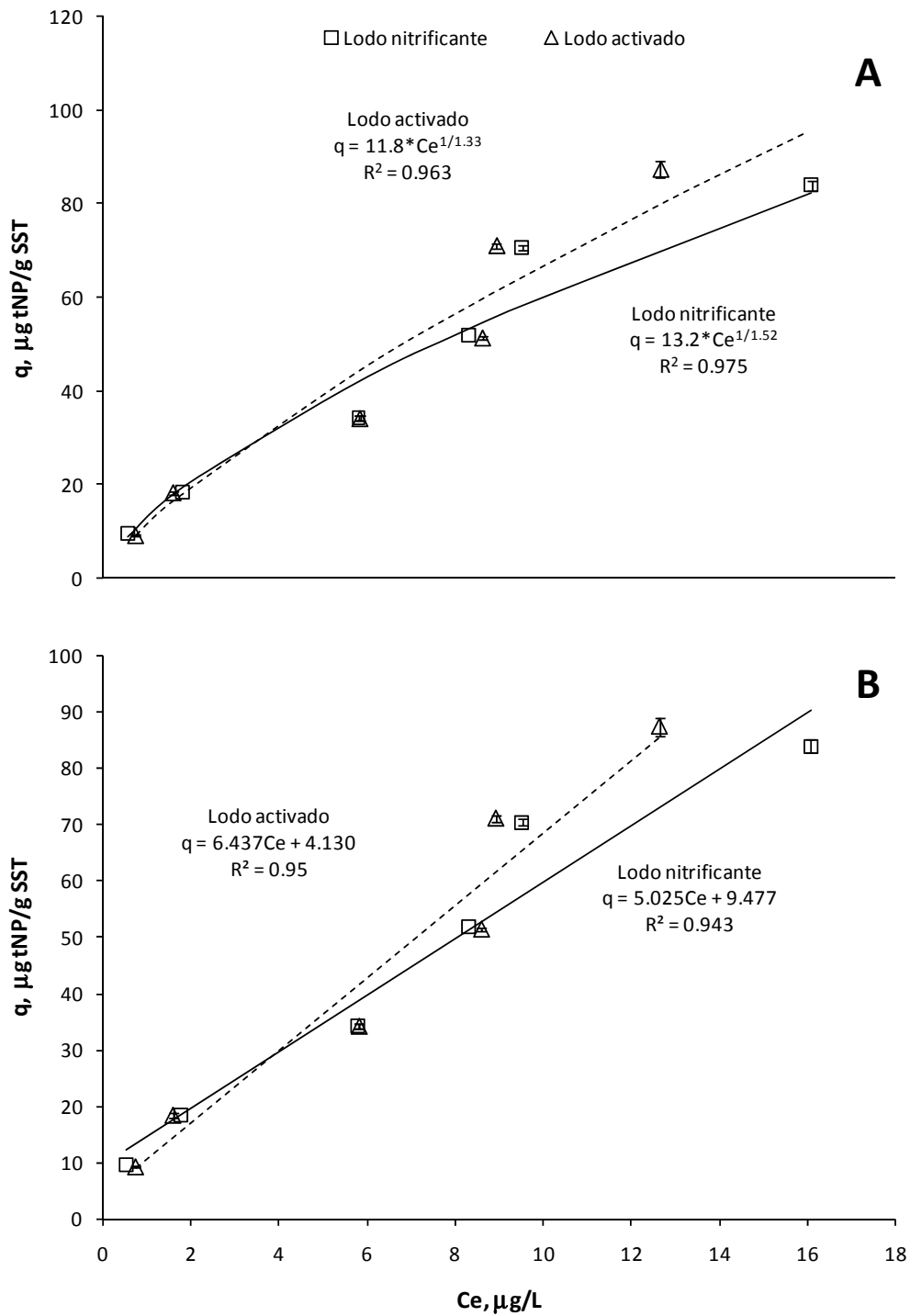


Figura IV.6. Isothermas de adsorción. A) Modelo de Freundlich; B) Coeficiente de adsorción. Las líneas punteada y discontinua representan el ajuste a un modelo de pseudo-segundo orden para lodo nitrificante y activado, respectivamente.

Dadas sus características fisicoquímicas, el nonilfenol se adsorbe en las matrices orgánicas, como es el lodo. Sin embargo, esta capacidad de adsorción depende de parámetros como el tiempo de retención de sólidos, la producción de sustancias exopoliméricas, el contenido de carbono orgánico, entre otros (Liao et al., 2001; Lashermes et al., 2010). Cirja et al. (2006) y Stasinakis et al. (2010) han reportado que el porcentaje de adsorción del 4-n-nonilfenol en lodo puede situarse entre 21 y 40 %, siendo este mecanismo el primer paso para su biodegradación. Este fenómeno también se ha observado en pruebas en lote con sedimentos y suelo. En ambos casos, los isómeros de nonilfenol presentan una rápida adsorción sobre las matrices sólidas después de su aplicación (Hou et al., 2006; Lalah et al., 2003).

IV.2.3. Biodegradación

La remoción de microcontaminantes se lleva a cabo por tres mecanismos: volatilización, biodegradación y adsorción (Clara et al., 2005a). Siendo este último de gran importancia ya que interviene en la biodisponibilidad de los compuestos hidrofóbicos. En el caso del nonilfenol, dado su valor de la constante de Henry ($8.39 \times 10^{-1} \text{ Pa}\cdot\text{m}^3\cdot\text{mol}^{-1}$), la volatilización no es un proceso de remoción significativo. Se ha reportado que la volatilización como proceso de remoción se vuelve significativa cuando la constante de Henry se encuentra entre 10^{-2} y 10^{-3} (Stenstrom et al., 1989) La biodisponibilidad se define como la fracción de un compuesto que puede ser consumida o transformada por los microorganismos en la fase líquida (Semple et al., 2003). La biodegradación de la mezcla de isómeros de nonilfenol es un proceso dinámico en el que cierta cantidad se adsorbe, mientras que la cantidad restante, en la fase líquida, se degrada. Dado que debe existir un equilibrio entre ambas fases, sólida y líquida, conforme el tiempo transcurra, una parte de tNP adsorbido, se desorberá y posteriormente, se degradará. Este proceso es más lento que la biodegradación, lo que puede explicar porqué la cantidad adsorbida de isómeros de NP a las 250 h fue menor que la observada a las 62 h, en el caso del lodo nitrificante (Figura IV.7). De igual manera, este proceso puede justificar la 'lenta degradación' que se da en las primeras horas de la prueba (período de adaptación) que se observa en la Figura IV.8.

La Figura IV.7 muestra la cantidad de tNP removida, adsorbida y biodegradada por los tres inóculos probados, considerando dos periodos: 62 y 254 h. El primer periodo representa el tiempo en el que ocurre la adsorción y el segundo periodo indica el final de la prueba. El cálculo de los porcentajes presentados a continuación puede consultarse en el Anexo VIII.3. A las 62 h, la remoción global de la tNP fue de $46.5\% \pm 2.6\%$, $36.0\% \pm 0.8\%$ y $32.4\% \pm 1.5\%$ para las bacterias nitrificantes, el inóculo adaptado a 4-CF y el lodo activado,

respectivamente. Este porcentaje de remoción incrementó a $79.6\% \pm 2.1\%$, $67.9\% \pm 2.6\%$ y $62.2\% \pm 2.9\%$, después de 254 h para los inóculos antes mencionados.

A las 62 h, la adsorción de la mezcla de isómeros representó $46.5\% \pm 2.6\%$ para la biomasa nitrificante, sin embargo, ese porcentaje disminuyó hasta $36.5\% \pm 2.7\%$ a las 254 h. El porcentaje de adsorción no cambió significativamente a las 254 h para la biomasa aclimatada a 4-CF y para el lodo activado. Sin embargo, es posible observar que el incremento en la remoción de la tNP se debió al mecanismo de biodegradación, el cual se evaluó como la diferencia entre las cantidades removidas y adsorbidas de la mezcla de isómeros. En este sentido, el porcentaje de biodegradación incrementó, alcanzando un valor a las 254 h de $43.1\% \pm 2.3\%$, $34.3\% \pm 1.2\%$ y $18.2\% \pm 0.5\%$ para el lodo nitrificante, la biomasa adaptada a 4-CF y el lodo activado, respectivamente. Cabe hacer notar que, aunque la biomasa nitrificante presentó una alta tasa inicial de adsorción, la capacidad de biodegradación de este consorcio fue mayor que la de las otras biombras evaluadas. Las tasas de remoción, calculadas a partir de los datos en la fase líquida, entre el lodo degradador de 4-Clorofenol y el lodo activado son similares, observándose un mayor porcentaje de adsorción en el lodo activado. Este resultado indica que para el lodo activado, la adsorción es el principal mecanismo de remoción.

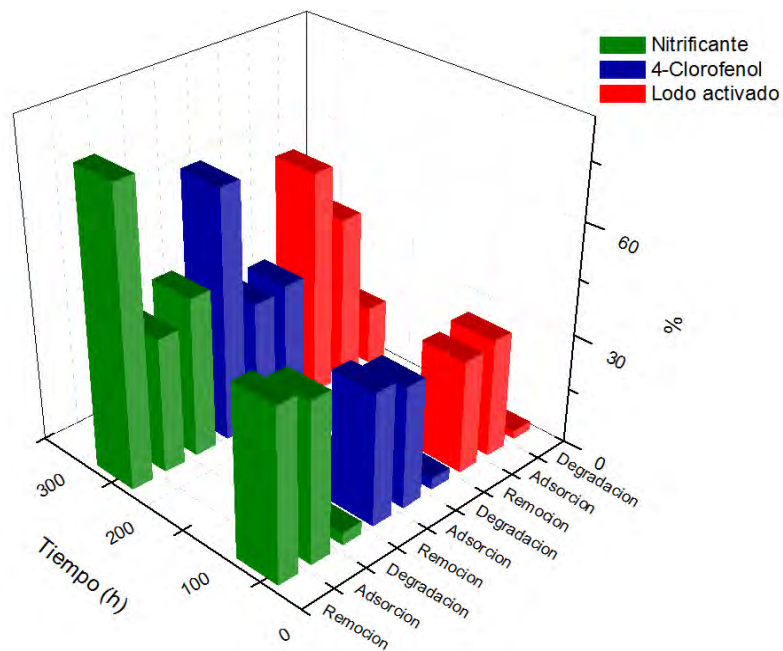


Figura IV.7. Promedio de tNP removido, adsorbido y degradado durante la prueba de biodegradabilidad a las 62 h y 254 h.

Se ha reportado que los procesos de adsorción-desorción pueden influir en la biodisponibilidad de un compuesto hidrofóbico, lo cual puede limitar la tasa de biodegradación (Delgadillo-Mirquez et al., 2011). Un microcontaminante adsorbido no está disponible para su degradación microbiana porque este proceso ocurre, principalmente, en el seno de la fase acuosa (Byrns, 2001; Artola-Garicano et al., 2003). La biodegradación del nonilfenol es un proceso dinámico en la que cierta cantidad de la tNP se adsorbe, mientras que el resto, localizado en la fase líquida, se degrada. Parte del nonilfenol adsorbido se desorberá y biodegradará, sin embargo, este paso es más lento que la biodegradación que se da en la fase acuosa. Este mecanismo puede explicar por qué la cantidad adsorbida de los isómeros de nonilfenol fue menor a 250 h que la cantidad determinada a las 62 h para el lodo nitrificante.

La Figura IV.8 muestra la evolución de la cantidad total de la tNP en función del tiempo, es decir, se incluyen los datos provenientes de la adsorción en la fase sólida a lo largo de la prueba. Es claro que la tasa de reacción depende significativamente de la adsorción inicial. Para evaluar sólo el mecanismo de degradación, se realizó un balance de masa considerando la cantidad de tNP presente en la fase líquida y sólida durante la prueba a fin de determinar la cantidad consumida de tNP en cada muestreo (Anexo VIII.3). Es posible observar dos fases en cada gráfico, una degradación lenta y una rápida. La etapa lenta puede atribuirse a una fase de adaptación de 62 h para el lodo nitrificante y de 110 h para el consorcio degradador de 4-Clorofenol y el lodo activado (Langford et al., 2005; Kim et al., 2007; Chang et al., 2004, 2005). Durante la fase de degradación lenta, de 2.1% a 3.3% de la cantidad inicial de tNP se degradó para los cultivos probados.

Los datos obtenidos de la fase de rápida degradación se pueden ajustar a un modelo cinético de orden cero. Los resultados muestran que el lodo nitrificante presentó la mayor pendiente de los tres inóculos evaluados, indicando, de esta manera, un mayor consumo global de tNP así como una mayor tasa de remoción (Tabla IV.7). En literatura se reporta que la posición, longitud y ramificación de la cadena alquílica en el nonilfenol influye sobre su tasa de biotransformación (Corvini et al., 2006). Este resultado podría sugerir que sólo aquellos sistemas de tratamiento en los que las bacterias nitrificantes estén presentes podrían ser capaces de remover y biodegradar los isómeros de nonilfenol.

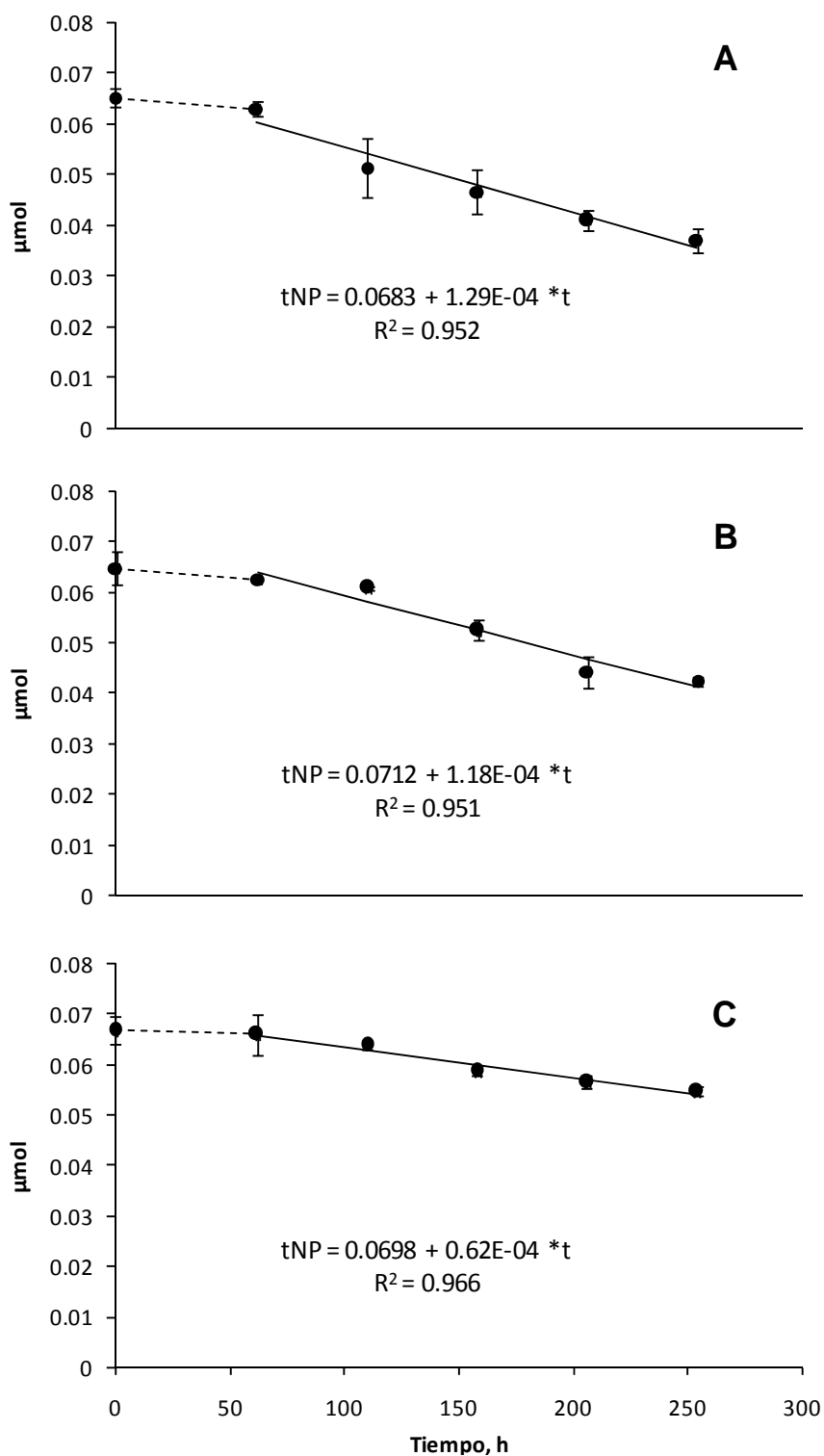


Figura IV.8. Evolución de la mezcla técnica de nonilfenol en función del tiempo considerando las fases líquida y sólida. A) Lodo nitrificante; B) Biomasa adaptada a 4-Clorofenol; C) Lodo activado. Los círculos representan los datos experimentales y la línea, el ajuste del modelo.

Tabla IV.7. Constantes de degradación y porcentajes de degradación.

Inóculo	k_1, d^{-1} fase líquida	$k_0, \mu\text{mol}\cdot d^{-1}$ fase sólida+líquida	tNP biodegradado en 250 h, %	tNP adsorbido, %
Nitrificante	0.192±0.007	3.10×10^{-3}	43	36.5
Degradador de 4-CP	0.115±0.008	2.83×10^{-3}	34.4	33.6
Lodo activado	0.116±0.003	1.49×10^{-3}	18.2	44.0

Las vidas medias calculadas para la biodegradación, empleando los datos mostrados en la Figura IV.8, fueron de 10.9, 12.0 y 22.8 días para el lodo nitrificante, la biomasa adaptada a 4-CF y el lodo activado, respectivamente. Estas vidas medias son casi tres veces menores que las obtenidas con el modelo de primer orden, el cual incluye a los procesos de adsorción y degradación. Es interesante hacer notar que aunque la biomasa aclimatada a 4-CF y el lodo nitrificante presentaron una tasa de degradación similar (k_0 , Tabla IV.7), el porcentaje de biodegradación de la mezcla de isómeros de nonilfenol fue mayor con el lodo nitrificante que con las bacterias adaptadas a la degradación de 4-Clorofenol.

En el caso de las bacterias nitrificantes, se ha estimado que la biodegradación ocurre a través del cometabolismo, el cual se ha reportado en diversos estudios con *Nitrosomonas* (Hyman et al., 1988; Keener y Arp, 1994). Diversos estudios han indicado que las bacterias autotróficas son más sensibles a los surfactantes que las bacterias heterótrofas (Brandt et al., 2001; Stasinakis et al., 2008). Cepas de *Nitrosomonas* y *Nitrospira* presentaron una baja capacidad para remover alquilbencensulfonatos lineales (LAS, por sus siglas en inglés) con concentraciones inhibitorias del 50% (IC_{50}) de la actividad metabólica entre 6 y 38 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Los autores sugieren que para los aislados de *Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus cereus*, concentraciones hasta de 300 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, no afectan ni estimulan su actividad metabólica (Brandt et al., 2001). Además, Dokianakis et al. (2006) evaluaron la actividad metabólica de aislados mixtos de bacterias amonio-oxidantes en presencia de diversos microcontaminantes. En este estudio, el IC_{50} para 4-n-NP, NPEO y LAS se situó en 0.72 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 2.67 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y 2.06 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. Sin embargo, en este estudio se observó que las bacterias nitrificantes fueron más eficientes en la biodegradación de tNP que el lodo activado o la biomasa adaptada a 4-Clorofenol, las cuales mostraron una tasa de degradación y un porcentaje de consumo de tNP menores. Es posible que en este caso, las enzimas requeridas para la completa biotransformación de

los isómeros de nonilfenol no se indujeran en el tiempo de exposición, por lo que se ha contemplado que el periodo de adaptación en los organismos heterótrofos es un mecanismo importante para la remoción de compuestos alteradores endocrinos (Kim et al., 2007; De Gusseme et al., 2009).

IV.3. Biodegradación de isómeros de nonilfenol en un reactor discontinuo de membrana sumergida empleando lodo nitrificante

IV.3.1. Flux crítico y presión transmembrana

Como paso preliminar a la operación del reactor discontinuo de membrana sumergida, se realizaron pruebas hidráulicas con el módulo de membrana. Inicialmente se evaluó el comportamiento de la presión transmembrana (PTM) empleando agua sin material colmatante en función del tiempo, haciendo variaciones del flux. En la Figura IV.9 se observa que existe una correlación lineal entre el flux y la presión transmembrana ya que al aumentar el flux de operación, la PTM incrementa su valor. De tal manera que trabajar con flux altos expondrá al módulo de membrana a presiones de trabajo más elevadas. Empleando agua desionizada, se obtuvo un flux máximo de $27.3 \text{ L}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ con una presión de trabajo de 40 kPa.

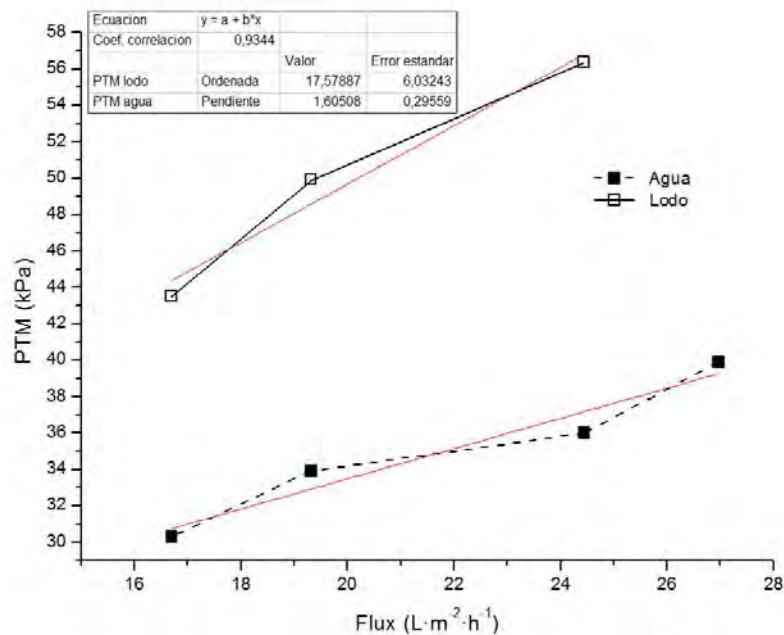


Figura IV.9. Perfil de la presión transmembrana a cada flux probado sin limpieza química previa de la membrana.

