



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**EFFECTO DEL POTENCIAL REDOX EN LA OXIDACIÓN
ANAEROBIA DE COMPUESTOS FENÓLICOS POR UN LODO
DESNITRIFICANTE**

T e s i s D o c t o r a l

P R E S E N T A

M. B. ARTURO CADENA RAMÍREZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. JORGE GÓMEZ HERNÁNDEZ

ASESORES

DR. IGNACIO GONZÁLEZ MARTÍNEZ

DRA. ANNE-CLAIRE TEXIER

MÉXICO D. F. SEPTIEMBRE 2009

Mexico D. F. a 10 de Septiembre del 2009

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

**EFFECTO DEL POTENCIAL REDOX EN LA OXIDACIÓN ANAEROBIA DE
COMPUESTOS FENÓLICOS POR UN LODO DESNITRIFICANTE**

Que presentó

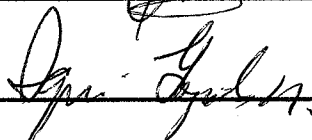
M. B. Arturo Cadena Ramírez

Comité Tutorial:

Director: Dr. Jorge Gregorio Gómez Hernández



Asesor: Dr. Ignacio González Martínez



Asesor: Dra. Anne Claire Texier Valentine


Texier

Jurado

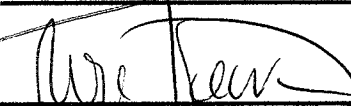
**Presidente: Dr. Ignacio González Martínez
UAM-Iztapalapa - México**



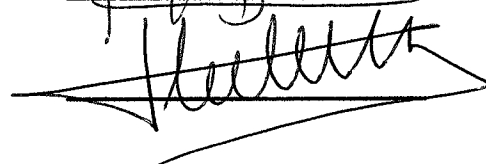
**Secretario: Dr. Francisco Cervantes Carrillo
IPICyT- México**



**Vocal: Dra. Reyes Sierra Álvarez
Universidad de Arizona - Estado Unidos**



**Vocal: Dr. Frederic Thalasso Ziret
CINVESTAV - México**





Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00058

Matrícula: 205180996

EFFECTO DEL POTENCIAL REDOX EN LA OXIDACION ANAEROBIA DE COMPUESTOS FENOLICOS POR UN LODO DESNITRIFICANTE

En México, D.F., se presentaron a las 11:00 horas del día 10 del mes de septiembre del año 2009 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. IGNACIO GONZALEZ MARTINEZ
- DR. FREDERIC THALASSO SIRET
- DR. REYES SIERRA ALVAREZ
- DR. FRANCISCO JAVIER CERVANTES CARRILLO

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA
DE: ARTURO CADENA RAMIREZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



ARTURO CADENA RAMIREZ
ALUMNO

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISION DE CBS

DR. JOSE FRANCISCO FLORES PEDROCHE

PRESIDENTE

DR. IGNACIO GONZALEZ MARTINEZ

VOCAL

DR. FREDERIC THALASSO SIRET

VOCAL

DR. REYES SIERRA ALVAREZ

SECRETARIO

DR. FRANCISCO JAVIER CERVANTES CARRILLO

RESUMEN	5
ABSTRACT	7
INTRODUCCIÓN	9
ANTECEDENTES	13
Contaminación del agua.....	13
Tratamiento de aguas residuales	14
Impacto del Nitrógeno y el Carbono	15
Eliminación de nitrógeno	17
El ciclo del nitrógeno	17
Eliminación biológica de nitrógeno por desnitrificación.....	19
De las sustancias húmicas a las quinonas	28
Papel de las sustancias húmicas y quinonas en los procesos biogeoquímicos.....	30
Las quinonas en el proceso desnitrificante.	31
Las quinonas y el transporte de electrones	33
Justificación	35
Bibliografía.....	36
OBJETIVOS.....	48
OBJETIVO GENERAL.....	48
OBJETIVOS PARTICULARES	48
HIPOTESIS	48
COMPARISON OF THE EFFECTS OF MENADIONE, ALIZARINE AND ANTHRAQUINONE-2,6-DISULFONATE ON THE DENITRIFICATION.....	50
Abstract	50
Introduction	50
Materials and Methods.....	52
Inoculum and culture medium composition.....	52
Batch cultures.....	53
Analytical methods.....	53
Results and Discussion	55
Control denitrifying batch cultures	55