La determinación de las condiciones subcríticas y críticas se realizó de acuerdo a lo descrito en el apartado III.7. Se fijaron incrementos de flux constantes, registrando el valor de la presión transmembrana y el flux a través del tiempo para agua destilada y para una concentración de biomasa de $3.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Los resultados se muestran en la Figura IV.10.

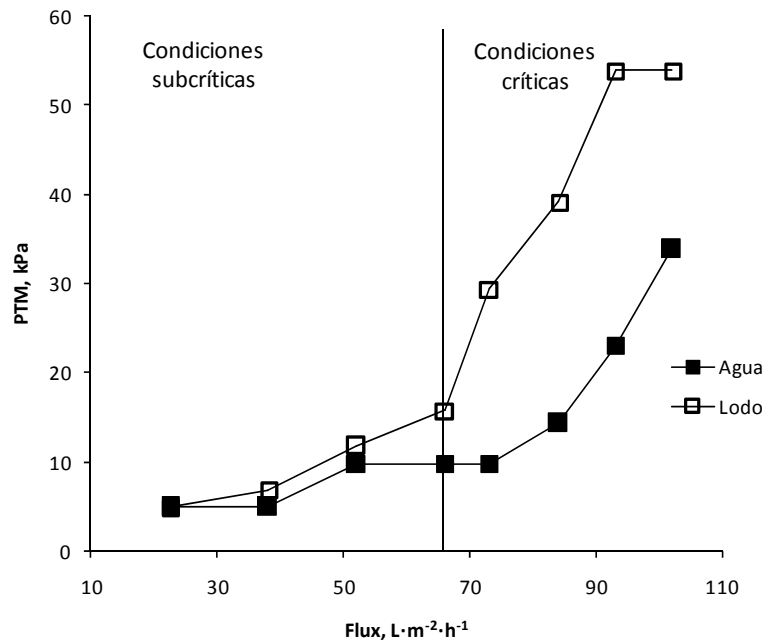


Figura IV.10. Perfil de la presión transmembrana a cada flux probado después de una limpieza química de la membrana.

Cuando el valor del flux de permeado es menor al valor del flux crítico (condiciones subcríticas), no ocurre una acumulación de partículas en la membrana y, si las interacciones fisicoquímicas soluto-membrana son mínimas, la filtración toma lugar en condiciones estables, cercanas a la filtración con agua, sin cambios notables observados en el valor de la permeabilidad en función del tiempo. El valor del flux crítico dependerá de las características de la membrana (tamaño del poro, porosidad, material), los elementos en suspensión (naturaleza, distribución del tamaño de partícula en relación a la distribución del tamaño del poro y concentración) y las condiciones de circulación hidrodinámica y filtración (Ognier et al., 2004). Puede observarse que una vez que se ha pasado el valor de flux crítico, la relación $\Delta\text{PTM}/\Delta J$ incrementa al filtrar agua y lodo. Sin embargo, este incremento es mayor cuando esta filtración se hace en presencia de lodo. Este comportamiento es característico de la filtración cuando los flocos biológicos se depositan sobre la membrana. Cuando se realiza la filtración en presencia de $3.5 \text{ g SSV}\cdot\text{L}^{-1}$, se obtiene un flux

crítico de $66 \text{ L}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ después del cual, la membrana opera bajo condiciones supracríticas de filtración.

Una vez establecido el valor del flux crítico, se realizaron pruebas para seleccionar las condiciones bajo las cuales operaría la bomba de succión. En este caso, se hicieron pruebas de filtración con una duración de 45 minutos, variando la succión de la bomba de una prueba a otra, y monitoreando los cambios en el flux y en la presión transmembrana. En la Figura IV.11 se presenta la media del flux y la PTM obtenida en cada una de las pruebas realizadas. De los resultados obtenidos, se seleccionó operar con las condiciones de la prueba 3 (flux = $19.32 \pm 2.11 \text{ L}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ y PTM = $44.03 \pm 1.8 \text{ kPa}$), ya que como puede observarse la PTM se mantiene por debajo y no tan cercana a su valor límite de operación.

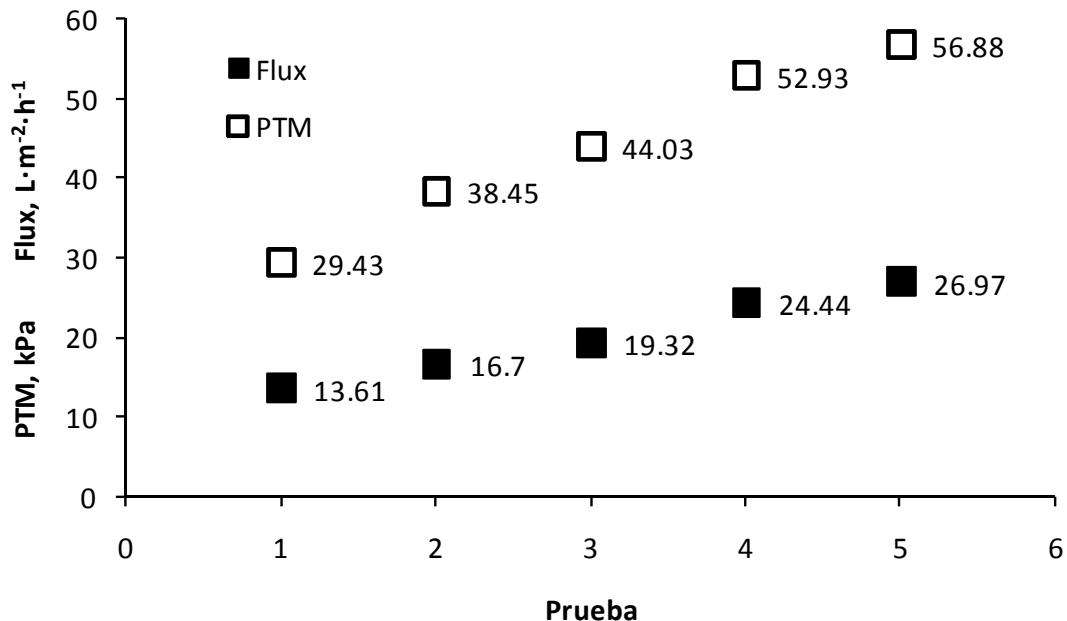


Figura IV.11. PTM y flux en las pruebas de filtración.

La colmatación se puede definir como la deposición indeseable y acumulación de organismos, coloides, solutos y restos de células dentro o sobre la membrana (Meng et al., 2009). Durante la operación del reactor discontinuo con membrana sumergida, se evaluaron tres combinaciones diferentes de tiempos de succión y retrolavados:

- A: 36 minutos de succión y 1 minuto de retrolavado
- B: 27 minutos de succión y 45 segundos de retrolavado
- C: 18 minutos de succión y 45 segundos de retrolavado

Para cada caso se calculó la permeabilidad, la cual se define como la tasa específica de flujo a través de un área específica de la membrana a una presión particular y se calcula como el cociente del flux entre la presión transmembrana. Se ha reportado que cuando se trabaja con altas concentraciones de lodo, la demanda de energía así como el riesgo de la colmatación de la membrana se incrementa debido al impacto pernicioso sobre la eficiencia de la aereación de estas concentraciones de lodo. Mayores fluxes requieren limpiezas más frecuentes y/o aereaciones de la membrana más vigorosas para mantener la permeabilidad de la membrana. En ambos casos, el resultado es un incremento en el costo. Por el contrario, menores TRS no sólo incrementan la producción de lodo sino que también disminuyen la permeabilidad de la membrana (Judd, 2008)

Estudios han mostrado que los sólidos suspendidos pueden ser un factor importante que afecta a la permeabilidad de la membrana porque los sólidos suspendidos, principalmente los flóculos microbianos, en un biorreactor de membrana pueden formar una capa dinámica sobre la superficie de la membrana. Esta capa dinámica proveería pequeñas moléculas con menores oportunidades de interacción con la membrana y por tanto, aliviaría la tasa de colmatación de la membrana. También, la capa dinámica puede ser removida de la membrana a través del flujo tangencial aire-líquido a la superficie de la membrana provista por la aereación en el reactor. Repetidos procesos de formación y remoción de la capa dinámica pueden ralentizar la pérdida de la permeabilidad. Sin embargo, podría valer la pena hacer notar que la aereación en un MBR puede tener algún efecto negativo sobre la permeabilidad de la membrana ya que las partículas solubles pueden adsorberse directamente dentro y bloquear los poros de la membrana si la capa dinámica es removida por el flujo tangencial aire-líquido (Lee et al., 2001)

Se observó que la operación del módulo de membrana con las combinaciones de tiempo 'A' y 'B', llevaba a una rápida colmatación de la membrana (Figura IV.12). Dado que la permeabilidad (K) es una medida indirecta del grado de colmatación de la membrana e indica, físicamente, que hay una compresión de los sólidos depositados en la superficie de la membrana. Por tanto, observar una disminución en el valor de la permeabilidad puede indicar la acumulación de sólidos en la superficie de la membrana, generando que los poros disponibles en la membrana disminuyan. La combinación 'C' de tiempos de succión y retrolavado presentó un desempeño más estable.

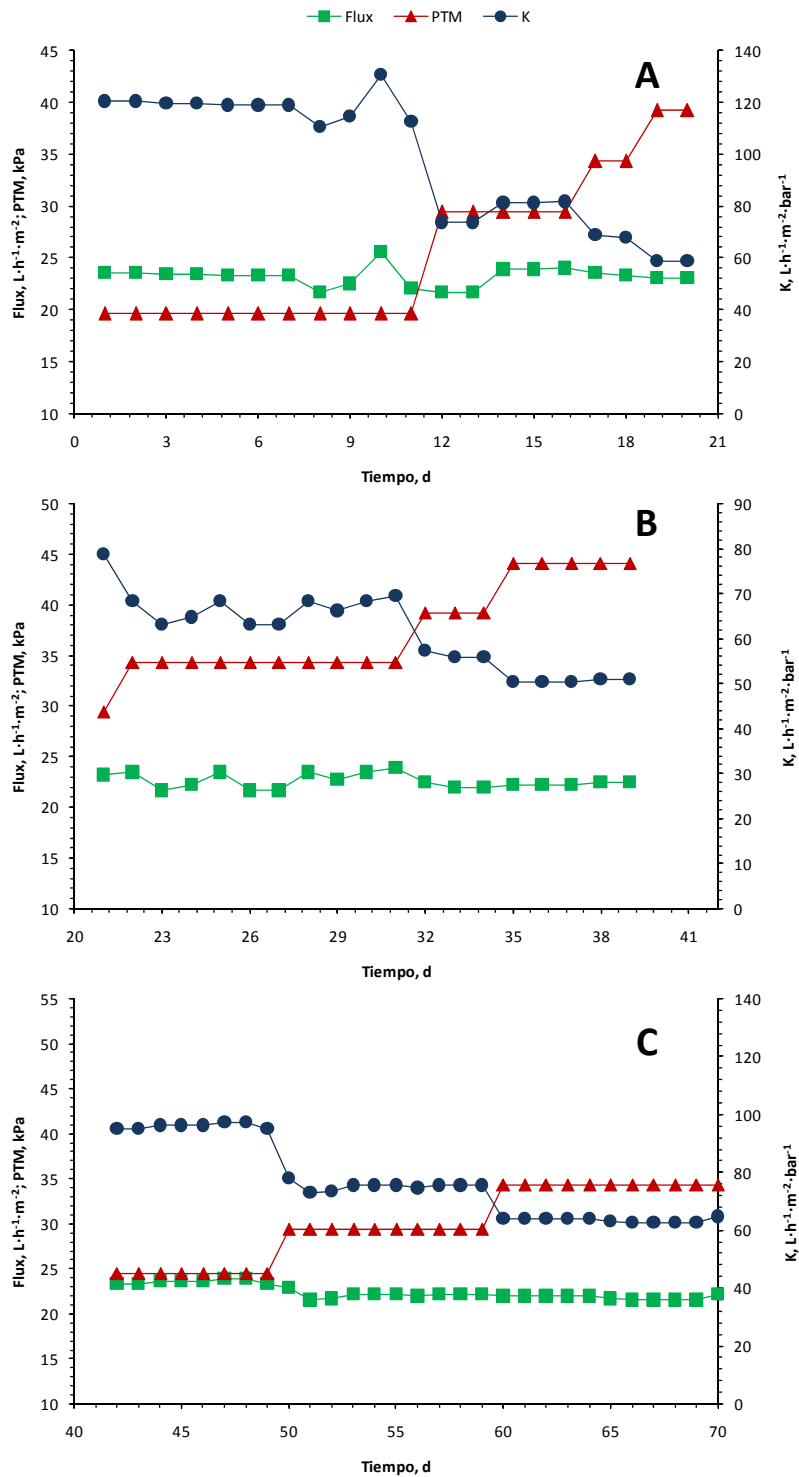


Figura IV.12. Comportamiento del flux, PTM y la permeabilidad en condiciones subcríticas para cada combinación de tiempos de succión y retrolavado. A) 36 minutos succión y 1 min retrolavado; B) 27 minutos succión y 45 segundos retrolavado; C) 18 minutos succión y 45 segundos retrolavado.

IV.3.2. Operación del MSBR

Pruebas abióticas. Cuando se estudia la remoción de compuestos orgánicos altamente hidrófobos, es importante demostrar que la biotransformación ocurre dentro del reactor, ya que las sustancias de interés pueden ser fácilmente adsorbidas en los componentes del sistema (mangueras, válvulas, difusores). Por lo tanto, como prueba preliminar al arranque del reactor, todo el sistema se expuso a una concentración de 500 $\mu\text{g/L}$ de tNP durante 3 ciclos de 48 horas. Al término de cada ciclo las concentraciones medidas en el efluente fueron de $8.5 \pm 0.7 \mu\text{g/L}$, $339 \pm 29 \mu\text{g/L}$ y $408 \pm 34 \mu\text{g/L}$, lo que representa 98%, 33% y 18% de nonilfenol adsorbido en el sistema. Después de 120 h de exposición, la concentración medida de isómeros de nonilfenol varió sólo 1%, lo que indicó que se había alcanzado un equilibrio de adsorción.

Arranque. El lodo nitrificante empleado en estos experimentos se enriqueció a una relación C/N igual que 5 como se describe en el apartado III.3. En la Figura IV.13 se observa el enriquecimiento de estas bacterias nitrificantes.

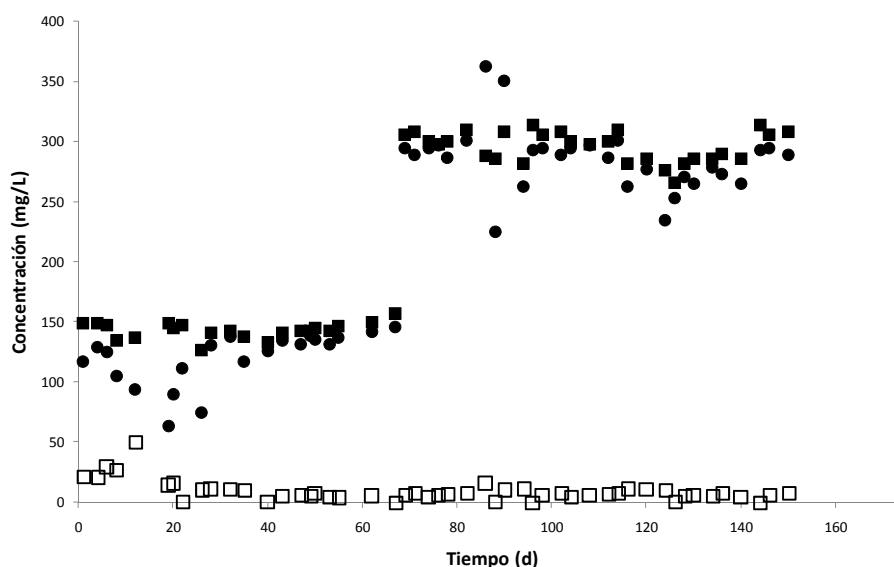


Figura IV.13. Concentraciones de compuestos nitrogenados durante el enriquecimiento de bacterias nitrificantes a una relación C/N=5. (■) N-NH₄⁺ en el influente; (□) N-NH₄⁺ en el efluente; (●) N-NO₃⁻ en el efluente.

Al finalizar el enriquecimiento, el cultivo presentó porcentaje de consumo de nitrógeno amoniacal del 97.7% y un porcentaje de transformación de amonio a nitrato del 98.6%. La tasa de consumo de amonio de este enriquecimiento fue de $600 \pm 5.0 \text{ mg N-NH}_4^+ \cdot \text{g}^{-1} \text{ SSV} \cdot \text{d}^{-1}$ y una tasa de producción de nitrato de $520 \pm 9.0 \text{ mg N-NO}_3^- \cdot \text{g}^{-1} \text{ SSV} \cdot \text{d}^{-1}$.

Después de que se obtuvo el enriquecimiento, la biomasa se transfirió a un recipiente de vidrio con volumen de 7 L. Con el objetivo de minimizar la remoción de los isómeros de nonilfenol vía adsorción en el lodo, se adicionó la tNP y 4-n-NP a una concentración de $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y $500 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. Esta exposición tuvo una duración de 48 horas. Posteriormente, el lodo se adicionó al reactor discontinuo de membrana sumergida hasta obtener una concentración de sólidos suspendidos del licor mezclado de $3\ 500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Durante el arranque y operación del MSBR se observó una etapa de aclimatación a la biotransformación de los isómeros de nonilfenol que se presentó del ciclo 1 al ciclo 49 de operación (Etapa I). A partir del ciclo 50 la remoción de isómeros de nonilfenol fue más estable con porcentajes de variación inferiores al 10% (Etapa II). Del ciclo 184 al ciclo 281 (Etapa III), se redujo la concentración de nitrógeno amoniacal que se alimentaba al sistema, siendo ésta de $40 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, con el fin de determinar si la concentración de amonio disponible en el sistema tiene un efecto sobre la biotransformación de los isómeros de nonilfenol (Figura IV.14, Tabla IV.8).

Operación. En la Tabla IV.8, se presenta un resumen de los resultados obtenidos durante la operación del MSBR. Se observa que al reducir la concentración de nitrógeno amoniacal en la alimentación, el porcentaje de remoción de la tNP disminuyó un 9%. Para determinar si realmente existía una diferencia significativa en los valores de mezcla técnica en el efluente y en el porcentaje de transformación de los isómeros de nonilfenol entre las etapas de operación se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 99.5% (Anexo VIII.4). A partir de dicho análisis estadístico se concluyó que sí existe un efecto de la concentración inicial de nitrógeno amoniacal sobre la biotransformación de los isómeros de nonilfenol. En literatura, se ha reportado que las bacterias amonio-oxidantes pueden cometabolizar compuestos orgánicos a través de la enzima amonio monooxigenasa (Hyman et al., 1998, Keener and Arp, 1994).