Effect of menadione (MEN) on denitrifying process.....	56
Effect of alizarine (ALZ) on denitrifying process.....	59
Effect of anthraquinone-2,6-disulfonate (AQDS) on denitrifying process.....	61
Redox implications of quinones	62
Conclusions	63
References.....	65
PHYSIOLOGICAL IMPLICATIONS OF ELECTRIC FIELDS APPLIED ON A DENITRIFICATION PROCESS	70
Abstract	70
Introduction	70
Materials and Methods.....	72
Inoculum and culture medium composition.....	72
Culture method.	72
Bioelectrochemical reactor	73
Analytical methods.....	74
Results and Discussion	74
Control denitrifying batch cultures	75
Denitrification under electrical fields.....	79
Conclusions	84
References.....	85
CONCLUSIONES GENERALES	88
ANEXOS MATERIALES Y MÉTODOS	91
Estabilización del reactor continuo desnitrificante en estado estacionario	91
Descripción del reactor	91
Inóculo.....	91
Medio de cultivo del reactor continuo de tanque agitado	91
Reactor en estado estacionario.....	92
Sistema de aplicación de potencial eléctrico	92
Métodos de análisis	93
Cuantificación de Nitrato y Nitrito	93

Análisis de los gases: N ₂ , N ₂ O, CH ₄ , CO ₂	94
Cuantificación de amonio.....	96
Carbono Orgánico e Inorgánico	96
Sólidos suspendidos volátiles.....	97
Intermediarios de oxidación	98
Estabilización del lodo bajo condiciones desasimilativas	99
Crecimiento del lodo como fuente de inóculo.....	100

RESUMEN

En el presente trabajo se explora el efecto de la adición de tres quinonas: menadiona, alizarina y antraquinona-2,6-disulfonato, a diferentes concentraciones (0 a 2 mM), en el proceso desnitrificante con *p-cresol*. Los resultados muestran que cuando se adicionó menadiona, se afectó la eficiencia de consumo de sustratos principalmente. En todos los casos los rendimientos para nitrógeno molecular y carbono inorgánico se mantuvieron alrededor de 0.9. En presencia de alizarina y menadiona, en comparación con los controles sin quinonas, las velocidades específicas de consumo para nitrato y *p-cresol* decrecieron en un 40 y 90 % respectivamente. El inoculo previamente expuesto a las quinonas fue utilizado en ensayos de recuperabilidad de la actividad desnitrificante usando *p-cresol* y acetato como fuentes de carbono. Para los inóculos que estuvieron expuestos a la antraquinona-2,6-disulfonato y a la alizarina, la actividad desnitrificante fue totalmente recuperada con ambas fuentes de carbono. Sin embargo, el lodo expuesto a diferentes concentraciones de menadiona casi no recuperó su actividad. En un intento en tratar de entender los mecanismos involucrados por medio de los cuales las quinonas participan en el proceso desnitrificante, se encontró que la menadiona y la alizarina presentan efectos inhibitorios muy marcados en el proceso desnitrificante, mientras que la antraquinona-2,6-disulfonato no presentó efecto alguno. Los resultados sugieren que la menadiona modifica el sistema de transporte de sustratos y la alizarina afecta algunas enzimas desnitrificantes mediante la formación de complejos con el molibdeno. Un modelo basado en los potenciales de óxido-reducción de la ruta desnitrificante y la primera parte de la oxidación de *p-cresol*, sugiere que los efectos observados por la adición de quinonas parecen estar más asociados a propiedades estructurales de las moléculas de quinona e hidrofobicidad, que a su capacidad de óxido-reducción.

Para entender mejor el papel que juega el potencial de óxido-reducción de las quinonas en la desnitrificación organotrófica, se estudió el efecto de tres potenciales eléctricos (PE), correspondientes a los potenciales de óxido reducción de cada una de las quinonas ensayadas (-187 mV, -279 mV y +104 mV). Se observó que el inoculo desnitrificante tuvo la capacidad de oxidar el *p-cresol* con la aplicación de los tres EP, en ausencia de cualquier aceptor final de electrones, incluyendo el nitrato.