Tabla IV.8. Resumen de las etapas de operación del reactor con cambios en la concentración de alimentación de amonio (N-NH_4^+)

Etapa (C/N 5.0)	Tiempo (días)	N-NH_4^+ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	tNP_{inf} ($\text{mg}\cdot\text{d}^{-1}$)	tNP_{efl} ($\text{mg}\cdot\text{d}^{-1}$)	tNP_{EL} ($\text{mg}\cdot\text{d}^{-1}$)	tNP tasa de remoción ($\text{mg}\cdot\text{d}^{-1}$)	% tNP remov	% tNP biodegrad	% tNP adsorb
I	0-49	360	3.51 ± 0.04	1.00 ± 0.52	0.14 ± 0.04	2.65 ± 0.21	75.9 ± 15.5	74.5 ± 14	5.0 ± 1.1
II	50-183	360	3.83 ± 0.15	0.35 ± 0.11	0.16 ± 0.03	2.66 ± 0.08	91.1 ± 3.1	87.0 ± 3.5	5.1 ± 3.9
III	184-284	40	3.85 ± 0.08	0.66 ± 0.09	0.14 ± 0.03	2.41 ± 0.14	82.3 ± 2.3	77.8 ± 3.0	4.8 ± 1.8

Etapa (C/N 5.0)	Tiempo (días)	N-NH_4^+ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	N-NO_2^- ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	N-NO_3^- ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	% NO_2^- prod	% NO_3^- prod
I	0-49	360	252.6 ± 22	40.5 ± 9	83 ± 5	13 ± 3
II	50-183	360	261.5 ± 9	29.1 ± 4	89 ± 3	9.9 ± 1
III	184-284	40	29.1 ± 2	<LD	84 ± 3	-

LD: Límite de detección

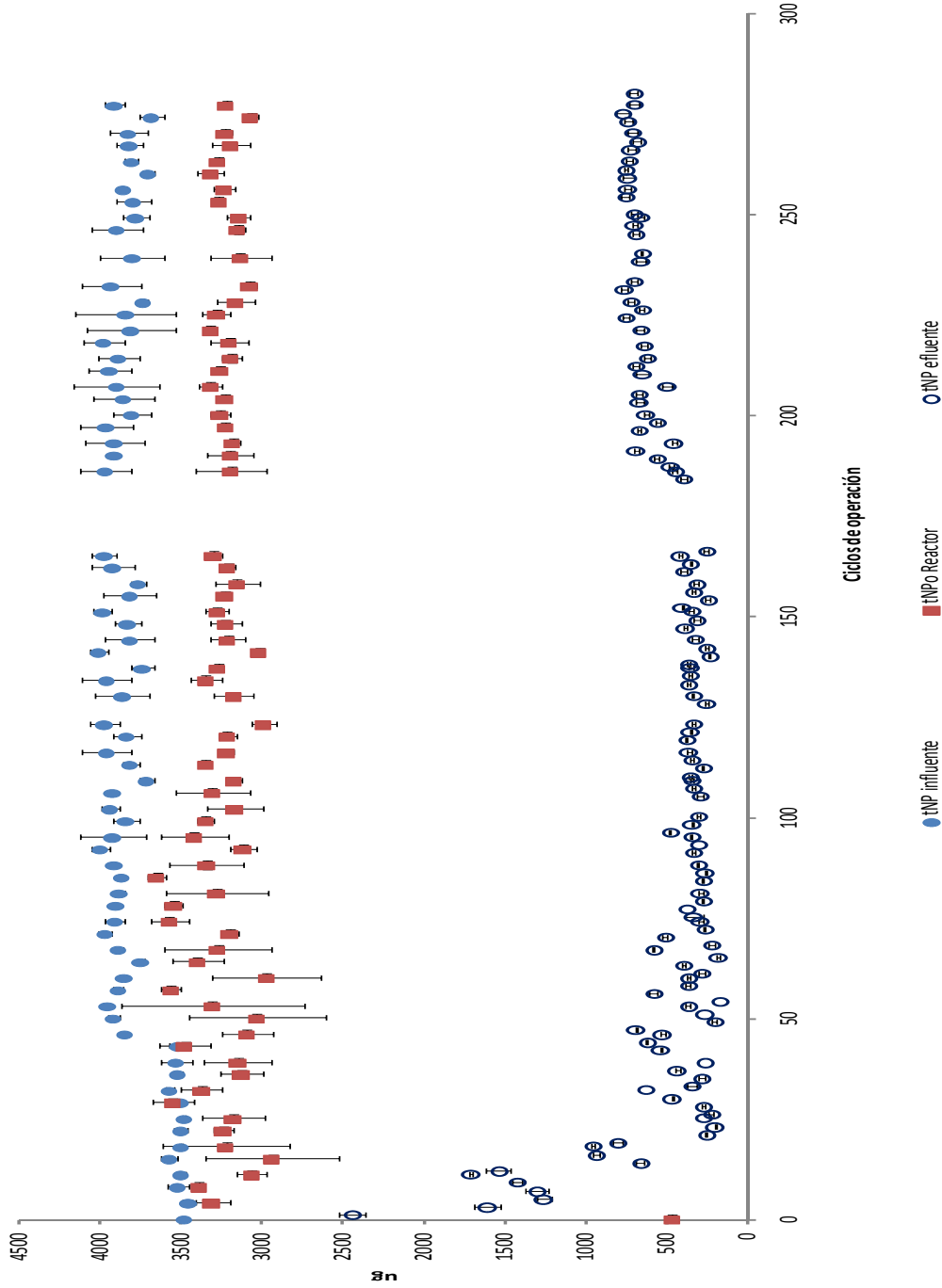


Figura IV.14. Isómeros de nonifenol en el influente, en el efluente y en el reactor 1 hora después del inicio del ciclo.

A fin de determinar si la disminución en la concentración de los isómeros de nonilfenol se debe al proceso de biotransformación o de adsorción, se colectaron, semanalmente, muestras del lodo del reactor y se analizaron. Los resultados mostraron concentraciones similares en cada etapa. La determinación de la fracción removida por adsorción (% Adsorción) de acuerdo a la ecuación III.21 también arrojó valores similares en cada etapa de operación (Tabla IV.8), confirmando que la remoción de los compuestos es el resultado de un proceso de biotransformación más que de un proceso de adsorción. Clara et al. (2005) diferenciaron el proceso de adsorción del lodo de la biodegradación/biotransformación y en el caso de los alquilfenoles etoxilados y sus productos de degradación, la adsorción representó menos del 10% de la remoción total. En este caso, el proceso de adsorción representó alrededor del 5% de la remoción total (Tabla IV.8).

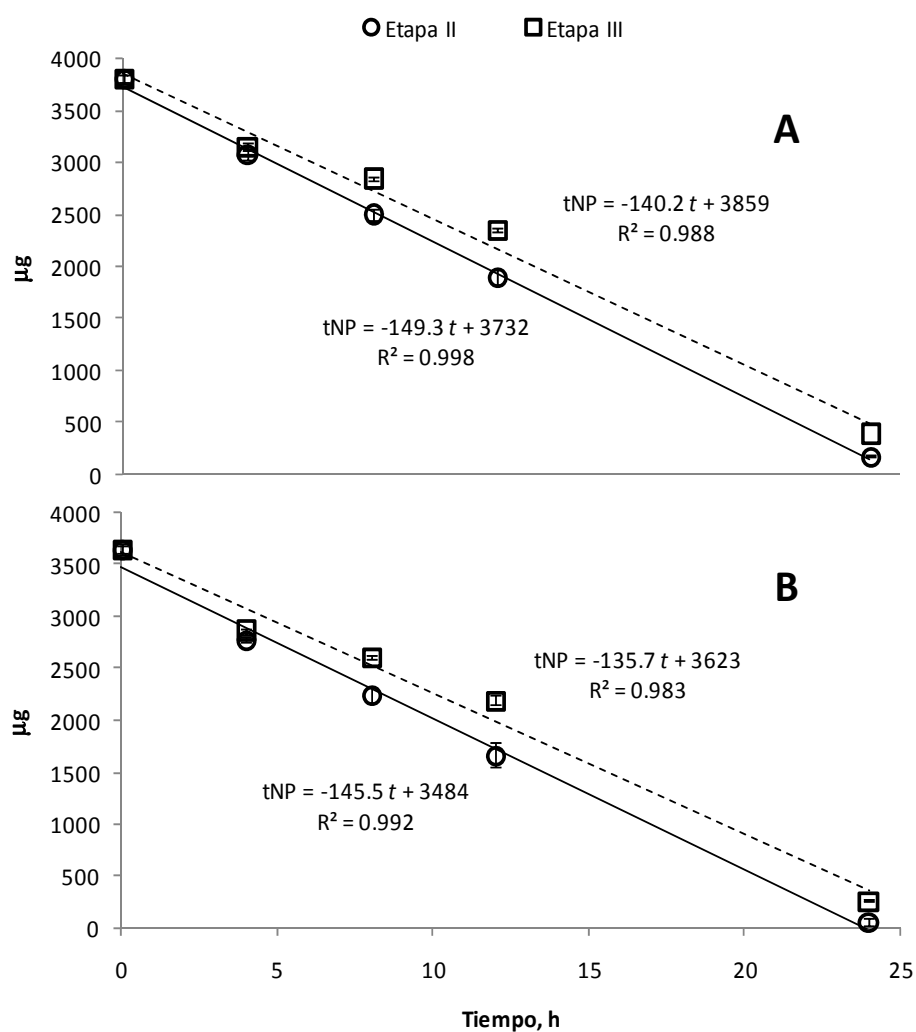


Figura IV.15. Cantidad removida (A) y biotransformada (B) de isómeros de nonilfenol durante cuatro ciclos de operación del MSBR en las etapas II y III. El ajuste del modelo cinético de orden cero se representa por una línea continua para la etapa II y una línea discontinua para la etapa III.

Se determinó la tasa de remoción y degradación a partir del monitoreo del cambio en la concentración de isómeros de nonilfenol a través del tiempo durante 4 ciclos de operación, de acuerdo a lo descrito en el apartado III.6.6 de la sección de metodología. En la prueba de biodegradabilidad con cultivos sin exposición previa a los isómeros de nonilfenol (Apartado IV.2) la cantidad de isómeros de nonilfenol removida en función al tiempo se ajusta a una cinética de primer orden y la degradación de los isómeros presenta un comportamiento típico de una cinética de orden cero. Se asume que esta diferencia en el orden de reacción está dada por el proceso de adsorción, el cual representó entre 30% y 40% de la remoción total. Sin embargo, una vez que las bacterias nitrificantes pasaron por un proceso de exposición y adaptación a los isómeros de nonilfenol, la remoción y la degradación presentan una cinética de reacción de orden cero (Figura IV.15), con valores similares en la constante de reacción. De tal manera, que el proceso de adsorción se ha minimizado, permitiendo que la biodegradación sea el proceso predominante durante la remoción.

Clara et al. (2005) mencionan que la degradación de los microcontaminantes no se ve reflejada en un aumento en la biomasa. De tal manera que este tipo de compuestos son degradados, generalmente, por cometabolismo por lo que se deben considerar modelos cinéticos diferentes a los usualmente empleados para modelar la degradación de macrocontaminantes. En este trabajo, se emplearon los modelos cinéticos de orden cero y pseudo-primer orden para determinar las constantes de remoción y degradación de los isómeros de nonilfenol (Tabla IV.9). En el modelo cinético de primer orden, la velocidad de reacción es independiente de la concentración del contaminante. En el modelo de pseudo-primer orden, la concentración del contaminante es proporcional a la concentración de biomasa, bajo el supuesto de que este valor es constante para cinéticas de corto tiempo (Joss et al., 2006).

Tabla IV.9. Constantes de reacción del modelo cinético de orden cero y de pseudo primer orden para los isómeros de nonilfenol y tasa de oxidación de amonio, obtenidas a una temperatura de 30 °C.

	Remoción		Consumo	
	Etapa II	Etapa III	Etapa II	Etapa III
$k_0, \mu\text{g}\cdot\text{h}^{-1}$	149.3	140.2	145.5	135.7
r^2	0.998	0.988	0.992	0.983
k_1, h^{-1}	0.040	0.030	0.053	0.034
r^2	0.885	0.901	0.857	0.854
tasa de oxidación de N-NH_4^+ , d^{-1}	-	-	0.432	1.778
r^2	-	-	0.997	0.996

Como puede observarse, la mayor tasa de consumo de los isómeros de nonilfenol se presentó cuando la tasa de oxidación del nitrógeno amoniacal fue menor. Skotnicka-Pitak et al. (2009), en estudios de biotransformación de 17α -etinilestradiol con *N. europea* en quimiostato, reportan que la biotransformación del estrógeno está relacionada con la actividad de la enzima amonio-monooxigenasa. Aunque Keener y Arp (1994) han expuesto que el incremento de las concentraciones de amoniaco realza la oxidación de los sustituyentes metil/metileno de los bencenos alquilados, los autores mencionan que la adaptación fisiológica de *N. europaea* para sobrevivir a una condición donde el amoniaco está limitado puede seleccionar, preferiblemente, la reacción de monohidroxilación en oposición a otras. Esta reacción de monohidroxilación es la que presumiblemente se llevaría a cabo durante la biotransformación del nonilfenol. Otros estudios han reportado que los mayores tasas de remoción del contaminante (EE2) se alcanzan cuando la concentración del amonio en el medio es mínima (De Gussemme et al., 2009). Estos autores observaron que al disminuir la concentración de nitrógeno amoniacal en el sistema, el porcentaje de remoción del estrógeno también disminuía. Sin embargo, mencionan que la degradación de EE2 está sujeta a un efecto de competencia entre esta molécula y el amonio por el sitio activo de la enzima amonio monooxigenasa (AMO) ya que en los estudios en lote que realizaron se observa que la mayor tasa de remoción de EE2 se alcanza cuando la concentración de amonio en el medio es mínima.

Las tasas de remoción obtenidas en este estudio (k_0) son comparables a las reportadas en literatura, $3.58 \text{ mg}\cdot\text{d}^{-1}$ y $3.36 \text{ mg}\cdot\text{d}^{-1}$ en la etapa II y III, respectivamente. Soares et al. (2003) evaluaron la remoción de una mezcla técnica de nonilfenol en un reactor de lecho empacado inoculado con *Sphingomonas* sp., reportando tasas de remoción entre 2.88 y $20.78 \text{ mg}\cdot\text{d}^{-1}$. La mayor eficiencia de remoción, 99.5%, la obtuvieron a una tasa de remoción de $4.32 \text{ mg}\cdot\text{d}^{-1}$. Lee et al. (2008) operaron un reactor de membranas a un TRS de 20 días para favorecer la nitrificación, observando una tasa de remoción de isómeros de nonilfenol de $9.13 \text{ mg}\cdot\text{d}^{-1}$, y una eficiencia de remoción de $55\% \pm 25\%$. Es importante hacer notar que en los estudios mencionados anteriormente, el principal mecanismo de remoción es a través de la adsorción de los compuestos en el lodo biológico. Sin embargo, en este estudio, la adsorción fue el mecanismo que menos aportó al proceso de remoción global (Tabla IV.8), situándose entre 4.8% y 5.1%.

Al reducir la concentración de amonio en la alimentación, la oxidación de amonio a nitrito presentó una ligera reducción del 5% de la etapa II a la etapa III de operación (Tabla IV.8), aunque la tasa de oxidación del amonio en la etapa III de operación fue 4 veces mayor que en la etapa II (Tabla IV.9). El metabolismo de las bacterias amonio-oxidantes comprende

la medición de dos actividades metabólicas, la tasa de consumo de oxígeno asociado a la oxidación del amonio y la tasa de consumo de oxígeno asociado a la oxidación de la hidroxilamina (Tabla I.2). Stein y Arp (1998) reportan que el cultivo de *N. europaea* bajo condiciones de limitación de amonio ($<200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y en presencia de alcanos, tiene un efecto más negativo sobre la actividad de oxidación de la hidroxilamina que sobre la actividad amonio-oxidante. Los autores argumentan que esta pérdida de la actividad de oxidación de la hidroxilamina puede ser el resultado de una inhibición tipo *feedback*, la desviación de un agente inactivante de su objetivo preferido hacia la HAO, o la inactivación de la HAO por productos de la oxidación de los alcanos, como son los alcoholes y los aldehídos (Vosey y Wood, 1987). De tal manera que aunque la tasa de oxidación de amonio obtenida en la etapa III de operación, calculada a través del perfil de consumo de N-NH_4^+ , presentó un alto más alto que en la etapa II, la oxidación de la hidroxilamina a nitrito pudo estar inhibida en cierto grado por la presencia del nonilfenol y sus intermediarios. Por tanto, el porcentaje de producción de NO_2^- en la etapa III sería menor en comparación con lo obtenido en la etapa II. A lo largo de la operación del reactor, se observó un cierto grado de inhibición de la actividad nitrito-oxidante, cesando durante la última etapa de operación (Figura IV.16).

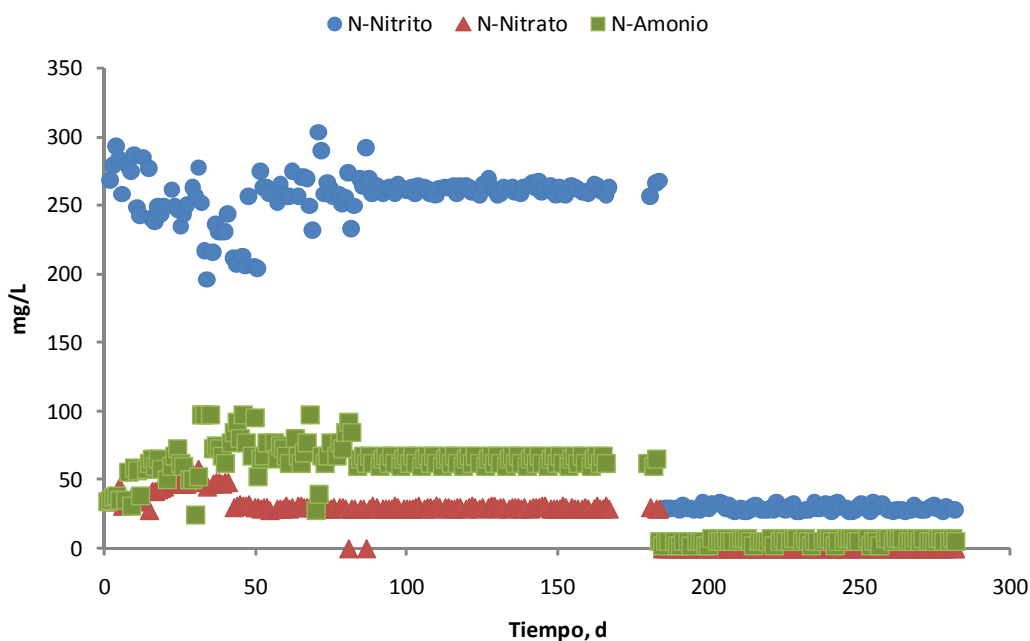


Figura IV.16. Concentración de compuestos nitrogenados en el efluente durante la operación del MSBR.

En la literatura se reporta que la inhibición de la actividad nitrito-oxidante está relacionada con la concentración residual de nitrógeno amoniacal en el sistema. Estudios previos han mostrado que concentraciones tan bajas como $6.6 \text{ mg N-NH}_3\cdot\text{L}^{-1}$ pueden iniciar la

inhibición de la actividad nitrito-oxidante en cultivos mixtos (Mauret et al., 1996), debido a que el amoníaco libre es un inhibidor competitivo de la enzima nitrito oxidorreductasa (Yang and Alleman, 1992). El efluente de este sistema, en la primera etapa de operación, presentó una concentración residual promedio de nitrógeno amoniacal de $65.4 \pm 17.5 \text{ mg N-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$ que bajo las condiciones de pH y temperatura con las que se operó el sistema muestran una concentración de amoníaco libre teórico de $0.46 \pm 0.47 \text{ mg NH}_3 \cdot \text{L}^{-1}$. Dicha concentración es menor a la que se reporta en literatura como necesaria para inhibir la actividad nitrito-oxidante, por lo tanto esta hipótesis se descarta.

Otra hipótesis está relacionada con la acción inhibitoria de alguno de los intermediarios producidos durante la biotransformación de los isómeros de nonilfenol por el consorcio nitrificante. Kraigher et al. (2008) mostraron que ciertos fármacos pueden afectar la actividad nitrito-oxidante, así como la ecología microbiana del sistema, lo que finalmente influye en la operación del tratamiento biológico de aguas residuales. En ese estudio, las bacterias asociadas al género *Nitrospira* se detectaron en el reactor control, sin embargo, la presencia de fármacos desde concentraciones de $50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ de cada compuesto, afectó la dinámica poblacional observándose que dichas bacterias ya no estaban presentes en el sistema. Kim et al. (2007) ya habían mostrado que la actividad de las bacterias nitrito-oxidantes puede resultar inhibida por la presencia de compuestos como el bisfenol A y el nonilfenol y requieren de tiempos más largos para adaptarse comparado con las bacterias amonio-oxidantes. En nuestro caso, asumimos que la presencia del nonilfenol y sus intermediarios de degradación pudieron inhibir la actividad nitrito-oxidante como lo reportaron Kraigher et al. (2008). Para evaluar esta hipótesis se realizaron experimentos adicionales (Apartado IV.4).

IV.3.3. Inhibición con aliltiourea

En la Figura IV.17 se observa el perfil de consumo de isómeros de nonilfenol durante la prueba de inhibición de la actividad nitrificante con aliltiourea (ATU). La aliltiourea es un inhibidor específico de la enzima amonio monooxigenasa, por tanto al evitar la acción de esta enzima se puede determinar cuál es el porcentaje de participación de las bacterias amonio-oxidantes en la biodegradación de los isómeros de nonilfenol. Durante la duración de esta prueba no se observó consumo de amonio ni producción de nitrito lo que indica que la ATU inhibió efectivamente a la enzima amonio monooxigenasa. En la fase líquida, el porcentaje de consumo de isómeros de nonilfenol alcanzó un valor de 30% y 27% en la etapa II y III, respectivamente. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que el nonilfenol es un compuesto hidrofóbico que tiende a adsorberse en la superficie del lodo biológico. Por tanto, para obtener el consumo real es necesario considerar la cantidad que se ha adsorbido en esta

fase. Haciendo esta consideración, el porcentaje de consumo real de isómeros de nonilfenol sólo es de 12% y del 10% en cada etapa.

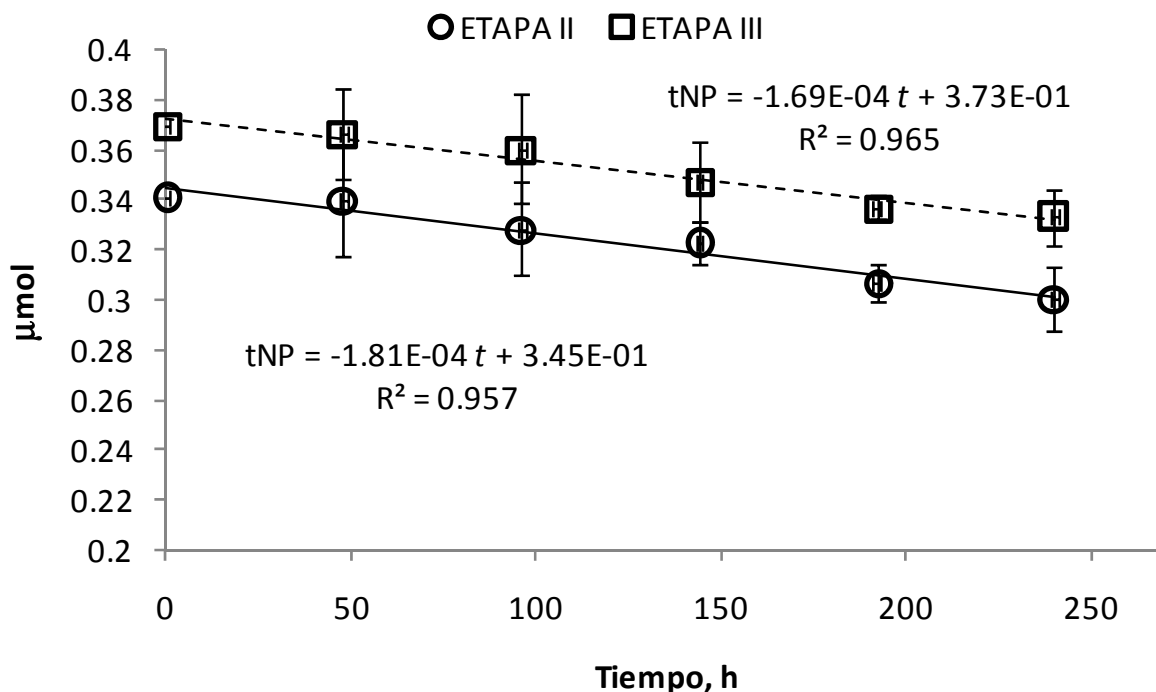


Figura IV.17. Cantidad consumida de isómeros de nonilfenol. Cinética con alilitiurea. Las líneas continua y discontinua representan el ajuste a un modelo cinético de orden cero.

De manera similar a lo ocurrido en las pruebas de biodegradabilidad, se observó un proceso de adsorción de nonilfenol en el lodo a las 48 horas, después de este tiempo, la cantidad de isómeros adsorbidos permaneció constante lo que indica que se llegó al equilibrio de adsorción. En la Tabla IV.10 se pueden observar los resultados de consumo de nonilfenol que se han obtenido en diferentes pruebas en este proyecto. Durante la operación del MSBR se calculó un consumo de tNP de 63% a los 100 días de operación. En esta prueba, inhibiendo la enzima amonio monooxigenasa del inóculo de dicho reactor con ATU, sólo se obtuvo un consumo del 12%. Por tanto, se podría asumir que las bacterias amonio-oxidantes son las principales responsables de la transformación para la posterior degradación de los isómeros de nonilfenol.

Tabla IV.10. Porcentaje de consumo de isómeros de nonilfenol en ausencia y presencia de alitiourea.

	tNP consumido (%)	k, $\mu\text{g}\cdot\text{h}^{-1}$
MSBR (Etapa II; C/N = 5.0)	63	149.3
Biodegradabilidad con ATU	12	0.040
MSBR (Etapa III C/N 5.0)	55	140.2
Biodegradabilidad con ATU	10	0.037

De Gusseme et al., (2009) realizaron una prueba en lote para evaluar la remoción del 17α -etinilestradiol (EE2) empleando un consorcio nitrificante. Se adicionó al medio ATU a una concentración de $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, para inhibir específicamente a la enzima AMO, además se incluyó un control positivo que no contenía ATU. Estos investigadores reportan que la enzima AMO fue inhibida ya que no se observó consumo de amonio y por tanto no hubo producción de nitrito. El consumo de EE2 sin presencia de inhibidor fue de $96 \pm 1\%$, y se observó un consumo de este estrógeno del $38 \pm 1\%$ con la adición de ATU, a las 214 h en ambos casos. Kim et al., (2007) realizaron una prueba de biodegradabilidad del Bisfenol A (BPA) empleando un consorcio nitrificante en el que inhibieron la actividad de la enzima amonio monooxigenasa añadiendo ATU al medio a una concentración de 0.1 mM. Estos investigadores observaron que sin la adición del inhibidor, el BPA se consume hasta un 85% en 24 h. Cuando el inhibidor es añadido, el consumo de BPA se reduce a sólo un 19%. Dicho consumo puede atribuirse a la actividad de las bacterias heterótrofas presentes en el consorcio nitrificante. Es importante hacer notar que en ambos trabajos sólo se analizó la fase líquida sin tomar en cuenta la cantidad de contaminante que se adsorbió en la fase sólida, lo que puede llevar a una sobreestimación del proceso de biotransformación.

IV.3.4. Identificación de intermediaries

La concentración inicial de nitrógeno amoniacal no sólo tuvo un efecto sobre el porcentaje de remoción de los isómeros de nonilfenol, también influyó en el tipo de metabolitos formados (Figura IV.18).

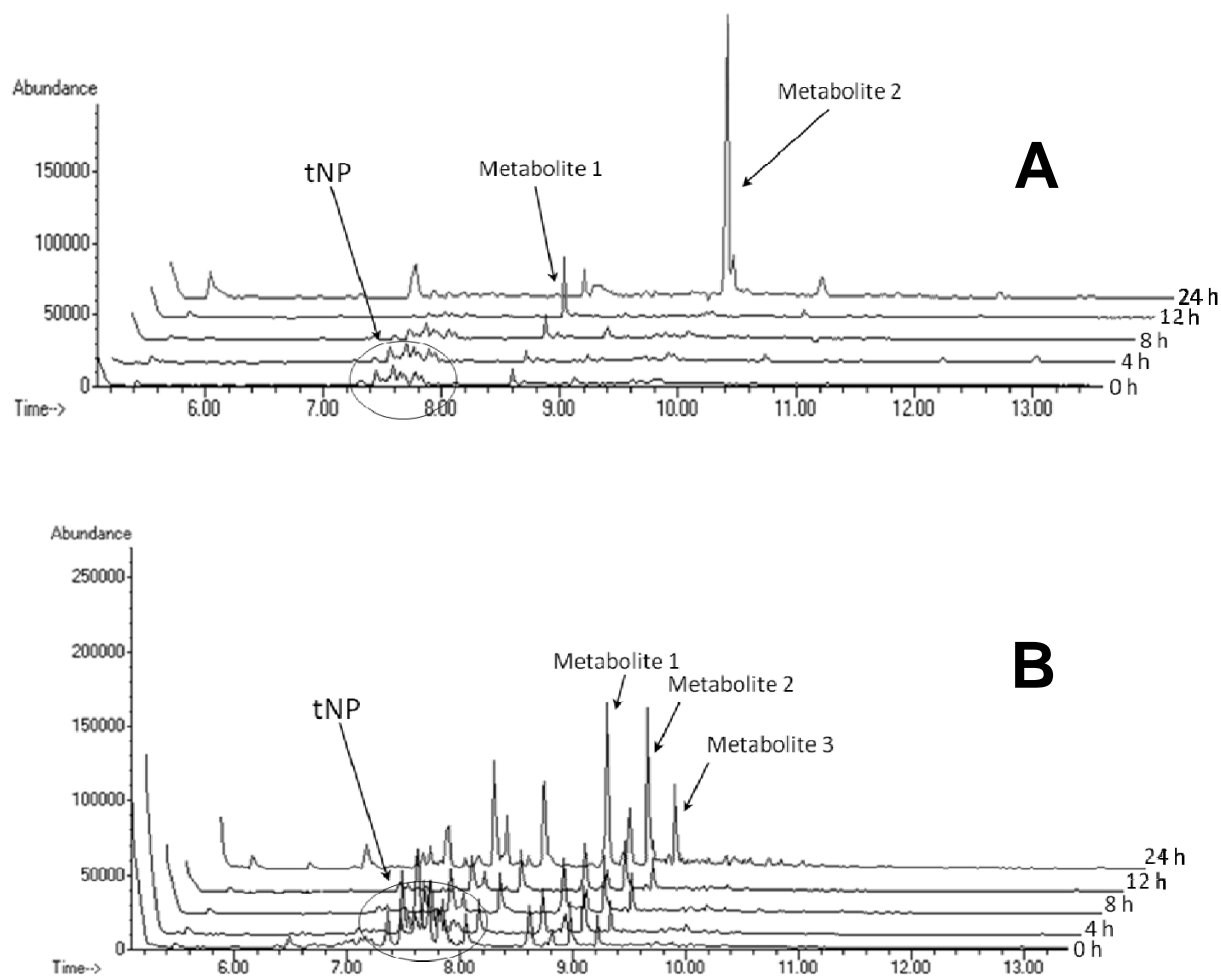


Figura IV.18. Cromatogramas obtenidos durante el muestreo del ciclo de operación del MSBR. Los tiempos laterales (0 a 24 h) representan los tiempos de muestreo durante un ciclo de operación del MSBR. A) 360 mg/L N-NH₄⁺ en la alimentación; B) 40 mg/L N-NH₄⁺ en la alimentación.

Diversos autores han reportado que factores como la posición, estructura y longitud de la cadena alquílica, la concentración del nonilfenol en el medio, la concentración de oxígeno o la temperatura influyen sobre la degradación del nonilfenol (Tanghe et al., 1999; Fujii et al., 2001; Gabriel et al., 2005b; Corvini et al., 2006a). En la Tabla IV.11 se enlistan los metabolitos identificados en cada etapa de operación. Es posible que la actividad nitrito-oxidante tuviera algún papel sobre la biotransformación de los isómeros dada la diferencia en los intermediarios producidos una vez que la actividad nitrito-oxidante cesó completamente en la etapa III de operación del MSBR.

Tabla IV.11. Intermediarios identificados durante la biotransformación de los isómeros de nonilfenol en el MSBR.

Etapa	Intermediario
II	1 Pentametildisilaniloctano
	2 1,2-Acido Bencendicarboxílico, mono(2-etilhexil)ester
III	1 Acido propanoico, 2-metil-trimetilsililester
	2 1,2-Acido bencendicarboxílico, bis(trimetilsilil)ester)
	3 Etil(trimetilsilil) metilmalonato

Los resultados de la identificación preliminar de los metabolitos muestran que la degradación de los isómeros involucra dos pasos principales, la pérdida de unidades en la cadena alquílica y la apertura del anillo aromático para su posterior degradación. Soares et al. (2006) operaron un reactor de lecho empacado degradando una mezcla técnica de nonilfenol con un consorcio mixto, detectando fenoles con cadenas alquílicas de tres a cuatro carbonos cuando el porcentaje de remoción de nonilfenol fue inferior al 90%. Por el contrario, cuando el porcentaje de remoción fue superior al 90%, el consorcio fue capaz de degradar completamente el nonilfenol, ya que los intermediarios detectados mostraron que se llevó a cabo la apertura del anillo aromático para su posterior degradación. En este caso, a pesar de que la remoción de nonilfenol fue igual o superior al 90% durante la operación del reactor, la degradación de los isómeros no fue completa, observándose la producción de compuestos fenólicos con cadenas alquílicas laterales. Este comportamiento se observó en experimentos de degradación de isómeros de nonilfenol con *Sphingobium xenophagum* Bayram (Gabriel et al., 2008). Los autores argumentaron que la degradación diferencial de los isómeros de nonilfenol es causada, probablemente, por las tasas de *ipso*-hidroxilación que varían entre los isómeros. La incapacidad que presentó el fragmento alquílico para separarse dio como resultado una acumulación de intermediarios tipo ciclohexadienona con la subsecuente formación de metabolitos sin posible degradación.

Es importante reconocer que los diferentes metabolitos formados durante cada etapa de operación, muestran la importancia de monitorear las condiciones de operación como un parámetro cinético que puede dirigir la ruta metabólica de degradación de los isómeros de nonilfenol, así como la naturaleza de los intermediarios formados. La biotransformación de los isómeros por el consorcio presente en el MSBR no dio como resultado la mineralización del compuesto.

IV.4. Efecto de la concentración de isómeros de nonilfenol sobre la actividad nitrificante

Los inóculos empleados en este estudio se obtuvieron por enriquecimiento a partir de lodo activado a diferentes relaciones C/N en la alimentación, la composición de cada medio mineral se puede observar en la Tabla III.3. Durante dicho enriquecimiento se hizo el seguimiento periódico de la actividad nitrificante y heterótrofa a través de respirometrías. En los últimos años, la respirometría ha simplificado los estudios cinéticos del proceso nitrificante. Esta metodología permite estimar los coeficientes cinéticos de las bacterias heterótrofas y autótrofas a través de la cuantificación e interpretación del consumo de oxígeno. De igual manera, se cuantificaron los compuestos nitrogenados (NH_4^+ , NO_2^- y NO_3^-) al inicio y final de los ciclos de operación. En la Tabla IV.12 se reportan la actividad nitrificante, nitrito-oxidante y heterótrofa obtenida al final del enriquecimiento para cada cultivo.

Tabla IV.12. Actividad nitrificante y nitrito-oxidante inicial para cada enriquecimiento evaluado.

Enriquecimiento	Actividad nitrificante ($\text{mg N-NH}_4^+ \cdot \text{g}^{-1} \text{SSV} \cdot \text{d}^{-1}$)	Actividad nitrito-oxidante ($\text{mg N-NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \text{SSV} \cdot \text{d}^{-1}$)	Actividad heterótrofa ($\text{mg O}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{SSV} \cdot \text{d}^{-1}$)
C/N 1.7 (USC)	702.18 ± 66.72	525.01 ± 37.96	33.1 ± 24.5
C/N 1.7 (II-UNAM)	586.63 ± 15.90	654.55 ± 46.28	8.6 ± 3.4
C/N 2.5 (II-UNAM)	575.98 ± 23.28	1412.88 ± 62.59	5.5 ± 4.1
C/N 5.0 (II-UNAM)	654.09 ± 18.07	800.96 ± 60.50	15.2 ± 6.9

Cada enriquecimiento fue expuesto a una concentración de 0, 100, 250, 500 y 1000 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ de isómeros de nonilfenol durante 1 hora, posteriormente, las actividades nitrificante y nitrito-oxidante se evaluaron nuevamente. Se calculó el porcentaje de inhibición para cada caso y los resultados se muestran en la Tabla IV.13. A partir de los datos obtenidos y en los enriquecimientos que presentaron un porcentaje máximo de inhibición superior al 50%, se calculó el IC_{50} (concentración dónde la actividad metabólica se inhibe un 50%).

Para la actividad nitrificante, se obtuvieron valores de IC_{50} de 310 $\mu\text{g tNP} \cdot \text{L}^{-1}$ y 407 $\mu\text{g tNP} \cdot \text{L}^{-1}$ para el enriquecimiento 'C/N 1.7 USC' y 'C/N 1.7', respectivamente. En el caso de la actividad nitrito-oxidante, el enriquecimiento 'C/N 5.0' fue el único con un porcentaje máximo de inhibición superior al 50%, el valor de IC_{50} calculado fue de 491 $\mu\text{g tNP} \cdot \text{L}^{-1}$. Dokianakis et al. (2006), evaluaron el efecto del 4-n-nonilfenol sobre la actividad amonio-oxidante en

aislados de bacterias amonio-oxidantes y en lodo activado. Estos investigadores reportaron un valor de IC_{50} de $720 \mu\text{g } 4\text{-n-NP}\cdot\text{L}^{-1}$, además mencionan que la inhibición de la actividad amonio-oxidante fue menor en lodo activado nitrificante, sin embargo, no reportan a qué concentración se presenta el 50% de la inhibición de dicha actividad. Dado que el nonilfenol presenta propiedades surfactantes, puede asumirse que a ciertas concentraciones, este compuesto puede reaccionar directamente con la estructura de la pared celular provocando una respuesta tóxica sobre la enzima amonio monooxigenasa. Brandt et al. (2001) ya habían sugerido este mecanismo para explicar el efecto inhibitorio de surfactantes como los alquilbencensulfonatos de cadena lineal. Con respecto a los estudios realizados evaluando la actividad nitrato-oxidantes se pueden mencionar a Dokianakis et al. (2004) quienes evaluaron el efecto de siete xenobióticos sobre un lodo activado nitrato-oxidante observando que sólo se presentó inhibición de su actividad en presencia de ofloxacina ($12 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), sulfametoxazol ($13.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y triclosán ($0.045 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Kraigher et al. (2008) mostraron que ciertos fármacos pueden afectar la actividad nitrato-oxidante así como la ecología microbiana del sistema, lo que finalmente influye en la operación del tratamiento biológico de aguas residuales. Las bacterias asociadas al género *Nitrospira* se detectaron en el reactor control, sin embargo, la presencia de fármacos desde concentraciones de $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de cada compuesto, afectó la dinámica poblacional observándose que dichas bacterias ya no estaban presentes en el sistema. Hasta el momento, no hay información sobre el efecto inhibitorio del nonilfenol sobre la actividad nitrato-oxidante.

Al evaluar la actividad amonio-oxidante, se observa que el enriquecimiento 'C/N 1.7 USC' presentó una inhibición total de la actividad nitrificante a una concentración de $1000 \mu\text{g tNP}\cdot\text{L}^{-1}$. En cuanto a los enriquecimientos conseguidos en este laboratorio, el cultivo a una relación C/N igual que 1.7 presentó el mayor porcentaje de inhibición (56%) cuando se expuso a la mayor concentración de tNP, seguido por el enriquecimiento a una relación C/N igual que 5.0.

En el caso de la actividad nitrato-oxidante, el enriquecimiento 'C/N 1.7 USC' no mostró inhibición aún después de exponerlo a una concentración de $1000 \mu\text{g tNP}\cdot\text{L}^{-1}$. Sin embargo, el enriquecimiento obtenido en este laboratorio a esa misma relación C/N, sí mostró una disminución de la actividad (15%) a la mayor concentración de isómeros de nonilfenol. El enriquecimiento obtenido a una relación C/N de 5.0 es el que presenta el mayor porcentaje de inhibición. Así pues, cabe hacer notar que las condiciones de enriquecimiento afectan la sensibilidad de las poblaciones de bacterias nitrificantes a los isómeros de nonilfenol.

En estudios con biopelículas y suelo (Azam et al., 2004), se ha reportado que las tasas de nitrificación dependen de la actividad microbiana, la disponibilidad de C y la

concentración de CO₂ en la atmósfera del suelo. Dado que el contenido de CO₂ en la atmósfera al interior del suelo es varias veces mayor que fuera de él, las bacterias nitrificantes funcionan a elevados niveles de CO₂. A niveles normales de CO₂, la nitrificación (como medida de la desaparición de NH₄⁺ y acumulación de NO₃⁻) fue mayor ya que el amonio marcado desapareció en 5 días, aunque los autores observaron que incrementar la concentración de CO₂ aumentó la tasa de nitrificación.

Tabla IV.13. Porcentaje de inhibición de la actividad nitrificante y nitrito-oxidante para cada uno de os enriquecimientos evaluados.

		Concentración tNP (µg·L ⁻¹)				
		0	100	250	500	1000
Actividad Nitrificante	C/N 1.7 USC	0	12.44±1.44	40.81±0.50	75.04±0.04	99.88±0.01
	C/N 1.7 UNAM	0	6.81±3.70	49.26±5.54	52.89±3.48	55.94±4.93
	C/N 2.5 UNAM	0	7.76±2.90	9.58±2.26	12.15±2.79	17.14±2.86
	C/N 5.0 UNAM	0	2.15±3.80	5.73±2.05	15.40±4.96	20.99±2.35
Actividad Nitrito-oxidante	C/N 1.7 USC	0	0	0	0	0
	C/N 1.7 UNAM	0	0	6.59±7.16	14.55±1.92	14.55±9.08
	C/N 2.5 UNAM	0	1.62±1.41	17.23±5.95	25.74±5.71	23.45±1.29
	C/N 5.0 UNAM	0	19.35±3.28	39.22±0.71	50.04±3.54	54.26±3.66

Hay una cantidad limitada de información en la literatura con respecto a la estequiometría del consumo de bicarbonato en relación a la tasa de oxidación del sustrato. Billen (1976), estima la proporción para las bacterias amonio-oxidantes en 0.1 µmol de bicarbonato consumido por µmol de amonio oxidado; para las bacterias nitrito-oxidantes esta proporción se estima en 0.02. Belser (1984) realizó experimentos para evaluar el efecto de la concentración de bicarbonato sobre la tasa de crecimiento. Este autor reporta que, en el caso de *Nitrobacter sp.*, una bacteria nitrito-oxidante, se observó que al incrementar la tasa de oxidación relativa disminuye la eficiencia a la que el bicarbonato se consume por µmol de sustrato oxidado. Por el contrario, para las bacterias amonio-oxidantes evaluadas, la máxima eficiencia de consumo se localiza cerca de la tasa de oxidación del sustrato. También reporta que la presencia de inhibidores causa una mayor disminución en la eficiencia de consumo de *Nitrobacter sp.* que sobre la eficiencia presentada por las bacterias amonio-oxidantes. Las células adaptan sus niveles enzimáticos para mantener una relación de consumo constante la cual es independiente de la velocidad de crecimiento. Por ejemplo, para las células de *Nitrobacter* cuando las concentraciones de sustrato alimentado fueron similares, la tasa de consumo fue significativamente menor para las células con una tasa de crecimiento menor.

Denecke et al. (2003) realizaron experimentos con lodo nitrificante proveniente de un biorreactor de membrana y con lodo heterótrofo de un proceso nitrificante/desnitrificante para determinar si la concentración de CO_2 tiene un efecto sobre la tasa de crecimiento. Los autores reportan que existe una relación entre la concentración de CO_2 y la tasa de crecimiento, además de que dichas tasas máximas de crecimiento fueron independientes del tipo de lodo empleado. Una diferencia significativa entre ambos inóculos fue que el lodo heterótrofo siempre exhibió tasas de crecimiento mayores que las bacterias autótrofas para cualquier concentración de CO_2 dada. La cercana asociación de los microorganismos heterótrofos con los nitrificantes puede incrementar la difusión de CO_2 , lo cual quizás, es un factor más importante que la concentración de CO_2 en el seno del líquido. De acuerdo a sus resultados, en ambos casos, las concentraciones de CO_2 en el medio, mayores a $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (0.4% de CO_2 en el suministro de aire) inhibieron la tasa de crecimiento. Sin embargo, los autores no indican cuál fue la concentración de nitrógeno amoniacal alimentada por lo que se desconoce cuál es la relación C/N en cada uno de los experimentos realizados. Cabe hacer notar, que la relación entre la concentración de CO_2 y la tasa de crecimiento exhibió el comportamiento propio del modelo cinético de Haldane. El valor de K_i , o la concentración de sustrato a la cual la tasa de reacción es la mitad del valor máximo, se calculó en $42 \text{ mg CO}_2\cdot\text{L}^{-1}$ (5% CO_2 en el suministro de aire), aproximadamente. Los autores calculan un valor de K_s con los datos por debajo del valor óptimo en el modelo de Haldane, para ambos inóculos, el valor de K_s estuvo alrededor de $0.5 \text{ mg CO}_2\cdot\text{L}^{-1}$.