Sin embargo, a cualquiera de los EP ensayados, el lodo fue incapaz de desnitrificar en ausencia de algún donador de electrones. En el proceso desnitrificante con *p-cresol*, la aplicación de los EP, provocó el desacoplamiento de los procesos oxidativo y reductivo, favoreciendo la oxidación de materia orgánica por encima de la reducción de nitrato. Adicionalmente se observaron efectos a nivel de ruta bioquímica. A potenciales de -279mV y +104mV, el consumo de nitrato y nitrito se afectó, así como, la transformación de *p*-hidroxibenzoato. Aunque, a -187 mV, parece solo haber efectos a nivel de transporte de sustratos. Se presenta evidencia de que la aplicación de los diferentes EP, tiene efectos característicos sobre el proceso desnitrificante, que no son comparables entre sí. Lo anterior confirma que el potencial de óxido-reducción de las quinonas no es quien gobierna los efectos observados por la adición de menadiona, alizarina y antraquinona-2,6-disulfonato en el proceso desnitrificante con *p-cresol*.

ABSTRACT

Denitrification using *p-cresol* as electron source was studied in the presence of three quinones, menadione, alizarine and anthraquinone-2,6-disulfonate, at different molar concentrations (0 to 2 mM). Results showed that substrates consumption efficiency was mainly affected when menadione was present. In all cases the yield for N₂ and inorganic carbon values remained around 0.9. In presence of alizarine and menadione specific consumption rates for *p-cresol* and nitrate decreased 40% and 90% (for both substrates), compared to controls not exposed to quinones. The sludge previously exposed to quinones was submitted to recovering denitrifying studies using acetate and *p-cresol*. After exposing to anthraquinone-2,6-disulfonate and alizarine with *p-cresol* and acetate, the metabolic activity of denitrifying sludge was completely recovered, but previous exposition at any menadione concentration resulted in a very low metabolic recuperation. An attempt in elucidating the underlying mechanisms in which the quinones function in the denitrification, shown that menadione and alizarine can have a marked inhibitory effect on denitrifying process and AQDS no effect at all. The results suggested that menadione modify the transport system and alizarine affected some denitrifying enzymes by complexing the molybdenum. A model based on oxido-reduction potentials of the enzymes implied in denitrifying pathway and *p-cresol* oxidation suggested that the effect of quinones on the denitrification process appears to be more associated to quinone moiety structural properties and hydrophobicity than to their oxidative-reductive capacity. In order to better understand the effect of oxido-reduction potential of quinones in organotrophic denitrification, the effect of the application of three electric potentials (EP) (-187 mV, -279 mV and +104 mV) on a denitrifying process was explored. It was observed that the denitrifying sludge was able to support the oxidation of *p-cresol* with the application of the EP in the absence of nitrate, but it was unable to drive the denitrification without an electron donor. On denitrification, the applied EP uncoupled the oxidative from the reductive process, favoring the *p-cresol* oxidation over the production of N₂. Additionally effects at biochemical level were observed.

At potentials of -279 and +104 mV, the nitrate and nitrite consumption was affected as well as the transformation of *p*-hydroxybenzoate. However, at -187 mV, effects seemed to occur only on transport of substrates. Evidence that denitrification had very characteristic and different physiological behaviors for each EP assayed are presented, confirming that the oxido-reduction potential of the quinones is not who governs the effects observed on the organotrophic denitrifying process with *p-cresol*.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

El papel que juegan las sustancias húmicas (SH) en los procesos biogeoquímicos ha sido ampliamente estudiado. Esos estudios se han motivado, por la contribución que pueden tener este tipo de compuestos en los procesos de bioremediación, oxidación de contaminantes orgánicos o bien en la reducción de metales, compuestos azo, cloro-aromáticos y nitro-aromáticos. Esta capacidad de interacción de las SH se ha asociado a las propiedades óxido-reductoras que tienen; y es ampliamente informado, que los principales responsables del papel que juegan, son las moléculas de quinona; permitiéndoles, participar como aceptores finales de electrones, donadores de electrones o simplemente transportadores de los mismos.