Tabla IV.14. Evolución de la actividad nitrificante del enriquecimiento C/N 1.7 USC durante la degradación de isómeros de nonilfenol.

Tipo de biomasa	Disolución empleada	Tiempo de exposición (d)	Actividad nitrificante ($\text{mg N-NH}_4^+\cdot\text{g}^{-1} \text{SSV}\cdot\text{d}^{-1}$)
Lodo nitrificante	tNP en metanol	0	720 ± 56
Lodo nitrificante	tNP en agua	0	702 ± 67
Lodo nitrificante	tNP en agua	27	348 ± 18
Lodo nitrificante	tNP en agua	43	518 ± 36
Mezcla de lodo nitrificante y heterótrofo (1:1)	tNP en agua	43	216 ± 38

Se realizaron pruebas adicionales con el enriquecimiento 'C/N 1.7 USC'. Este enriquecimiento se expuso de manera continua a una concentración de $50 \mu\text{g tNP}\cdot\text{L}^{-1}$. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla IV.14. Así mismo, se evaluó el efecto de la

concentración de isómeros de nonilfenol sobre el lodo nitrificante sin exposición previa a dichos compuestos y con 43 días de exposición. Después de 43 días de exposición continua a $50 \mu\text{g tNP}\cdot\text{L}^{-1}$, el lodo volvió a evaluarse a diferentes concentraciones de tNP a fin de determinar si la exposición previa podía modificar la concentración de inhibición. Dados los resultados anteriormente obtenidos, sólo se evaluó la actividad nitrificante. En la Figura IV.19 podemos observar que aún existe una relación inversamente proporcional entre la actividad nitrificante y la concentración de isómeros de nonilfenol en el medio. En este caso el IC_{50} calculado es de $178 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ con una disolución acuosa, lo que representa una disminución de 43% en la concentración obtenida sin exposición previa a los isómeros de nonilfenol. De acuerdo a lo reportado por Volkering et al. (1998), los surfactantes no iónicos, como es el caso del nonilfenol, pueden afectar el transporte de sustrato hacia la bacteria así como inhibir el crecimiento celular y la permeabilidad de la membrana.

La exposición continua del enriquecimiento 'C/N 1.7 USC' llevó a una disminución de la actividad nitrificante del lodo, parcialmente atribuible al incremento de biomasa heterótrofa dentro del mismo. Por tanto, se evaluó la actividad heterótrofa del lodo nitrificante del reactor obteniéndose un valor máximo de $50 \text{ mg DQO}\cdot\text{g}^{-1}\text{SSV}\cdot\text{d}^{-1}$. Sin embargo, la evaluación de la actividad heterótrofa del lodo nitrificante a diferentes concentraciones de tNP, muestra que estas bacterias presentan una inhibición superior al 50% a concentraciones mayores a $300 \mu\text{g tNP}\cdot\text{L}^{-1}$ (Tabla IV.15)

Tabla IV.15. Actividad heterótrofa del enriquecimiento 'C/N 1.7 USC' después de 43 días de exposición continua a tNP a diferentes concentraciones de isómeros.

[tNP] ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Act. Heterótrofa ($\text{mg DQO}\cdot\text{g}^{-1}\text{SSV}\cdot\text{d}^{-1}$)
0	33.1 ± 24.5
100	23.2 ± 11.3
200	24.4
300	13.0 ± 30.0
500	12.9 ± 13.3

Adicionalmente, se evaluó la actividad nitrificante de una mezcla del lodo nitrificante del enriquecimiento 'C/N 1.7 USC' y un lodo heterótrofo a una proporción 1:1. Los resultados de este experimento muestran que la alta concentración de biomasa heterótrofa tiene un efecto protector sobre la inhibición causada por los isómeros de nonilfenol en la actividad nitrificante (Figura IV.19).

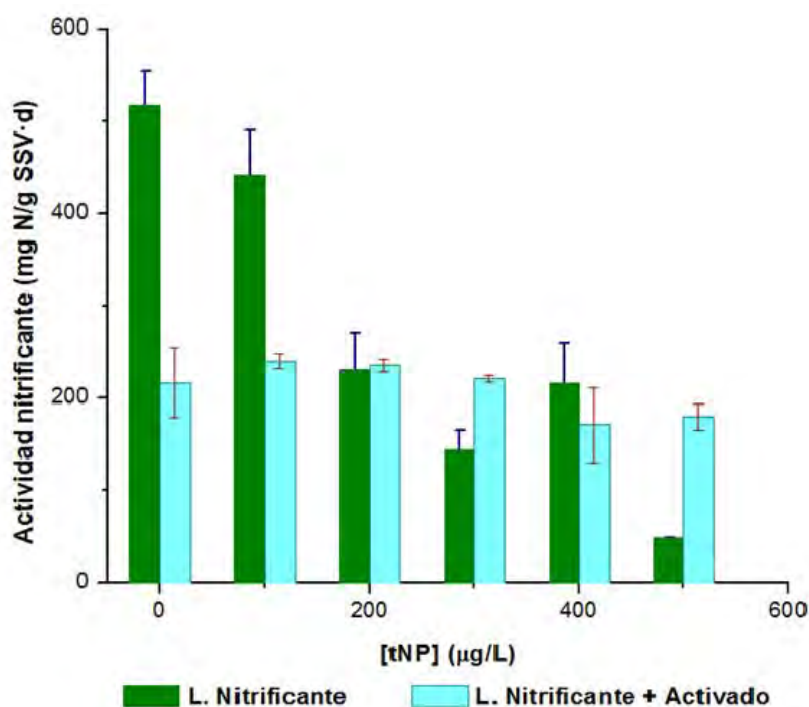


Figura IV.19. Actividad nitrificante del enriquecimiento 'C/N 1.7 USC' a diferentes concentraciones de tNP con lodo nitrificante y mezcla de lodo nitrificante+heterótrofo (1:1) a 43 días de exposición continua a 50 $\mu\text{g tNP}\cdot\text{L}^{-1}$.

Los resultados obtenidos previamente con respecto a la capacidad de adsorción del lodo nitrificante y el lodo heterótrofo (apartado IV.2.2) mostraban que la tasa inicial de adsorción en el lodo activado ($27.32 \mu\text{g tNP}\cdot\text{g}^{-1} \text{SSV}\cdot\text{h}^{-1}$) es menor a la que presenta el lodo nitrificante ($61.35 \mu\text{g tNP}\cdot\text{g}^{-1} \text{SSV}\cdot\text{h}^{-1}$). Sin embargo, la capacidad de adsorción del lodo activado es 8.6% más alta que la que se observa para el lodo nitrificante. Es decir, los isómeros de nonilfenol se adsorben más rápidamente en el lodo nitrificante que en el lodo activado, pero este último tiene una capacidad de adsorción máxima superior. Estas características del lodo activado pudieron ejercer un efecto protector sobre la biomasa nitrificante al disminuir la concentración biodisponible de los isómeros de nonilfenol. El proceso de adsorción para los compuestos alteradores endocrinos es un fenómeno complejo que incluye factores el tamaño de la partícula, el contenido de sustancias exopoliméricas, las propiedades físico-químicas de la superficie de lodo o el tiempo de retención de sólidos (Stasinakis et al., 2010).

Conclusiones generales

V. Conclusiones generales.

En este trabajo se evaluó la remoción de isómeros de nonilfenol a través de dos mecanismos principales, la degradación y la adsorción. Para ello, se desarrolló una metodología analítica que permitiera cuantificar con un nivel de confianza aceptable la presencia de estos compuestos en el lodo. Las metodologías probadas, extracción con microondas y extracción con ultrasonido, presentaron porcentajes de recuperación similares y el análisis estadístico demostró que no existía diferencia significativa entre los resultados obtenidos con ellas. Por tanto, dada su practicidad se decidió emplear en este estudio, la extracción por ultrasonido como metodología para cuantificar la adsorción de isómeros de nonilfenol en el lodo.

Se evaluó la biodegradabilidad de los isómeros de nonilfenol empleando bacterias nitrificantes, biomasa adaptada a la degradación de 4-clorofenol y lodo activado. Los resultados obtenidos mostraron que los tres inóculos son capaces de biodegradar la mezcla técnica de nonilfenoles. La remoción se dio por dos mecanismos, la degradación y la adsorción. Sin embargo, en cada inóculo el mecanismo dominante de remoción fue diferente. Para el lodo activado, la remoción se debió principalmente por la adsorción de los isómeros en el lodo. Por el contrario, en el lodo nitrificante, la degradación fue el mecanismo imperante para obtener un alto porcentaje de remoción de los compuestos. En cuanto a la biomasa adaptada a la degradación de 4-clorofenol, los porcentajes de degradación y adsorción son similares por lo que no se observó un mecanismo de remoción predominante. Se concluyó que las bacterias nitrificantes son las más adecuadas para llevar a cabo la degradación del nonilfenol.

Se evaluó la biodegradación de los isómeros de nonilfenol en un reactor discontinuo de membrana sumergida empleando bacterias nitrificantes. Los resultados mostraron que el porcentaje de degradación de la mezcla técnica de isómeros de nonilfenol está directamente relacionado con la concentración inicial de nitrógeno amoniacal que se alimenta al sistema. Es decir, se observó que al disminuir en un orden de magnitud la concentración de N-NH_4^+ en el influente, el porcentaje de degradación disminuye en 9%, aproximadamente. Así mismo, se realizó la identificación preliminar de algunos intermediarios de la degradación de los isómeros de nonilfenol, sin embargo, se observó que esta degradación no es completa ya que se presentaron compuestos con la presencia de anillos aromáticos en su estructura. Durante la operación del sistema, se observó una disminución y probable inhibición de la actividad nitrito-oxidante en ambas etapas de operación del reactor. Al adicionar alitiourea, un inhibidor selectivo de la enzima amonio-monooxigenasa, se observó una disminución en el

consumo de los isómeros, lo que confirmaría que las bacterias amonio-oxidantes son las principales responsables del primer paso de biodegradación de los isómeros de nonilfenol, mientras que las bacterias heterótrofas presentes en el consorcio podrían jugar un papel en la subsecuente remoción de los intermediarios formados.

Al evaluar el efecto que la concentración de isómeros de nonilfenol tiene sobre la actividad nitrificante y nitrito-oxidante en enriquecimientos obtenidos a diferentes relaciones C/N, se observó que las condiciones de enriquecimiento influyen en la sensibilidad de las bacterias al contaminante. Los enriquecimientos obtenidos con una relación C/N igual que 1.7 mostraron un mayor porcentaje de inhibición en presencia de $1000 \mu\text{g tNP}\cdot\text{L}^{-1}$. En cuanto a la actividad nitrito-oxidante, sólo el enriquecimiento obtenido a una C/N igual que 5.0 presentó un porcentaje máximo de inhibición superior al 50%. La sucesiva exposición del enriquecimiento nitrificante 'C/N 1.7 USC' a bajas concentraciones de isómeros de nonilfenol incrementó el efecto inhibitorio inicial. Se sugiere que la presencia de organismos heterótrofos en el lodo nitrificante puede ejercer un importante papel para disminuir el efecto inhibitorio sobre la actividad nitrificante, lo que puede deberse a la capacidad de adsorción de los organismos heterótrofos.

Referencias

VI. Referencias

- Abeling, U. (1994) Nitrogen elimination from industrial wastewater denitrification via nitrite. *Inst. F. Water Mangem. Waste Technol.* Universidad de Hannover. 86.
- Adham, S., Gagliardo, P., Boulos, L., Oppenheimer, J. y Trussell, R. (2001) Feasibility of the membrane bioreactor process for water reclamation. *Water Sci. Technol.* 43(10): 203-209.
- Ahel, M. y Giger, W. (1993) Partitioning of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates between water and organic-solvents. *Chemosphere.* 26:1471–1478.
- Ahel, M., Giger, W. y Koch, M. (1994) Behavior of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment 1. Occurrence and transformation in sewage treatment. *Water Res.* 28:1131–42.
- Ajithkumar, B., Ajithkumar, V.P. y Iriye, R. (2003) Degradation of 4-amyphenol and 4-hexylphenol by a new activated sludge isolate *Pseudomonas veronii* and proposal for a new subspecies status. *Res. Microbiol.* 154:17-23.
- Amor, L., Eiroa, C., Kennes, C. y Veiga, M.C. (2005) Phenol biodegradation and its effect on the nitrification process. *Water Res.* 39: 2915-2920.
- Anthonisen, A.C., Loehr, R.C., Prakasam, T.B.S. y Srinath, E.G. (1976) Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *JWPCF* 48(5): 835-852.
- Aparicio, I., Santos, J.L. y Alonso, E. (2007) Simultaneous sonication-assisted extraction, and determination by gas chromatography-mass spectrometry, of di-(2-ethylhexyl)phthalate, nonylphenol, nonylphenol ethoxylates and polychlorinated biphenyls in sludge from wastewater treatment plants. *Anal. Chim. Acta* 584: 455-461.
- Arp, D.J., Sayavedra-Soto, L.A. y Hommes, N.G. (2002) Molecular biology and biochemistry of ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea*. *Arch. Microbiol.* 178: 250-255.
- Artola-Garicano, E., Borkent, I., Damen, K., Jager, T. y Vaes, W.H.J. (2003). Sorption kinetics and microbial biodegradation activity of hydrophobic chemicals in sewage sludge: model and measurements based of free concentrations. *Environ. Sci. Technol.* 37(1): 116-122.
- Azam, F., Gill, S., Farooq, S. y Lodhi, A. (2004) Effect of CO₂ on nitrification and immobilization of NH₄⁺-N. *Biol. Fertil. Soils* 40: 427-431.
- Ballesteros, O., Zafra, A., Navalón, A. y Vílchez J.L. (2006) Sensitive gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of phthalate esters, alkylphenols, bisphenol A and their chlorinated derivatives in wastewater samples. *J. Chromat. A* 1121:154-162.

- Barret M., Patureau, D., Latrille, E. y Carrere, H. (2010) A three-compartment model for Micropollutants sorption in sludge: Methodological approach and insights. *Water Res.* 44:616-624.
- Bédard, C. y Knowles, R. (1989) Physiology, biochemistry and specific inhibitors of CH₄, NH₄⁺ and CO oxidation by methanotrophs and nitrifiers. *Microbiol. Rev.* 53(1): 68-84.
- Belmont, M.A., Ikononou, M. y Metcalfe, C.D. (2006) Presence of nonylphenol ethoxylate surfactants in a watershed in central Mexico and removal from domestic sewage in a treatment wetland. *Environ. Toxicol.* 25(1): 29-35.
- Belser, L.W. (1984) Bicarbonate uptake by nitrifiers: Effects of growth rate, pH, substrate concentration, and metabolic inhibitors. *Appl. Environ. Microbiol.* 48(6): 1100-1104.
- Bernet, N. (2002) Microbial processes for biological nitrogen and phosphorus removal from wastewater. Apuntes del IV Curso Internacional de Microbiología Industrial. UAM-I
- Billen, G. (1976) A method for evaluating nitrifying activity in sediments by dark [¹⁴C]-bicarbonate incorporation. *Water Res.* 10: 51-57.
- Blackall, L.L. (2000) A summary of recent microbial discoveries in biological nutrient removal from wastewater. *Aust. Biotech.* 10(3): 29-31.
- Blom, A., Ekman, E., Johannisson, A., Norrgren, L., y Pesonen, M. (1998). Effects of xenoestrogenic environmental pollutants on the proliferation of a human breast cancer cell line (MCF-7). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 34: 306-310.
- Bock, E., Wilderer, P.A. y Freitag A. (1988) Growth of *Nitrobacter* in absence of dissolved oxygen. *Water Res.* 22(2): 245-250.
- Bock, E., Schmidt, I., Stuvén, R. y Zart, D. (1995) Nitrogen loss caused by denitrifying *Nitrosomonas* cells using ammonium or hydrogen as electron donors and nitrite as electron acceptor. *Arch. Microbiol.* 163: 16-20.
- Bodelier, P.L.E., Libochant, J.A., Blom C.W.P.M. y Laanbroek H.J. (1996) Dynamics of nitrification and denitrification in root-oxygenated sediments and adaptation of ammonia-oxidizing bacteria to low-oxygen or anoxic habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(11): 4100-4107.
- Brandt, K.K., Hesselsoe, M., Roslev, P., Henriksen, K. y Sorensen, J. (2001) Toxic effects of linear alkylbenzene sulfonate on metabolic activity, growth rate, and microcolony formation of *Nitrosomonas* and *Nitrosospira* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:2489-2498.
- Brindle, K. y Stephenson T. (1996) Mini-Review. The application of membrane biological reactors for the treatment of wastewaters. *Biotech. Bioeng.* 49: 601–610.
- Buitron, G., Soto, G., Vite, G. y Moreno, J. (2001) Strategies to enhance the biodegradation of toxic compounds using discontinuous process. *Water Sci. Technol.* 43(3): 283–290.

- Burgess, R.M., Pelletier, M.C., Gundersen, J.L., Perron, M.M. y Ryba, S.A. (2005) Effects of different forms of organic carbon on the partitioning and bioavailability of nonylphenol. *Environ. Toxicol. Chem.* 24(7): 1609-1617.
- Byrns, G. (2001) The fate of xenobiotic organic compounds in wastewater treatment plants. *Water Res.* 35(10): 2523-2533.
- Canales, A., Pareilleux, A, Rols, J. L., Goma, G. y Huyard, A. (1994) Decreased sludge production strategy for domestic wastewater treatment. *Water Sci. Technol.* 30(8): 97-106.
- Casajuana, N. y Lacorte, S. (2004) New methodology for the determination of phthalate esters, bisphenol A, bisphenol A diglycidyl ether, and nonylphenol in commercial whole milk samples. *J. Agric. Food Chem.* 57: 1307-1311.
- Cavret, S. y Feidt, C. (2005) Intestinal metabolism of PAH: in vitro demonstration and study of its impact of PAH transfer through the intestinal epithelium. *Environ. Res.* 98(1): 22-32.
- CEQG (2002) Canadian environmental quality guidelines for nonylphenol and its ethoxylates (water, sediment and soil. Reporte, Canada.
- Chaize, S. y Huyard, A. (1990) Membrane bioreactor on domestic wastewater treatment sludge production and modeling approach. *Water Sci. Technol.* 23: 1591-1600.
- Chang, I.S., Clech, P.L., Jefferson, B. y Judd, S. (2002) Membrane fouling in membrane bioreactor for wastewater treatment. *J. Environ. Eng.* 128(11): 1018-1029.
- Chang, B.V., Yu, C.H. y Yuan, S.Y. (2004) Degradation of nonylphenol by anaerobic microorganisms from river sediment. *Chemosphere* 55:493-500.
- Chang, B.V., Chiang, F. y Yuan, S.Y. (2005) Biodegradation of nonylphenol in sewage sludge. *Chemosphere* 60(11):1652-1659.
- Chang, B.V., Chiang, B.W. y Yuan, S.Y. (2007) Biodegradation of nonylphenols in soil. *Chemosphere* 66:1857-1862.
- Chang, B.V., Liu, C.L., Yuan, S.Y., Cheng, C.Y. y Ding, W.H. (2008) Biodegradation of nonylphenol in mangrove sediment. *Int. Biodet. Biodeg.* 61: 325-330.
- Chang, H.N., Moon, R.K., Park, B.G., Lim, S., Choi, D.W. y Lee, W.G. (2000) Simulation of SBR operation for simultaneous removal of nitrogen and phosphorus. *Bioprocess Eng.* 23: 513-21.
- Chávez, A., Maya, C., Gibson, R. y Jiménez, B. (2011) The removal of microorganism and organic micropollutants from wastewater during infiltration to aquifers after irrigation of farmland in the Tula Valley, Mexico. *Environ. Poll.* 159: 1354-1362.
- Chen, M.-L., Lee, H.-Y., Chuang, H.-Y., Guo, B.-R. y Mao, I.-F. (2009) Association between nonylphenol exposure and development of secondary sexual characteristics. *Chemosphere* 76: 927-931.
- Cicek, N. (2003) A review of membrane bio-reactors and their potential application in the treatment of agricultural wastewater. *Can. Biosyst. Eng.* 45(6): 37-49.

- Cicek, N., Macomber, J., Davel, J., Suidan, M.T., Audic, J. y Genestet, P. (2001) Effect of solids retention time on the performance and biological characteristics of a membrane bio-reactor. *Water Sci. Technol.* 43(11): 43-50.
- Cincinelli, A., Mandorlo, S., Dickhut, R.M. y Lepri, L. (2003) Particulate organic compounds in the atmosphere surrounding an industrialized area of Prato (Italy). *Atmos. Environ.* 37: 3125-3133.
- Cirja, M., Zühlke, S., Ivashechkin, P., Schäffer, A. y Corvini, P.F.X. (2006) Fate of a ¹⁴C-labeled nonylphenol isomer in a laboratory-scale membrane bioreactor. *Environ. Sci. Technol.* 40:6131-6136.
- Clara, M., Strenn, B., Gans, O., Martinez, E., Kreuzinger, N. y Kroiss, H. (2005a) Removal of selected pharmaceuticals, fragrances and endocrine disrupting compounds in a membrane bioreactor and conventional wastewater treatment plants. *Wat. Res.* 39: 4797-4807.
- Clara, M., Kreuzinger, N., Strenn, B., Gans, O. and Kroiss, H. (2005b) The solid retention time-a suitable design parameter to evaluate the capacity of wastewater treatment plants to remove micropollutants. *Wat. Res.* 39(1): 97-106.
- Commandeur, L.C.M. y parson, J.R. (1990) Degradation of halogenated aromatic compound. *Biodegradation* 1: 207-220.
- Cornel, P. y Krause, S. (2006) Membrane bio-reactors in industrial wastewater treatment-European experiences, examples and trends. *Water Sci. Technol.* 53(3): 37-44.
- Corvini, P.F., Meesters, R.J., Schaffer, A., Schroder, H.F., Vinken, R. y Hollender, J. (2004) Degradation of a nonylphenol single isomer by *Sphingomonas* sp. strain TTNP3 leads to a hydroxylation-induced migration product. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(11): 6897-6900.
- Corvini, P.F., Schaeffer, A. y Schlosser, D. (2006a) Microbial degradation of nonylphenol and other alkylphenols--our evolving view. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72(2): 223-243.
- Corvini, P.F., Hollender, J., Ji, R., Schumacher, S., Prell, J., Hommes, G., Priefer, U., Vinken, R. y Schaffer, A. (2006b) The degradation of alpha-quaternary nonylphenol isomers by *Sphingomonas* sp. strain TTNP3 involves a type II ipso-substitution mechanism. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70(1): 114-122.
- Crisp, T.M., Clegg, E.D., Cooper, R.L., Wood, W.P., Anderson, .D.G, Baetcke, K.P., Hoffman, J.L., Morrow, M.S., Rodier, D.J., Schaeffer, J.E., Tovart, L.W., Zeeman, M.G. y Patel, Y.M. (1998) Environmental endocrine disruption: an effect assessment and analysis. *Environ. Health Persp.* 106: 11-56.
- Currie, L.A. (1997) Detection: International update, and some emerging di-lemmas involving calibration, the blank, and multiple detection decisions. *Chem. Intel. Lab. Sys.* 37:151-181.

- Daims, H., Nielsen, P.H., Nielsen, J.L. Juretschko, S. y Wagner, M. (2000) Novel *Nitrospira*-like bacteria as dominant nitrite-oxidizers in biofilms from wastewater treatment plants: diversity and in situ physiology. *Water Sci. Technol.* 41(4-5): 85-90.
- Daims, H., Pursehold, U., Bjerrum, L., Arnold, E., Wilderer, P.A. y Wagner, M. (2001) Nitrification in sequencing biofilm batch reactor. *Water Sci. Technol.* 43(3):9–18.
- De Gussemé, B., Pycke, B., Hennebel, T., Marcoen, A., Vlaeminck, S.E., Noppe, H., Boon, N. y Verstraete, W. (2009) Biological removal of 17 α -ethinylestradiol by a nitrifier enrichment culture in a membrane bioreactor. *Wat. Res.* 43: 2493 – 2503.
- De Jager, C., Bornman, M.S. y Oosthuizen, J.M. (1999) The effect of p-nonylphenol on the fertility potential of male rats after gestational, lactational, and direct exposure. *Andrologia* 31: 107-113.
- De Weert, J., Viñas, M., Grotenhuis, T., Rijnaarts H. y Langenhoff, A. (2010) Aerobic nonylphenol degradation and nitro-nonylphenol formation by microbial cultures from sediments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86:761–771
- Delgadillo-Mirquez, L., Lardon, L., Steyer, J.-P. y Patureau, D. (2011) A new dynamic model for bioavailability and cometabolismo of micropollutants during anaerobic digestion. *Water Res.* 45: 4511-4521.
- Demirbas, E., Kobya, M., Sentruk, E. y Ozkan, T. (2004) Adsorption kinetics for the removal of chromium (VI) from aqueous solutions on the activated carbons prepared from agricultural wastes. *Water SA* 30:533-540.
- Denecke, M. y Liebig, T. (2003) Effect of carbon dioxide on nitrification rates. *Bioproc. Biosyst. Eng.* 25: 249-253.
- Di Gioia, D., Sciubba, L., Bertin, L., Barberio, C., Salvadori, L., Fassinetti, S. y Fava, F. (2009) Nonylphenol polyethoxilate degradation in aqueous waste by the use of batch and continuous biofilm bioreactors. *Water Res.* 43:2977-2988.
- Dokiankis, S.N., Kornaros, M. y Lyberatos, G. (2004) On the effect of pharmaceuticals on bacterial nitrite oxidation. *Wat. Sci. Technol.* 50(5): 341—346.
- Dokianakis, S.N., Kornaros, M. y Lyberatos, G. (2006) Impact of five selected xenobiotics on isolated ammonium oxidizers and on nitrifying activated sludge. *Environ. Toxicol.* 21: 310—316.
- EC (2003) Directive 2008/105/CE of the European Parliament and of the council of 16 December
- Ehlers, G.A. y Loibner, A.P. (2006) Linking organic pollutant (bio)availability with geosorbent properties and biomimetic methodology: A review of geosorbent characterization and (bio)availability prediction. *Environ. Pollut.* 141(3): 494-512.
- Fawell, J.K., Sheahan, D., James, H.A., Hurst, M. y Scott, S. (2001) Oestrogens and oestrogenic activity in raw and treated water in Severn Trent Water. *Water Res.* 35(5): 1240-1244.

- Fernandes, A.R., Rose, M. y Charlton, C. (2008) 4-Nonylphenol (NP) in food-contact materials: analytical methodology and occurrence. *Food Addit. Contam.* 25: 364-372.
- Ferrara, F., Fabietti, F., Delise, M. y Funari, E. (2005) Alkylphenols and alkylphenols ethoxylates contamination of crustaceans and fishes from the Adriatic Sea (Italy). *Chemosphere* 59: 1145-1150.
- Forrez, I., Carballa, M., Boon, N. y Verstraete, W. (2008) Biological removal of 17 β -ethinylestradiol (EE2) in an aerated nitrifying fixed bed reactor during ammonium starvation. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 84: 119 – 125.
- Fountoulakis, M., Drillia, P., Pakou, C., Kampioti, A., Stamatelatos, K. y Lyberatos, G. (2005) Analysis of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates in sewage sludge by high performance liquid chromatography following microwave-assisted extraction. *J. Chromatogr. A* 1089:45-51.
- Fujii, K., Urano, N., Ushio, H., Satomi, M. y Kimura, S. (2001) *Sphingomonas cloacae* sp. nov., a nonylphenol-degrading bacterium isolated from wastewater of a sewage-treatment plant in Tokyo. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51(Pt 2): 603-610.
- Gabriel, F.L., Giger, W., Guenther, K. y Kohler, H.P. (2005a) Differential degradation of nonylphenol isomers by *Sphingomonas xenophaga* Bayram. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(3): 1123-1129.
- Gabriel, F.L.P., Heidlberger, A., Rentsch, D., Giger, W., Guenther, K. y Kohler, H.-P. (2005b) A novel metabolic pathway for degradation of 4-nonylphenol environmental contaminants by *Sphingomonas xenophaga* Bayram. *Ipsso-Hydroxylation and intramolecular rearrangement.* *J. Biol. Chem.* 280: 15526 – 15533.
- Gabriel, F.L.P., Routledge, E.J., Heidlberger, A., Rentsch, D., Guenther, K., Giger, W., Sumpter, J.P. y Kohler, H.-P.E. (2008) Isomer-specific degradation and endocrine disrupting activity of nonylphenols. *Environ. Sci. Technol.* 42: 6399 – 6408.
- Gatidou, G., Thomaidis, N.S., Stasinakis, A.S. y Lekkas, T.D. (2007) Simultaneous determination of the endocrine disrupting compounds nonylphenol, nonylphenol ethoxylates, triclosan and bisphenol A in wastewater and sewage sludge by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1138:32-41.
- Gibson, R., Becerril-Bravo, E., Silva-Castro, V. y Jiménez, B. (2007) Determination of acidic pharmaceuticals and potential endocrine disrupting compounds in wastewaters and spring waters by selective elution and analysis by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1169:31-39.
- Giger, W., Brunner, P.H. y Schaffner, C. (1984) 4-Nonylphenol in sewage sludge: Accumulation of toxic metabolites from non-ionic surfactants. *Science* 225:623-625.
- Gonzalez, S., Petrovic, M. y Barceló, D. (2007) Removal of a broad range of surfactants from municipal wastewater – Comparison between membrane bioreactor and conventional activated sludge treatment. *Chemosphere* 67: 335—343.

- Groeneweg, J., Sellner, B. y Tappe, W. (1994) Ammonia oxidation in *Nitrosomonas* at NH_3 concentrations near K_m : Effects of pH and temperature. *Water Res.* 28: 2561-2566.
- Guenther, K., Heinke, V., Thiele, B., Kleist, E., Prast, H. y Raecker, T. (2002) Endocrine disrupting nonylphenols are ubiquitous in food. *Environ. Sci. Technol.* 36:1676-1680.
- Hale, R.C., Smith, C.L., de Fur, P.O., Harvey, E. y Bush, E.O. (2000) Nonylphenols in sediments and effluents associated with diverse wastewater outfalls. *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 946–52.
- Hall, S.J., Keller, J. y Blackall, L.L. (2003) Microbial quantification in activated sludge: The hits and misses. *Water Sci. Technol.* 48(3): 121-126.
- Hao, R., Li, J., Zhou, Y., Cheng, S. y Zhang, Y. (2009) Structure-biodegradability relationship of nonylphenols isomers during biological wastewater treatment process. *Chemosphere* 75: 987-994.
- Head, I.M., Hiorns, W.D., Embley, T.M., McCarthy, A.J., y Saunders, J.R. (1993) The phylogeny of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria as determined by analysis of 16S ribosomal RNA gene sequences. *J. Gen. Microbiol.* 139: 1147-1153.
- Heindel, J.J. y vomSaal, F.S. (2009) Role of nutrition and environmental endocrine disrupting chemicals during the perinatal period on the etiology of obesity. *Mol. Cell. Endocrinol.* 304(1-2): 90-96.
- Hellinga, C., van Loosdrecht, M.C.M. y Heijnen, J.J. (1999) Model based design of a novel process for nitrogen removal from concentrated flows. *Math Comput. Modelling Dyn. Syst.* 5(4): 351-371.
- Henze, M., Grady Jr., C.P.L., Gujer, W., Marais, G.V.R. y Matsuo, T. (1987) Activated sludge model No. 1. *IAWQ Sci. Techn. Reports* 1.
- Hockenbury, M.R. y Grady, G.P.L. (1977) Inhibition of nitrification – effects of selected organic compounds. *J. Water Poll. Control Fed.* 49: 768-777.
- Hooper, A. B., Vannelli, T., Bergmann, D.J. y Arciero, D.M. (1997) Enzymology of the oxidation of ammonia to nitrite by bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 71: 59 – 67.
- Horvath, R.S. (1972) Microbial co-metabolism and the degradation of organic compounds in nature. *Bacteriol. Rev.* 36(2): 146-155.
- Hou, S.-G., Sun, H.-W. y Gao, Y. (2006) Sorption of small metabolites of nonylphenol polyethoxylates in single and complex systems on aquatic suspended particulate matter. *Chemosphere* 63:31-38.
- Hung, N.V., Tateda, M., Ike, M., Fujita, M., Tsunoi, S. y Tanaka, M. (2004) Sorption of biodegradation end products of nonylphenol polyethoxylates onto activated sludge. *J. Environ. Sci.* 16(4): 564-569.
- Hyman, M.R., Murton, I.B. y Arp, D.J. (1988) Interaction of ammonia monooxygenase from *Nitrosomonas europaea* with alkanes, alkenes, and alkynes. *Appl Environ Microbiol* 54:3187–3190

- Ieda, T., Horii, Y., Petrick, G., Yamashita, N., Ochiai, N. y Kannan, K. (2005) Analysis of nonylphenol isomers in a technical mixture and in water by comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry. *Environ. Sci. Technol.* 39: 7202-7207.
- Ilani, T., Schulz, E. y Chefetz, B. (2005) Interactions of organic compounds with wastewater dissolved organic matter: Role of hydrophobic fractions. *Environ. Qual.* 34(2): 552-562.
- Isobe, T., Nishiyama, H., Nakashima, A. y Takada, H. (2001) Distribution and behavior of nonylphenol, octylphenol and nonylphenol monoethoxylate in Tokyo metropolitan area: their association with aquatic particles and sedimentary distributions. *Environ. Sci. Technol.* 35:1041-1049.
- Jacobs, N.J., van Zoeren-Grobben, D., Drejer, G.F., Bindels, J.G. y Berger, H.M. (1996) Influence of long chain unsaturated fatty acids in formula feeds on lipid peroxidation and antioxidants in preterm infants. *Pediatr. Res.* 40: 680-686.
- Jacobsen, B.N., Nyholm, N., Pedersen, B.M., Poulsen, O. y Ostfeldt, P. (1993) Removal of organic micropollutants in laboratory activated sludge reactors under various operating conditions: sorption. *Water Res.* 27(10): 1505-1510.
- Jensen, T.K., Toppari, J., Keiding, N. y Skakkebaek, N.E. (1995) Do environmental oestrogens contribute to the decline in male reproductive health? *Clin. Chem.* 41/42: 1896-1901.
- Jobling, S., Sheahan, D., Osborne, J.A., Matthiessen, P. y Sumpter, J.P. (1996) Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.* 15:194-202.
- John, D.M., Alan House, M. y White, G.F. (2000) Environmental fate of nonylphenol ethoxylates: differential adsorption of homolog to components of river sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* 19(2): 293-300.
- Johnson, A.C., Aerni, H.R., Gerritsen, A., Gibert, M., Giger, W., Hylland, K., Jurgens, M., Nakari, T., Pickering, A., Suter, M.J., Svenson, A. y Wettstein, F.E. (2005) Comparing steroid estrogen, and nonylphenol content across a range of European sewage plants with different treatment and management practices. *Water Res.* 39(1): 47-58.
- Joss, A., Zabczynski, S., Gobel, A., Hoffman, B., Loffler, D., McArdell, C.S., Ternes, T.A., Thomsen, A. y Siegrist, H. (2006) Biological degradation of pharmaceuticals in municipal wastewater treatment: Proposing a classification scheme. *Water Res.* 40:1686-1696.
- Judd, S. (2008) The status of membrane bioreactor technology. *Trends Biotech.* 26(2): 109-116.
- Juretschko, S., Timmermann, G., Schmid, M., Schleifer, K.-H., Pommerening-Röser, A., Koops, H.-P. y Wagner, M. (1998) combined molecular and conventional analyses of

- nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(8): 3042-3051.
- Katase, T., Okuda, K., Kim, Y.-S., Eun, H., Takada, H., Uchiyama, T., Saito, H., Makino, M. y Fujimoto, Y. (2008) Estrogen equivalent concentration of 13 branched *para*-nonylphenols in three technical mixtures by isomer-specific determination using their synthetic standards in SIM mode with GC-MS and two new diastereomeric isomers. *Chemosphere* 70:1961-1972.
- Keener, W.K. y Arp, D.J. (1994) Transformation of aromatic compounds by *Nitrosomonas europaea*. *Appl Environ Microbiol* 60:1914–1920
- Kelly, D.P. (1978) Bioenergetics of chemolithotrophic bacteria. Bull A.T. y Meadow P.M. (Eds) Companion to Microbiology, pp. 363-386. Longman, Londres.
- Kim, Y.S., Katase, T., et al., (2004) Variation in estrogenic activity among fractions of a commercial nonylphenols by high performance liquid chromatography. *Chemosphere* 54: 1127-1134.
- Kim, D.J., Kim, T.K., Choi, E.J., Park, W.C., Kim, T.H., Ahn, D.H., Yuan, Z., Blackall, L. y Keller, J. (2004b) Fluorescence in situ hybridization analysis of nitrifiers in piggery wastewater treatment reactors. *Water Sci. Technol.* 49(5-6): 333-340.
- Kim, J.Y., Ryu, K., Kim, E.J., Choe, W.S., Cha, G.C. y Yoo, I.-K. (2007) Degradation of bisphenol A and nonylphenol by nitrifying activated sludge. *Process Biochem* 42:1470-1474
- Kleiner, D. (1985) Bacterial ammonium transport. *FEMS Microbiol. Rev.* 38: 87-100.
- Kleywegt, S., Smyth, S.-A., Parrott, J., Schaefer, K., Lagacé, E., Payne, M., et al., (2007). Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Canadian Environment: Research and Policy Directions. Canada: Minister of Public Works and Government Services Canada.
- Kloepfer, A., Gnirss, R., Jekel, M. y Reemtsma, T. (2004) Occurrence of benzothiazoles in municipal wastewater and their fate in biological treatment. *Water Sci. Technol.* 50(5): 203-208.
- Koppe, J.G., Pluim, H.J., Olie, K. y van Wijnen, J. (1991) Breast milk, dioxins and the possible effects on the health of newborn infants. *Sci. Total Environ.* 106: 33-41.
- Kowalchuk, G.A. y Stephen, J.R. (2001) Ammonia-oxidizing bacteria: A model for molecular microbial ecology. *Annu. Rev. Microbiol.* 55: 485-529.
- Kraigher, B., Kosjek, T., Heath, E., Kompare, B. y Mandic-Mulec, I. (2008) Influence of pharmaceutical residues on the structure of activated sludge bacterial communities in wastewater treatment bioreactors. *Wat. Res.* 42: 4578—4588.
- Kreuzinger, N., Clara, M., Strenn, B. y Kroiss, H. (2004) Relevance of the sludge retention time (SRT) as design criteria for wastewater treatment plants for the removal of

- endocrine disruptors and pharmaceuticals from wastewater. *Water Sci. Technol.* 50(5):149—156.
- Laanbroek, H.J. y Woldendorp, J.W. (1995) Activity of chemolithotrophic nitrifying bacteria under stress in natural soils. *Adv. Microb. Ecol.* 14:273-304
- Lalah, J.O., Schramm, K.-W., Henkelmann, B., Lenoir, D., Behechti, A., Günther, K. y Kettrup, A. (2003) The dissipation, distribution and fate of a branched ¹⁴C-nonylphenol isomer in lake water/sediment systems. *Environ. Pollut.* 122: 195-203.
- Langford, K.H., Scrimshaw, M.D., Birkett, J.W. y Lester, J.N. (2005) Degradation of nonylphenolic surfactants in activated sludge batch test. *Water Res.* 39: 870 – 876.
- Lashermes, G., Houot, S. y Barriuso, E. (2010) Sorption and mineralization of organic pollutants during different stages of composting. *Chemosphere* 79: 455-462.
- Lavado, R., Thibaut, R., Raldua, D., Martin, R. y Porte, C. (2004) First evidence of endocrine disruption in feral carp from the Ebro River. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 196: 247-257.
- Lee, J., Ahn, W.-Y. y Lee, C.-H. (2001) Comparison of the filtration characteristics between attached and suspended growth microorganisms in submerged membrane bioreactor. *Water Res.* 35(10): 2435-2445.
- Lee, J., Lee, B.C., Ra, J.S., Cho, J., Kim, I.S., Chang, N.I., Kim, H.K. y Kim, S.D. (2008) Comparison of the removal efficiency of endocrine disrupting compounds in pilot scale sewage treatment processes. *Chemosphere* 71:1582-1592.
- Lesjean, B., Rosenberg, S., Laabs, C., Jekel, M., Gnirss, R. y Amy, G. (2004) Correlation between membrane fouling and soluble/colloidal organic substances in membrane bioreactors for municipal wastewater treatment. *Memories work.* Korea Seul 2004.
- Liao, B.Q., Allen, D.G., Droppo, I.G., Leppard, G.G. y Liss, S.N. (2001) Surface properties of sludge and their role in bioflocculation and settleability. *Water Res.* 35: 339-350.
- Liao, B., Bagley, D.M., Kraemer, H.E., Leppard, G.G. y Liss, S.N. (2004) A review of biofouling and its control in membrane separation bioreactors. *Water Environ. Res.* 76(5): 425-436.
- Lin, W.-C., Wang, S.-L., Cheng, C.-Y. y Ding, W.-H. (2009) Determination of alkylphenol residues in breast and commercial milk by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chem.* 114: 753-757.
- Long, G. L. y Winefordner, J.D. (1983) Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition. *Analyt. Chem.* 55(7): 712-724.
- Lu, Y.Y., Chen, M.L., Sung, F.C., Wang, P.S. y Mao, I.F. (2007) Daily intake of 4-nonylphenol in Taiwanese. *Environ. Int.* 33: 903-910.
- Lunden, A. y Noren, K. (1998) Polychlorinated naphthalenes and other organochlorine contaminants in Swedish human milk, 1972-1992. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 34: 414-423.

- Mauret M., Paul, E., Puech-Costes, E., Maurette, M.T. y Baptiste, P. (1996) Application of experimental research methodology to the study of nitrification in mixed culture. *Wat. Sci. Tech.* 34(1): 245-252.
- McNeal, T.P., Biles, J.E., Begley, T.H., Craun, J.C., Hooper, M.L. y Sack, C.A. (2000) Determination of suspected endocrine disruptors in foods and food packaging. In: McNeal, T.P., Biles, J.E., Begley, T.H., Craun, J.C., Hooper, M.L. and Sack, C.A. EDITORS. Analysis of environmental endocrine disruptors, 747. Washington, D.C.: American Chemical Society, pp. 33-52.
- Metcalf y Eddy, I. (2003) Wastewater Engineering: Treatment and Reuse. New York, NY. McGraw-Hill.
- Moeder, M., Martin, C., Schlosser, D., Harynyuk, J. y Górecki, T. (2006) Separation of technical 4-nonylphenols and their biodegradation products by comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatog. A* 1107: 233-239.
- Moffat, G., Burns, A., Van Miller, J., Joiner, R., y Ashby, J. (2001). Glucoronidation of nonylphenol and octylphenol eliminates their ability to activate transcription via the estrogen receptor. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 34: 182-187.
- Molina, D.M., Pérez, J. y Buitrón, G. (2008) Occurrence and removal of nonylphenols and 4-n-nonylphenol in four wastewater treatment plants in Mexico City. Memorias de Congreso "1st IWA Mexico National Young Water Professionals Conference". Abril 9 - 11.
- Müller, S., Schmid, P. y Schlatter C. (1998) Pharmacokinetic behavior of 4-nonylphenol in humans. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 5: 257 – 265.
- Nagao, T., Saito, Y., Usumi, K., Nakagomi, M., Yoshimura, S. y Ono, H. (2000) Disruption of the reproductive system and reproductive performance by administration of nonylphenols to newborn rats. *Human Experim. Toxicol.* 19(5): 284-296.
- Nagao, T., Wada, J., Maruno, H., Yoshimura, S. y Ono, H. (2001). Reproductive effects of nonylphenols in rats after gavage administration: a two-generation study. *Reprod. Toxicol.* 15: 293-315.
- Nakada, N., Tanishima, T., Shinohara, H., Kiri, K. y Takada, H. (2006) Pharmaceutical chemicals and endocrine disruptors in municipal wastewater in Tokyo and their removal during activated sludge treatment. *Water Res.* 40(17): 3297-3303.
- NEIWPCC (2005) Sequencing Batch Reactor. Design and operational considerations. Manual. Estados Unidos.
- Ognier, S., Wisniewski, C. y Grasmick A. (2004) Membrane bioreactor fouling in sub-critical filtration conditions: a local critical flux concept. *J. Memb. Sci.* 229:171-177.