Dentro de los procesos biogeoquímicos que hay en la naturaleza, la desnitrificación biológica es un proceso respiratorio anóxico, que puede acoplar la oxidación de compuestos orgánicos o inorgánicos con la reducción de nitrato a nitrógeno molecular. Además, la desnitrificación es el proceso oxidativo energéticamente más importante que existe, después de la respiración con oxígeno. Esta característica ha hecho que la desnitrificación biológica sea ampliamente aplicada en el tratamiento de aguas residuales; además de hacerla, un buen candidato para el estudio de la aplicación de SH. En la actualidad existen algunos estudios acerca de las posibles contribuciones de las SH en la desnitrificación. La mayoría de esos estudios describen las contribuciones, en función del uso de quinonas, utilizando principalmente a la antraquinona-2,6-disulfonato (AQDS) que es considerada como el modelo húmico por excelencia. Sin embargo, aun son escasos los estudios acerca de la oxidación de materia orgánica de tipo persistente en el proceso desnitrificante, donde se hayan utilizado quinonas como posibles coadyuvantes redox. Ninguno de los trabajos hasta ahora realizados han evidenciado de manera patente que la desnitrificación se pueda llevar a cabo, con base en balances de nitrógeno que demuestren donde termina realmente el nitrato reducido. Por este motivo, no hay información que claramente señale de algún beneficio y/o perjuicio que pudiera tener la adición de quinonas a la desnitrificación organotrófica, menos aún con inóculos de comportamiento fisiológico bien definido.

Las quinonas así como las SH pueden tener diferentes contribuciones metabólicas que podrían depender de su estructura química y propiedades fisicoquímicas, por lo cual es imprescindible estudiar varios tipos de quinonas con características fisicoquímicas diferentes. No está totalmente esclarecido si el efecto de las SH y las quinonas se puede asociar al potencial redox o al tipo de estructura química, como se menciona en la literatura.

De acuerdo a lo anterior el objetivo de este trabajo fue el de estudiar a qué nivel bioquímico-fisiológico, actúan las quinonas; y tratar de entender el papel que juega su potencial redox correspondiente; en virtud de lo reportado en literatura, de que la estructura química y el potencial redox, son los parámetros importantes que confieren la propiedad de participar en el metabolismo microbiano. Para abordar el objetivo antes mencionado, el presente trabajo doctoral se dividió en dos estudios por separado, los cuales se realizaron mediante cinéticas de cultivo en lote donde se determinaron, como variables de respuesta, las eficiencias de consumo de sustratos (nitrato y *p*-cresol), las velocidades específicas de consumo de los mismos; y por último, los rendimientos de los productos principales de mineralización de los sustratos (carbono inorgánico y nitrógeno molecular). También se realizó un seguimiento de los intermediarios de oxidación y reducción. El inóculo utilizado en estos estudios provino de un reactor continuo desnitrificante en estado estacionario bajo condiciones de heterotrofia; lo que asegura que al inicio de todos los ensayos, el consorcio microbiano presentara un comportamiento desnitrificante fisiológicamente estable.

Con la finalidad de estudiar las contribuciones bioquímico-fisiológicas que pudieran tener diferentes estructuras químicas de quinona, que conlleven propiedades fisicoquímicas características; en el primer capítulo se presenta el primer estudio, donde se utilizaron dos antraquinonas (la Alizarina y la AQDS) y una naftoquinona (Menadiona), a diferentes concentraciones de cada una (0, 0.035, 0.2, 1.0 y 2.0 mM). Posteriormente para tratar de entender y comprender el efecto del potencial de oxido-reducción de las quinonas en el proceso desnitrificante con materia orgánica, se aplicó directamente en el cultivo microbiano su potencial redox por medio de electrodos. De esta forma podrían eliminarse posibles contribuciones de la estructura química de la molécula; y por comparación de los

estudios con quinonas y con potencial redox, generar información útil sobre su participación en procesos microbianos y contribuir en el entendimiento de las quinonas y SH en los procesos biogeoquímicos. Así, en el segundo capítulo, se presenta el estudio del papel que juega el potencial de óxido-reducción de las quinonas, en el cultivo desnitrificante con *p*-cresol. La propuesta que se realizó fue, la aplicación de los potenciales redox mediante la imposición de un campo eléctrico que simulara tal efecto, en cultivos en lote. Para esto se propuso y diseñó, un bioreactor electroquímico de cilindro rotatorio, que asegurara la uniformidad del campo eléctrico y la homogeneidad del cultivo durante la cinética.

Una de las principales contribuciones de este trabajo fue que durante la realización de todos los experimentos, la determinación de todos los intermediarios de la desnitrificación y algunos de la oxidación del compuesto fenólico, así como el seguimiento del carbono orgánico disuelto y el carbono inorgánico; permitió realizar balances de masa, cuyos resultados ayudaron a determinar con certidumbre las contribuciones bioquímico-fisiológicas de las tres quinonas ensayadas; así como, las contribuciones dadas por el potencial redox impuesto con electrodos en el proceso desnitrificante con *p*-cresol.

ANTECEDENTES

ANTECEDENTES

La contaminación del agua es hoy en día uno de los problemas más graves que se presentan a nivel global. Este problema se ha acrecentado, ya que el consumo del agua ha aumentado a través de los años, mas no así procesos para su tratamiento. Tan solo en México, de acuerdo a datos de la Comisión Nacional del Agua (CNA, 2003), en el año 2002 se extrajeron 72.6 km³ de agua de ríos, lagos y acuíferos del país para los usos principales. El 77% del agua extraída es utilizada para la agricultura, siguiéndole el consumo urbano con un 13% y el industrial con el 10%. Cabe mencionar que la mayoría del agua residual que se produce es tratada en un muy bajo porcentaje (SEMARNAT, 2002a). A pesar de que el giro industrial sólo consume el 10% del agua extraída, también produce el agua más contaminada, por lo cual se ha convertido en uno de los principales problemas a nivel ambiental. El agua residual proveniente del uso industrial contiene elevadas concentraciones de nitrógeno y carbono, entre otros contaminantes, por lo cual es importante el estudio de tecnologías para su tratamiento.

Contaminación del agua

La contaminación del agua es hoy en día uno de los problemas más graves que se presentan a nivel global. Este problema se ha acrecentado, ya que el consumo del agua ha aumentado a través de los años, mas no así procesos para su tratamiento. Tan solo en México, de acuerdo a datos de la Comisión Nacional del Agua (CNA, 2003), en el año 2002 se extrajeron 72.6 km³ de agua de ríos, lagos y acuíferos del país para los usos principales. El 77% del agua extraída es utilizada para la agricultura, siguiéndole el consumo urbano con un 13% y el industrial con el 10%. Cabe mencionar que la mayoría del agua residual que se produce es tratada en un muy bajo porcentaje (SEMARNAT, 2002a). A pesar de que el giro industrial sólo consume el 10% del agua extraída, también produce el agua más contaminada, por lo cual se ha convertido en uno de los principales problemas a nivel ambiental. El agua residual proveniente del uso industrial contiene elevadas concentraciones de nitrógeno y carbono, entre otros contaminantes, por lo cual es importante el estudio de tecnologías para su tratamiento.

Tratamiento de aguas residuales

En 2002 se gastó un caudal de 203 m³/s de aguas residuales de consumo urbano, del cual sólo el 27.6% recibió tratamiento en 1,077 plantas de tratamiento, donde se eliminó aproximadamente el 9% de la materia orgánica. La industria del país generó un caudal de 258 m³/s de aguas residuales, recibiendo sólo el 10.6% tratamiento en 1,640 plantas de tratamiento con una eficiencia de eliminación de la concentración de solo el 17%. Además del bajo volumen de agua residual tratado, sólo 56.7% cumple con las condiciones particulares de descarga descritas en la NOM-001-SEMARNAT-1996. Aquí se suman dos problemas, primero la poca recuperación del agua utilizada, vía el tratamiento de aguas, y segundo, la cantidad de contaminantes que se descargan al ambiente (CNA, 2004).

El bajo porcentaje de tratamiento se debe, entre otras cosas, a los elevados costos que representa el tratamiento de agua residual, además de que algunos de los procesos en uso, suelen ser no muy eficientes, como se puede ver en los bajos porcentajes de eliminación de materia orgánica (demanda química de oxígeno; amonio y nitrógeno orgánico expresadas como mg/L de nitrógeno) y fósforo total. Un ejemplo de la magnitud de materia orgánica contenida en el agua residual de origen industrial, puede apreciarse en la Tabla 1.

Tabla 1. Cantidad de agua residual producida en el giro industrial y la materia orgánica que contiene (CNA, 2003).