- Petrovic, M., Sole, M., de Alda, M.J.L. y Barceló, D. (2002) Endocrine disruptors in sewage treatment plants, receiving river waters, and sediments: integration of chemical analysis and biological effects on feral carp. *Environ. Toxicol. Chem.* 21: 2146-2156.
- Philips, S., Laanbroek, H.J. y Verstraete, W. (2002) Origin, causes and effects of increased nitrite concentrations in aquatic environments. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 1: 115-141.
- Pluim, H.J., Boersma, E.R., Kramer, I., Olie, K., van der Slikke, J.W. y Koppe, J.G. (1994) Influence of short-term dietary measures on dioxin concentrations in human milk. *Environ. Health Perspect.* 102: 968-971.
- Pochana, L., Kellen, J. y Lant, P. (1999) Model development for simultaneous nitrification and denitrification. *Water Sci. Technol.* 39(1): 235-243.
- Porter, A.W. y Hay, A.G. Identification of *odpA*, a gene involved in biodegradation of the endocrine disrupter octylphenol. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 7373 – 7379.
- Poth, M. (1986) Dinitrogen production from nitrite by a *Nitrosomonas* isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* 52(4): 957-959.
- Preuss, T., Gehrhardt, J., Schirmer, K., Coors, A., Rubach, M., Russ, A., et al., (2006). Nonylphenol isomers differ in estrogenic activity. *Environ. Sci. Technol.* 40: 5147-5153.
- Rajaguru, P., Kalaiselvi, K., Palanivel, M. y Subburam, V. (2000) Biodegradation of azo dyes in sequential anaerobic-aerobic systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54: 268-73.
- Reichlin, F. y Kohler, H.P. (1994) *Pseudomonas* sp. Strain HBP1 Prp degrades 2-isopropylphenol (ortho-cumenol) via *meta* cleavage. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:4587-4591.
- Rittman, B.E. y McCarty, P.L. (2001) Environmental Biotechnology: Principles and applications. New York, NY, McGraw-Hill companies, Inc.
- Routledge, E., y Sumpter, J. (1997). Structural features of alkylphenolic chemicals associated with estrogenic activity. *J. Biol. Chem.* 272: 3280-3288.
- Sabik, H., Gagne, F., Blaise, C., Marcogliese, D.J. y Jeannot, R. (2003) Occurrence of alkylphenol polyethoxylates in the St. Lawrence River and their concentration by mussels (*Elliptio complanata*). *Chemosphere* 51:349-356
- Schmidt, I., Sliemers, O., Schmid, M., Bock, E., Fuerst, J., Kuenen, J.G., Jetten, M.S.M. y Strous, M. (2003) New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater. *FEMS Microbio. Rev.* 27: 481-492.
- Schmutzler, C., Hamann, I., Hofmann, P.J., Kovacs, G., Stemmler, L., Mentrup, B., Schomburg, L., Ambrugger, P., Grüters, A., Seidlova-Wuttke, D., Jarry, H., Wuttke, W. y Köhrle, J. (2004) Endocrine active compounds affect thyrotropin and thyroid hormone levels in serum as well as endpoints of thyroid hormone action in liver, heart and kidney. *Toxicology* 205: 95-102.

- Schramm, A., De Beer, D., Wagner, M. y Amann, R. (1998) Identification and activities in situ of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. as dominant populations in a nitrifying fluidized bed reactor. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(9): 3480-3485.
- Seigrist, H., Joss, A., Alder, A., McArdell-Burgisser, C., Goebel, A. y Keller E. (2004) Micropollutants – new challenge in wastewater disposal? *EAWAG News* 57: 7-10.
- Semple, K.T., Morris, A.W.J. y Paton, G.I. (2003) Bioavailability of hydrophobic organic contaminants in soils: Fundamental concepts and techniques for analysis. *Eur. J. Soil Sci.* 54: 809-818.
- Servos, M. (1999). Review of the aquatic toxicity, estrogenic responses and bioaccumulation of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates. *Water Qual. Res. J. Can.* 34 (1): 123-177.
- Shao, B., Hu, J. y Yang, M. (2003) Nonylphenol ethoxylates and their biodegradation intermediates in water and sludge of a sewage treatment plant. *Environ. Contam. Toxicol.* 70: 527 – 532.
- Sharma, B. y Ahlert, R.C. (1977) Nitrification and nitrogen removal. *Water Res.* 11: 897-925.
- Shi, J., Fujisawa, S., Nakai, S. y Hosomi, M. (2004) Biodegradation of natural and synthetic estrogens by nitrifying activated sludge and ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Water Res.* 38:2323–2330.
- Skotnicka-Pitak, J., Khunjar, W.O., Love, N.G. y Aga, D.S. (2009) Characterization of metabolites formed during the biotransformation of 17 α -ethinylestradiol by *Nitrosomonas europaea* in batch and continuous flow bioreactors. *Environ. Sci. Technol.* 43: 3549 – 3555.
- Soares, A., Guieysse, B., Delgado, O. y Mattiasson, B. (2003) Aerobic biodegradation of nonylphenol by cold-adapted bacteria. *Biotechnol Letters* 25:731–738
- Soares, A., Murto, M., Guieysse, B. y Mattiasson, B. (2006) Biodegradation of nonylphenol in a continuous bioreactor at low temperatures and effects on the microbial population. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69:597—606.
- Sohoni, P. y Sumpster, J. (1998). Several environmental oestrogens are also anti-androgens. *J. Endocrinol.* 158: 327-339.
- Soto, A.M., Justicia, H., Wray, J.W. y Sonnenschein, C. (1991) *p*-Nonylphenol: an estrogenic xenobiotic released from “modified” polystyrene. *Environ. Health Persp.* 92:167–173.
- Stangroom, S.J., Collins, C.D. y Lester, J.N. (2000) Abiotic behavior of organic micropollutants in soils and the aquatic environment. A review: 2 transformations. *Environ. Technol.* 21: 865-882.
- Staples, C.A., Williams, J.B., Blessing, R.L. y Varineau, P.T. (1999) Measuring the biodegradability of nonylphenol ether carboxylates, octylphenol ether carboxylates and nonylphenol. *Chemosphere* 38: 2029-2039.

- Stasinakis, A.S., Mamais, D., Thomaidis, N.S., Danika, E., Gatidou, G. y Lekkas, T.D. (2008a) Inhibitory effect of triclosan and nonylphenol on respiration rates and ammonia removal in activated sludge systems. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 70:199-206.
- Stasinakis, A.S., Petalas, A.V., Mamais, D. y Thomaidis, N.S. (2008b) Application of the OECD 301F respirometric test for the biodegradability assessment of various potential endocrine disrupting chemicals. *Bioresour. Technol.* 99: 3458-3467.
- Stasinakis, A.S., Kordoutis, C.I., Tsiouma, V.C., Gatidou, G. y Thomaidis, N.S. (2010) Removal of selected endocrine disrupters in activated sludge systems: Effect of sludge retention time on their sorption and biodegradation. *Bioresour. Technol.* 101:2090-2095.
- Stein, L.Y., Arp, D.J. y Hyman, M.R. (1997) Regulation of the synthesis and activity of ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea* by altering pH to affect NH₃ availability. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(11): 4588-4592.
- Stenstrom, M.K., Cardinal, L. y Libra, L. (1989) Treatment of hazardous substances in wastewater treatment plants. *Environ. Progr.* 8(2): 107-112.
- Suárez-Ojeda, M.E., Guisasola, A. y Carrera, J. (2010) Inhibitory impact of quinone-like compounds over partial nitrification. *Chemosphere* 80:474-480.
- Suzuki, I., Kwok, S.C. y Dular, U. (1974) Ammonia or ammonium ion as substrate for oxidation by *Nitrosomonas europaea* cells and extracts. *J. Bacteriol.* 120: 556-558.
- Tabata, A., Kashiwada, S., Ohnishi, Y., Ishikawa, H., Miyamoto, N., Itoh, M, et al., (2001) Estrogenic influences of estradiol-17 beta, *p*-nonylphenol and bis-phenol-A on Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) at detected environmental concentrations. *Water Sci. Technol.* 43: 109-116.
- Tabira, Y., Nakai, M., Asai, D., Yakabe, Y., Tahara, Y., Shinmyozu, T., et al., (1999). Structural requirements of para-alkylphenols to bind to estrogen receptor. *Eur. J. Biochem.* 262: 240-245.
- Takeo, M., Prabu, S.K., Kitamura, C., Hirai, M., Takahashi, H., Kato, D. y Negoro, S. (2006) Characterization of alkylphenol degradation gene cluster in *Pseudomonas putida* MT4 and evidence of oxidation of alkylphenols and alkylcatechols with medium-length alkyl chain. *J. Biosci. Bioeng.* 102(4):352—361.
- Tang, N.H., Blum, D.J.W., Nirmalakhandan, N. y Speece, R.E. (1992) QSAR parameters for toxicity of organic chemicals to *Nitrobacter*. *J. Environ. Eng. – ASCE* 118(1): 17-37.
- Tanghe, T., Dhooge, W. y Verstraete, W. (1999) Isolation of a bacterial strain able to degrade branched nonylphenol. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(2): 746-751.
- Telscher, M.J.H., Schuller, U., Schmidt, B. y Schäffer, A. (2005) Occurrence of a nitro metabolite of a defined nonylphenol isomer in soil/sewage sludge mixtures. *Environ Sci Technol* 39:7896–7900.

- ter Laak, T.L., Durjava, M., Struijs, J. y Hermens, J.L. (2005) Solid phase dosing and sampling technique to determine partition coefficients of hydrophobic chemicals in complex matrixes. *Environ. Sci. Technol.* 39(10): 3736-3742.
- Terzic, S., Matosic, M., Ahel, M. y Mijatovic, I. (2005) Elimination of aromatic surfactants from municipal wastewaters: comparison of conventional activated sludge treatment and membrane biological reactor. *Water Sci. Technol.* 51 (8): 447-453.
- Ternes, T.A., Joss, A. y Siegrist, H. (2004) Scrutinizing pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment. *Environ. Sci. Technol.* 38: 392-399.
- Terzic, S., Matosic, M., Ahel, M. y Mijatovic, I. (2005) Elimination of aromatic surfactants from municipal wastewaters: comparison of conventional activated sludge treatment and membrane biological reactor. *Water Sci. Technol.* 51 (8): 447-453.
- Tilson, H.A. y Kodavanti, P.R. (1997) Neurochemical effects of polychlorinated biphenyls: an overview and identification of research need. *Neurotoxicology.* 18: 727-743.
- Toyo'Oka, T. y Oshige, Y. (2000) Determination of alkylphenols in mineral water contained in PET bottles by liquid chromatography with colorimetric detection. *Anal. Sci.* 16: 1071-1076.
- Trussell, R.S., Adham, S. y Trussell, R.R. (2005) Process limits of municipal wastewater treatment with the submerged membrane bio-reactor. *J. Environ. Eng.* 410-416.
- Tuan, N.N., Hsieh, H.C., Lin, Y.W. y Huang, S.L. (2011) Analysis of bacterial degradation pathways for long-chain alkylphenols involving phenol hydroxylase, alkylphenol monooxygenase and catechol dioxygenase genes. *Bioresour. Technol.* 102: 4232-4240.
- USEPA. (1995) Bioventing principles and practice. Volume I: Bioventing Principles. Manual. Washington, D.C. USEPA.
- USEPA. (1997) Special report on environmental endocrine disruption: An effects assessment and analysis. Washington, D.C.: USEPA.
- USEPA. (2005) Ambient Aquatic Life Water Quality Criteria-Nonylphenol Final. Reporte final, Washington, D.C.: Office of Water, Office of Science and Technology.
- USEPA (2008) Bi-National framework for identifying substances of potential threat to the great lakes basin, test case: Nonylphenol and its ethoxylates (NPEs). Reporte preliminar, Washington, D.C.
- USEPA (2009a) Exposure factors handbook. Reporte, Washington, D.C.
- USEPA (2009b) Screening-level hazard characterization. Alkylphenols category. Reporte, Washington, D.C.
- Van der Meer, J.R. (2006) Environmental pollution promotes selection of microbial degradation pathways. *Front. Ecol. Environ.* 4(1): 35-42.
- Van Ginkel, C.G. (1996) Complete degradation of xenobiotic surfactants by consortia of aerobic microorganisms. *Biodegradation* 7:151-164.

- Van Loosdrecht, M.C.M. y Jetten, M.S.M. (1998) Microbiological conversions in nitrogen removal. *Water Sci. Technol.* 38(1): 1-7.
- Vazquez-Duhalt, R., Marquez-Rocha, F., Ponce, E., Licea, A.F. y Viana, M.T. (2006) Nonylphenol, an integrated vision of a pollutant. Scientific review. *Appl. Ecol. Environ. Res.* 4: 1-25.
- Venkata Mohan, S., Chandrashekhara, R., Krishna Prasad, K., Madhavi, B.T.V. y Sharma, P.N. (2005) Treatment of complex chemical wastewater in a sequencing batch reactor (SBR) with an aerobic suspended growth configuration. *Process Biochem.* 40: 1501 – 1508.
- Viggiani, A., Olivieri, G., Siani, L., Di Donato, A., Marzocchella, A., Salatino, P., Barbieri, P. y Galli, E. (2006) An airlift biofilm reactor for the biodegradation of phenol by *Pseudomonas stutzeri* OX1. *J. Biotechnol.* 123:464—477.
- Vikelsee, J., Thomsen, M. y Carlsen, L. (2002) Phthalates and nonylphenols in profiles of differently dressed soils. *Sci Total Environ* 296:105–116
- Volkering, F., Breure, A.M. y Rulkens, W.H. (1998) Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation. *Biodegradation* 8:401–417.
- Wagner, M., Rath, G., Koops, H.P., Flood, J. y Ammann, R. (1996) In situ analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants. *Water Sci. Technol.* 34(1-2): 237-244.
- Watanabe, H., Suzuki, A., Goto, M., Lubahn, D.B., Handa, H. y Iguchi, T. (2004) Tissue-specific estrogenic and non-estrogenic effects of a xenoestrogen, nonylphenols. *J. Mol. Endocrinol.* 33: 243-252.
- Wheeler, T.F., Heim, J.R., La Torre, M.R. y Janes, A.B. (1997) Mass spectral characterization of p-nonylphenol isomers using high-resolution capillary GC-MS. *J. Chromatogr. Sci.* 35:19-30.
- White, R., Jobling, S., Hoare, S.A., Sumpter, J.P. y Parker, M.G. (1994) Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology* 135: 175–182.
- Whittaker, M., Bergmann, D., Arciero, D. y Hooper, A.B. (2000) Electron transfer during the oxidation of ammonia by the chemolithotrophic bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Biochim. Biophys. Acta* 1459: 346-355.
- Wiesmann, U. (1994) Biological removal from wastewater. *Adv. Biochem. Eng.* 51:113-154.
- Wintgens, T., Gallenkemper, M. y Melin, T. (2002) Endocrine disrupters removal from wastewater using membrane bioreactor and nanofiltration technology. *Desalination.* 146: 387-391
- Wintgens, T., Gallenkemper, M. y Mellin, T. (2004) Removal of endocrine disrupting compounds with membrane processes in wastewater treatment and reuse. *Wat. Sci. Technol.* 50(5): 1 – 8.
- Wood, P.M. (1986) Nitrification as a bacterial energy source. Prosser J.I. (Ed) Nitrification, pp. 39-62. IRL Press. Oxford, Reino Unido.

- Yang, L. y Alleman, J.E. (1992) Investigation of batchwise nitrite build-up by an enriched nitrification culture. *Wat. Sci. Tech.* 26(5-6): 997-1005.
- Yi, T. y Harper Jr., W.F. (2007) The link between nitrification and biotransformation of 17 α -ethinylestradiol. *Environ. Sci. Technol.* 41: 4311 – 4316.
- Ying, G.-G., Williams, B. y Kookana, R. (2002) Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates – a review. *Environ. Int.* 28: 215–226.
- Yoon, Y., Westerhoff, P., Yoon, J. y Snyder, S.A. (2004) Removal of 17 β -estradiol and fluoranthrene by nanofiltration and ultrafiltration. *J. Environ. Eng.* 130(12): 1460-1467.
- Yu, Z. y Huang, W. (2005) Competitive sorption between 17 α -ethinylestradiol and naphthalene/phenanthrene by sediments. *Environ. Sci. Technol.* 39: 4878-4885.
- Yuan, S.Y., Yu, C.H. y Chang, B.V. (2004) Biodegradation of nonylphenol in river sediment. *Environ. Pollut.* 127(3): 425-430.
- Zaki, S. (2006) Detection of *meta*- and *ortho*-cleavage dioxygenases in bacterial phenol-degraders. *J. Appl. Sci. Environ. Manage.* 10(3):75–81.
- Zhang, H., Zuehlke, S., Guenther, K. y Spiteller, M. (2007) Enantioselective separation and determination of single nonylphenol isomers. *Chemosphere* 66: 594-602.
- Zhang, H., Spiteller, M., Guenther, K., Boehmler, G. y Zuehlke, S. (2009) Degradation of a chiral nonylphenol isomer in two agricultural soils. *Environ Pollut* 157:1904–1910
- Zondervan, E. y Brian, R. (2007) Evaluation of different cleaning agents used for cleaning ultrafiltration membranes fouled by surface water. *J. Memb. Sci.* 304(1-2): 40-49.

Publicaciones

VII. Productos derivados de esta investigación

VII.1. Congresos

Remoción de isómeros de nonilfenol con un consorcio nitrificante en un reactor de membrana sumergida. Presentación oral. **XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.** 19 al 24 de Junio, 2011. Querétaro, Qro.

Biodegradation of a technical mixture of nonylphenol by nitrifying sludge in a membrane sequencing batch reactor. Poster. **8th IWA Leading-Edge Conference on Water and Wastewater Technologies.** 6 al 10 de Junio, 2011. Amsterdam, Holanda.

Biodegradation of a Technical Mixture Nonylphenols by Three Mixed Populations. Poster. **7th IWA Leading-Edge Conference on Water and Wastewater Technologies.** 2 al 4 de Junio, 2010. Phoenix, Arizona.

Biodegradation of a Technical Mixture Nonylphenols by Three Inocula. Poster. **2nd Young Water Professional Conference 2010 Mexico.** 12 al 14 de Abril, 2010. Querétaro, Mexico.

VII.2. Publicaciones

Torres-Bojorges, A.X. y Buitrón, G. (2011): Biodegradation of nonylphenols using nitrifying sludge, 4-chlorophenol-adapted consortia and activated sludge in liquid and solid phases. *Environmental Technology*. DOI:10.1080/09593330.2011.644584.

Torres-Bojorges, A.X., Peña, A.P. y Buitrón, G. "Quantification of isomers of nonylphenol onto activated sludge by ultrasonication, solid phase extraction and GC/MS" (En preparación)

Torres-Bojorges, A.X. y Buitrón, G. "Degradation of isomers of nonylphenol by nitrifier bacteria in a membrane sequencing batch reactor" (En preparación)

Torres-Bojorges, A.X., Buitrón, G., Carballa, M. y Lema, J.M. "Impact of isomers of nonylphenol on activated nitrifying sludge" (En preparación)

Anexos

VIII. Anexo

VIII.1. Cálculo de límites de detección a partir de las curvas de referencia empleadas en este estudio.

VIII.1.1. 4-n-NP en fase líquida ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

Tabla VIII.1. Cálculo del límite de detección y de cuantificación a partir de la curva de referencia para 4-n-NP en fase líquida.

	X_i	Y_i	\bar{X}	$(X_i - \bar{X})^2$	m	b		
	0	0	30	900	183286.5269	-291369.445		
	2	263189	30	784	183286.5269	-291369.445		
	4	450511	30	676	183286.5269	-291369.445		
	6	968401.5	30	576	183286.5269	-291369.445		
	8	1197697	30	484	183286.5269	-291369.445		
	10	1381905.5	30	400	183286.5269	-291369.445		
	20	3627353.5	30	100	183286.5269	-291369.445		
	40	6618293.5	30	100	183286.5269	-291369.445		
	60	10595564	30	900	183286.5269	-291369.445		
	80	12286745	30	2500	183286.5269	-291369.445		
	100	19889830	30	4900	183286.5269	-291369.445		
	Σ	330		12320				
N	L	S_y	S_m	S_b	S_x	r²	S_o	
33	7	514447.5145	4634.8504	97050.0056	1.1694	0.9806	1.3927	
				IUPAC	Prop. de errores			
				LD	2.50754E-05	1.752		
				LC	7.59862E-05	5.310		

VIII.1.2. Mezcla de isómeros en fase líquida ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

Tabla VIII.2. Cálculo del límite de detección y de cuantificación a partir de la curva de referencia para la mezcla de isómeros de nonilfenol en fase líquida.

	X_i	Y_i	\bar{X}	$(X_i - \bar{X})^2$	m	b
	0	0	200	40000	15205.26461	27425.1287
	20	461531	200	32400	15205.26461	27425.1287
	40	630277.5	200	25600	15205.26461	27425.1287
	60	965029	200	19600	15205.26461	27425.1287
	80	1280437.5	200	14400	15205.26461	27425.1287
	100	1489834	200	10000	15205.26461	27425.1287
	200	3053274.5	200	0	15205.26461	27425.1287
	400	5670809.5	200	40000	15205.26461	27425.1287
	500	7972626.5	200	90000	15205.26461	27425.1287
	600	9160961	200	160000	15205.26461	27425.1287
	Σ	2000		432000		

N	L	Sy	Sm	Sb	Sx	r ²	So
30	7	109088.1	165.97226	21734.18711	3.02787	0.99667	3.71950
		IUPAC		Propagación de errores			
		LD	0.000807243	4.717			
		LC	0.002446191	14.295			

VIII.1.3. 4-n-NP en fase sólida (mg·kg⁻¹)

Tabla VIII.3. Cálculo del límite de detección y de cuantificación a partir de la curva de referencia para 4-n-NP en fase sólida.

Xi	Yi	\bar{X}	(Xi- \bar{X}) ²	m	b		
0.102689	164360.3333	0.6880144	0.34260582	1583959.798	-1842.28304		
0.25672	438754.6667	0.6880144	0.18601486	1583959.798	-1842.28304		
0.513443	696687.3333	0.6880144	0.03047517	1583959.798	-1842.28304		
1.02689	1759358.333	0.6880144	0.11483667	1583959.798	-1842.28304		
1.54033	2380563.667	0.6880144	0.72644188	1583959.798	-1842.28304		
Σ	3.440072		1.40037441				
N	L	Sy	Sm	Sb	Sx	r ²	So
15	7	52446.8238	44319.7303	15230.0621	0.0152	0.9899	0.0245
		IUPAC		Prop. de errores			
		LD	5.10454E-08	0.032			
		LC	1.54683E-07	0.096			

VIII.1.4. Mezcla de isómeros en fase sólida (mg·kg⁻¹)

Tabla VIII.4. Cálculo del límite de detección y de cuantificación a partir de la curva de referencia para la mezcla de isómeros de nonilfenol en fase sólida.

Xi	Yi	\bar{X}	(Xi- \bar{X}) ²	m	b
0.513443	135659.3333	1.66869075	1.33459736	267318.8796	25552.2917
1.02689	290441.3333	1.66869075	0.4119082	267318.8796	25552.2917
2.05377	530865.6667	1.66869075	0.14828603	267318.8796	25552.2917
3.08066	929533	1.66869075	1.99365716	267318.8796	25552.2917
5.13443	1359327	1.66869075	12.0113485	267318.8796	25552.2917
Σ	11.809193		15.8997973		

N	L	Sy	Sm	Sb	Sx	r ²	So
15	7	28709.5113	7199.9587	8418.3168	0.0492	0.9907	0.0666
			IUPAC		Prop. de errores		
			LD	8.223E-07	0.104		
			LC	2.492E-06	0.316		

VIII.2. Datos de la cuantificación de los isómeros de nonilfenol en la fase líquida y sólida durante la determinación del equilibrio de sorción

VIII.2.1. Lodo nitrificante enriquecido a una relación C/N 5.0

Tabla VIII.5. Cuantificación de isómeros de nonilfenol en fase sólida y líquida, y porcentaje de recuperación.

Tiempo, h	Masa, µg						%Recuperación	
	Fase líquida		Fase sólida		Total			
0	7.3300	± 0.2017	0.4007	± 0.1104	7.7307	± 0.0913	99.17	± 1.17
0.5	5.0934	± 0.2108	2.5949	± 0.2785	7.6884	± 0.0677	98.63	± 0.87
3	3.6615	± 0.0796	4.0542	± 0.1908	7.7157	± 0.1113	98.98	± 1.43
6	1.9786	± 0.2172	5.5681	± 0.3792	7.5467	± 0.1620	96.81	± 2.08
12	1.5439	± 0.1387	6.3049	± 0.1590	7.8488	± 0.2977	100.69	± 3.82
24	1.0505	± 0.1396	6.3872	± 0.5264	7.4376	± 0.3868	95.41	± 4.96
48	1.0661	± 0.0064	6.8813	± 0.3321	7.9474	± 0.3257	101.95	± 4.18

VIII.2.2. Lodo activado

Tabla VIII.6. Cuantificación de isómeros de nonilfenol en fase sólida y líquida, y porcentaje de recuperación.

Tiempo, h	Masa, µg						%Recuperación	
	Fase líquida		Fase sólida		Total			
0	7.3289	± 0.2001	0.4007	± 0.1104	7.7296	± 0.0898	99.1856	± 1.1517
0.5	5.9258	± 0.2242	2.5949	± 0.2785	8.5207	± 0.5027	109.3370	± 6.4507
3	4.8281	± 0.6571	4.0542	± 0.1908	8.8824	± 0.8479	113.9778	± 10.8798
6	3.6539	± 0.2768	5.5681	± 0.3792	9.2220	± 0.6560	118.3356	± 8.4176
12	0.9512	± 0.1055	6.3049	± 0.1590	7.2561	± 0.0535	93.1095	± 0.6870
24	0.7914	± 0.1205	6.3872	± 0.5264	7.1786	± 0.6468	92.1148	± 8.3000
48	0.8370	± 0.0097	6.8813	± 0.3321	7.7183	± 0.3224	99.0398	± 4.1373

VIII.3. Memoria de cálculo de los porcentajes de biodegradación, adsorción y remoción durante las pruebas de biodegradabilidad de los isómeros de nonilfenol con tres inóculos diferentes.

A partir de los datos obtenidos en la fase líquida y la fase sólida para cada inóculo (Tabla VIII.7) se aplicaron las ecuaciones III.4 a III.6 para determinar los porcentajes de biodegradación, adsorción y remoción de la mezcla de isómeros de nonilfenol.

Tabla VIII.7. Micromoles de la mezcla de isómeros de nonilfenol determinados a cada tiempo de muestreo en la fase líquida y la fase sólida para cada inóculo.

Tiempo, h	Lodo nitrificante C/N 5.0		Biomasa aclimatada a 4-CF		Lodo activado	
	tNP _{líq} , μmoles	tNP _{sól} , μmoles	tNP _{líq} , μmoles	tNP _{sól} , μmoles	tNP _{líq} , μmoles	tNP _{sól} , μmoles
0	0.0670	0.000	0.0649	0.0000	0.0642	0.000
	0.0636	0.000	0.0671	0.0000	0.0651	0.000
	0.0649	0.000	0.0625	0.0000	0.0662	0.000
62	0.0324	0.0322	0.0417	0.0208	0.0435	0.0198
	0.0377	0.0238	0.0416	0.0215	0.0482	0.0224
	0.0348	0.0281	0.0413	0.0214	0.0440	0.0203
110	0.0255	0.0322	0.0394	0.0221	0.0351	0.0299
	0.0223	0.0238	0.0391	0.0218	0.0348	0.0284
	0.0223	0.0281	0.0389	0.0218	0.0343	0.0297
158	0.0188	0.0322	0.0313	0.0215	0.0299	0.0295
	0.0183	0.0238	0.0326	0.0187	0.0288	0.0288
	0.0188	0.0281	0.0317	0.0208	0.0292	0.0299
206	0.0176	0.0221	0.0267	0.0188	0.0272	0.0284
	0.0175	0.0224	0.0226	0.0188	0.0276	0.0289
	0.0166	0.0269	0.0254	0.0213	0.0276	0.0304
254	0.0134	0.0221	0.0202	0.0224	0.0252	0.0287
	0.0138	0.0224	0.0204	0.0215	0.0249	0.0299
	0.0129	0.0269	0.0217	0.0210	0.0258	0.0299

Para la botella 1 del muestreo a las 62 h, en el caso de lodo nitrificante C/N 5.0:

$$\%tNP_{\text{Biodeg}} = \left(\frac{0.0652 - (0.0324 + 0.0322)}{0.0652} \right) \times 100 = 0.8904$$

$$\%tNP_{\text{Adsorb}} = \left(\frac{0.0322}{0.0652} \right) \times 100 = 49.4211$$

$$\%tNP_{\text{Remov}} = \left(1 - \frac{0.0324}{0.0652} \right) \times 100 = 50.3115$$

Por tanto,

Tabla VIII.8. Porcentajes de remoción, adsorción y degradación de la mezcla de isómeros de nonilfenol durante la prueba de biodegradabilidad con el lodo nitrificante C/N 5.0

Tiempo, h	tNP _{liq} , μmoles	tNP _{sól} , μmoles	% tNP rem		% NP ads		% NP deg			
			Promedio	Desv	Promedio	Desv	Promedio	Desv		
0	0.0670	-0.0001	-2.7688							
	0.0636	-0.0001	2.4350	0.000	2.618	-0.1060		-2.6629		
	0.0649	-0.0001	0.3339			-0.0927		2.5276		
62	0.0324	0.0322	50.3115			-0.1321		0.4660		
	0.0377	0.0238	42.1336	46.349	4.095	49.4211		0.8904		
	0.0348	0.0281	46.6026			36.5578	43.014	6.432	5.5758	3.335
110	0.0255	0.0322	60.8905			43.0642		3.5384		
	0.0223	0.0238	65.6972	64.104	2.783	49.4211		11.4694		
	0.0223	0.0281	65.7236			36.5578	43.014	6.432	29.1395	21.089
158	0.0188	0.0322	71.1651			43.0642		22.6594		
	0.0183	0.0238	71.8752	71.418	0.397	49.4211		21.7440		
	0.0188	0.0281	71.2128			36.5578	43.014	6.432	35.3174	28.403
206	0.0176	0.0221	72.9328			43.0642		28.1487		
	0.0175	0.0224	73.1091	73.521	0.870	33.8451		39.0877		
	0.0166	0.0269	74.5209			34.4308	36.535	4.162	38.6783	36.986
254	0.0134	0.0221	79.3771			41.3292		33.1917		
	0.0138	0.0224	78.8953	79.472	0.629	33.8451		45.5320		
	0.0129	0.0269	80.1430			34.4308	36.535	4.162	44.4646	42.937
						41.3292		38.8138		

En el caso de la biomasa adaptada a 4-clorofenol obtenemos,

$$\%tNP_{\text{Biodeg}} = \left(\frac{0.0648 - (0.0417 + 0.0208)}{0.0648} \right) \times 100 = 3.5435$$

$$\%tNP_{\text{Adsorb}} = \left(\frac{0.0208}{0.0648} \right) \times 100 = 32.0798$$

$$\%tNP_{\text{Remov}} = \left(1 - \frac{0.0417}{0.0648}\right) \times 100 = 35.6234$$

Por tanto,

Tabla VIII.9. Porcentajes de remoción, adsorción y degradación de la mezcla de isómeros de nonilfenol durante la prueba de biodegradabilidad con la biomasa adaptada a 4-clorofenol

Tiempo, h	tNP _{líq} , μmoles	tNP _{sól} , μmoles	% tNP rem		% NP ads		% NP deg				
			Promedio	Desv	Promedio	Desv	Promedio	Desv			
0	0.0649	0.0000	-0.1016								
	0.0671	0.0000	-3.5328	0.000	3.585	-0.0277					
	0.0625	0.0000	3.6344			-0.0404					
62	0.0417	0.0208	35.6234			32.0798					
	0.0416	0.0215	35.8183	35.904	0.331	33.1777	32.749	0.587	2.6407	3.154	0.464
	0.0413	0.0214	36.2696			32.9907			3.2789		
110	0.0394	0.0221	39.1780			34.0744			5.1036		
	0.0391	0.0218	39.7067	39.620	0.406	33.7021	33.801	0.239	6.0046	5.819	0.643
	0.0389	0.0218	39.9766			33.6279			6.3488		
158	0.0313	0.0215	51.7196			33.2347			18.4849		
	0.0326	0.0187	49.6268	50.826	1.080	28.8150	31.379	2.293	20.8118	19.448	1.214
	0.0317	0.0208	51.1328			32.0868			19.0460		
206	0.0267	0.0188	58.7775			29.0596			29.7179		
	0.0226	0.0188	65.1902	61.613	3.270	28.9985	30.292	2.187	36.1917	31.321	4.299
	0.0254	0.0213	60.8715			32.8175			28.0541		
254	0.0202	0.0224	68.8500			34.6027			34.2473		
	0.0204	0.0215	68.4978	67.946	1.273	33.2205	33.411	1.109	35.2772	34.535	0.648
	0.0217	0.0210	66.4896			32.4086			34.0810		

En el caso del lodo activado obtenemos,

$$\%tNP_{\text{Biodeg}} = \left(\frac{0.0652 - (0.0435 + 0.0198)}{0.0652}\right) \times 100 = 2.8022$$

$$\%tNP_{\text{Adsorb}} = \left(\frac{0.0198}{0.0652}\right) \times 100 = 30.4488$$

$$\%tNP_{\text{Remov}} = \left(1 - \frac{0.0435}{0.0652}\right) \times 100 = 33.2510$$

Por tanto,

Tabla VIII.10. Porcentajes de remoción, adsorción y degradación de la mezcla de isómeros de nonilfenol durante la prueba de biodegradabilidad con el lodo activado

Tiempo, h	tNP _{liq} , μmoles	tNP _{sól} , μmoles	% tNP rem		% NP ads		% NP deg		
			Promedio	Desv	Promedio	Desv	Promedio	Desv	
0	0.0642	-0.0001	1.4441					1.5500	
	0.0651	-0.0001	0.1663	0.000	1.534	-0.1094		0.2757	
	0.0662	-0.0001	-1.6104			-0.1071		-1.5033	
62	0.0435	0.0198	33.2510			30.4488		2.8022	
	0.0482	0.0224	26.1010	30.613	3.926	34.3168	31.982	2.055	2.055
	0.0440	0.0203	32.4878			31.1796		1.3081	1.056
110	0.0351	0.0299	46.1435			45.8655		0.2781	
	0.0348	0.0284	46.5973	46.718	0.643	43.5221	44.979	1.271	3.0751
	0.0343	0.0297	47.4131			45.5485		1.8647	1.403
158	0.0299	0.0295	54.0507			45.2688		8.7818	
	0.0288	0.0288	55.7424	54.970	0.855	44.2306	45.152	0.869	11.5118
	0.0292	0.0299	55.1159			45.9568		9.1591	1.479
206	0.0272	0.0284	58.2623			43.5686		14.6937	
	0.0276	0.0289	57.6923	57.866	0.344	44.2740	44.855	1.656	13.4183
	0.0276	0.0304	57.6448			46.7230		10.9218	1.919
254	0.0252	0.0287	61.3468			43.9698		17.3771	
	0.0249	0.0299	61.7986	61.190	0.700	45.8354	45.214	1.077	15.9632
	0.0258	0.0299	60.4249			45.8354		14.5895	1.394

VIII.4. Prueba de análisis de varianza (ANOVA) de los datos obtenidos durante la operación del MSBR.

El análisis estadístico de los datos se realizó con el software NCSS 2007©.

VIII.4.1. Influyente (tNP_{inf})

Analysis of Variance Report

Response variables tNPinf_II,tNPinf_III

Kruskal-Wallis One-Way ANOVA on Ranks

Hypotheses

H0: All medians are equal.

Ha: At least two medians are different.

Test Results

Method	DF	Chi-Square (H)	Prob Level	Decision(0.005)
Not Corrected for Ties	1	3.029371	0.081770	Accept H0
Corrected for Ties	1	3.029371	0.081770	Accept H0
Number Sets of Ties	0			
Multiplicity Factor	0			

Fisher's LSD Multiple-Comparison Test

Response variables: tNPinf_II,tNPinf_III

Term A:

Alpha=0.005 Error Term=S(A) DF=57 MSE=6139.622 Critical Value=2.9204

Group	Count	Mean	Different From Groups
tNPinf_III	26	3853.048	
tNPinf_II	33	3887.411	

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response variables: tNPinf_II,tNPinf_III

Term A:

Alpha=0.005 Error Term=S(A) DF=57 MSE=6139.622 Critical Value=4.1302

Group	Count	Mean	Different From Groups
tNPinf_III	26	3853.048	
tNPinf_II	33	3887.411	

VIII.4.2. Efluente (tNP_{efl})**Analysis of Variance Report**

Response variables tNPefl_II,tNPefl_III

Kruskal-Wallis One-Way ANOVA on Ranks**Hypotheses**

H0: All medians are equal.

Ha: At least two medians are different.

Test Results

Method	DF	Chi-Square (H)	Prob Level	Decision(0.005)
Not Corrected for Ties	1	66.64855	0.000000	Reject H0
Corrected for Ties	1	66.64899	0.000000	Reject H0
Number Sets of Ties	1			
Multiplicity Factor	6			

Fisher's LSD Multiple-Comparison Test

Response variables: tNPefl_II,tNPefl_III

Term A:

Alpha=0.005 Error Term=S(A) DF=95 MSE=7162.519 Critical Value=2.8741

Group	Count	Mean	Different From Groups
tNPefl_II	57	339.1118	tNPefl_III
tNPefl_III	40	663.5716	tNPefl_II

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response variables: tNPefl_II,tNPefl_III

Term A:

Alpha=0.005 Error Term=S(A) DF=95 MSE=7162.519 Critical Value=4.0646

Group	Count	Mean	Different From Groups
tNPefl_II	57	339.1118	tNPefl_III
tNPefl_III	40	663.5716	tNPefl_II

VIII.4.3. Exceso de lodo (tNP_{EL})

Analysis of Variance Report

Response variables tNPel_II,tNPel_III

Kruskal-Wallis One-Way ANOVA on Ranks

Hypotheses

H0: All medians are equal.

Ha: At least two medians are different.

Test Results

Method	DF	Chi-Square (H)	Prob Level	Decision(0.005)
Not Corrected for Ties	1	1.884314	0.169845	Accept H0
Corrected for Ties	1	1.884314	0.169845	Accept H0
Number Sets of Ties	0			
Multiplicity Factor	0			

Fisher's LSD Multiple-Comparison Test

Response variables: tNPel_II,tNPel_III

Term A:

Alpha=0.005 Error Term=S(A) DF=27 MSE=1272.802 Critical Value=3.0565

Group	Count	Mean	Different From Groups
tNPel_III	12	141.6774	
tNPel_II	17	152.1358	

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response variables: tNPel_II,tNPel_III

Term A:

Alpha=0.005 Error Term=S(A) DF=27 MSE=1272.802 Critical Value=4.3227

Group	Count	Mean	Different From Groups
tNPeI_III	12	141.6774	
tNPeI_II	17	152.1358	

VIII.4.4. Porcentaje de remoción de la tNP

Analysis of Variance Report

Response variables Remoción_II,Remoción_III

Kruskal-Wallis One-Way ANOVA on Ranks

Hypotheses

H0: All medians are equal.

Ha: At least two medians are different.

Test Results

Method	DF	Chi-Square (H)	Prob Level	Decision(0.005)
Not Corrected for Ties	1	25.95086	0.000000	Reject H0
Corrected for Ties	1	25.95086	0.000000	Reject H0
Number Sets of Ties	0			
Multiplicity Factor	0			

Fisher's LSD Multiple-Comparison Test

Response variables: Remoción_II,Remoción_III

Term A:

Alpha=0.005 Error Term=S(A) DF=37 MSE=3.949686 Critical Value=2.9852

Group	Count	Mean	Different From Groups
Remoción_III	14	82.30832	Remoción_II
Remoción_II	25	91.91539	Remoción_III

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response variables: Remoción_II,Remoción_III

Term A:

Alpha=0.005 Error Term=S(A) DF=37 MSE=3.949686 Critical Value=4.2219

Group	Count	Mean	Different From Groups
Remoción_III	14	82.30832	Remoción_II
Remoción_II	25	91.91539	Remoción_III

VIII.4.5. Porcentaje de biodegradación

Analysis of Variance Report

Response variables Biodegradación_II,Biodegradación_III

Kruskal-Wallis One-Way ANOVA on Ranks

Hypotheses

H0: All medians are equal.

Ha: At least two medians are different.

Test Results

Method	DF	Chi-Square (H)	Prob Level	Decision(0.005)
Not Corrected for Ties	1	19.86674	0.000008	Reject H0
Corrected for Ties	1	19.86674	0.000008	Reject H0
Number Sets of Ties	0			
Multiplicity Factor	0			

Fisher's LSD Multiple-Comparison Test

Response variables: Biodegradación_II,Biodegradación_III

Term A:

Alpha=0.005 Error Term=S(A) DF=28 MSE=14.13591 Critical Value=3.0469

Group	Count	Mean	Different From Groups
Biodegradación_III	13	77.82459	Biodegradación_II
Biodegradación_II	17	87.7944	Biodegradación_III

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response variables: Biodegradación_II,Biodegradación_III

Term A:

Alpha=0.005 Error Term=S(A) DF=28 MSE=14.13591 Critical Value=4.3091

Group	Count	Mean	Different From Groups
Biodegradación_III	13	77.82459	Biodegradación_II
Biodegradación_II	17	87.7944	Biodegradación_III

VIII.4.6. Porcentaje de adsorción

Analysis of Variance Report

Response variables Adsorción_II,Adsorción_III

Kruskal-Wallis One-Way ANOVA on Ranks

Hypotheses

H0: All medians are equal.

Ha: At least two medians are different.

Test Results

Method	DF	Chi-Square (H)	Prob Level	Decision(0.005)
Not Corrected for Ties	1	4.795205E-02	0.826666	Accept H0
Corrected for Ties	1	4.795205E-02	0.826666	Accept H0
Number Sets of Ties	0			
Multiplicity Factor	0			

Fisher's LSD Multiple-Comparison Test

Response variables: Adsorción_II,Adsorción_III

Term A:

Alpha=0.005 Error Term=S(A) DF=23 MSE=10.9312 Critical Value=3.1040

Group	Count	Mean	Different From Groups
Adsorción_III	11	4.821023	
Adsorción_II	14	5.222994	

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response variables: Adsorción_II,Adsorción_III

Term A:

Alpha=0.005 Error Term=S(A) DF=23 MSE=10.9312 Critical Value=4.3899

Group	Count	Mean	Different From Groups
Adsorción_III	11	4.821023	
Adsorción_II	14	5.222994	