Giro Industrial	Descarga anual de aguas residuales (m3/s)	Materia Orgánica generada (miles de toneladas/año)
Acuacultura	67.6	7
Azucarero	45.9	1750
Petrolero	11.4	1186
Servicios	10.3	183
Química	6.9	406
Celulosa y Papel	5.5	108
Agropecuaria	3.2	1063
Alimenticia	3.0	193
Cerveza y Malta	1.6	272
Minera	0.8	56
Textil	0.7	14
Destilería y Vitivinicultura	0.4	230
Beneficio del Café	0.3	32
Curtiduría	0.1	9
Otros Giros	12.9	795
Totales	170.4	6304

Existen en México 6 normas oficiales que estipulan los límites permisibles de contaminantes en el agua, las cuales abarcan a la industria, la agricultura y la población urbana. De los contaminantes que se consideran mayores, debido a que su presencia es frecuentemente mayor que otros, es el carbono, el nitrógeno y el fósforo (SEMARNAT, 2002b).

Impacto del Nitrógeno y el Carbono

El nitrógeno es considerado como uno de los principales factores de eutroficación de los cuerpos de agua receptores y de los mantos freáticos. El nitrógeno amoniacal puede agotar el oxígeno, en ambientes acuáticos, debido a la nitrificación y fertilización acuática, que conlleva al crecimiento vegetal con grandes repercusiones en la fauna (Oakes, 1996). En

forma de nitrato presenta un riesgo en la salud pública. El nitrato puede reducirse a nitrito, el cual una vez ingerido reacciona con la hemoglobina en la sangre formando metahemoglobinemia, afectando a niños menores de tres meses, debido a la falta de una enzima capaz de oxidar el nitrito (Douglass y col., 1978; Challis y Challis, 1982; Shuker, 1988). El nitrato ingerido, también puede ser usado como aceptor de electrones por las bacterias del sistema digestivo, formando nitrito, que puede reaccionar con varias aminos para formar nitrosaminas que, de acuerdo con algunas evidencias, podrían ser cancerígenas (Hartman, 1983). Estos datos muestran la importancia de llevar a cabo la desnitrificación en el tratamiento de aguas, tanto de cuerpos de agua, como de las residuales (Gaudy y Gaudy, 1981; Hartman, 1983).

En cuanto al carbono, éste puede estar presente en diversas formas, de las cuales algunas son biodegradables y otras persistentes (recalcitrantes). Las últimas, principalmente hidrocarburos de tipo aromático, son derivadas de actividades petroquímicas y de la industria de la transformación. Las formas de carbono persistentes representan un riesgo potencial a la salud pública y a los ecosistemas acuáticos. La toxicidad por ingestión o contacto con hidrocarburos aromáticos puede afectar diferentes órganos en el ser humano, provocando efectos crónicos, mutagénicos y/o carcinogénicos. Las propiedades químicas de los hidrocarburos (principalmente el tipo de grupos funcionales que contengan) determinan la toxicidad específica, la cual puede presentarse en diferentes tipos de síndromes, dependiendo de del sistema afectado. Los sistemas que pueden ser dañados por los hidrocarburos aromáticos incluyen el pulmonar, neurológico, cardíaco, gastrointestinal, hepático, renal, dermatológico y hematológico (Gummin y Hryhorczuk, 2002).

Actualmente existen muchos tipos de tratamientos fisicoquímicos para tratar contaminantes en los efluentes, sin embargo, la mayoría sólo transportan los compuestos contaminantes de un lado a otro, y sus costos son elevados, por lo que es justificable la búsqueda de tratamientos más amigables, económica y ambientalmente. Los procesos biológicos constituyen una alternativa de tratamiento que han probado ser más amigables. El tratamiento de aguas resalta su importancia al ser la vía por la cual se eliminan los elementos tóxicos que se presentan en vertientes originados de diferentes rubros,

disminuyendo así el impacto en los ecosistemas, así como en la salud de los seres humanos, además de recuperar el agua utilizada.

Eliminación de nitrógeno

La estrategia para el abatimiento de la contaminación por compuestos nitrogenados en el agua debe estar basada en el conocimiento de la concentración y la forma presente del nitrógeno. El nitrógeno puede existir en siete estados de oxidación en el intervalo de - 3 a + 5, por lo mismo puede ser encontrado en el agua en diversas formas. Existen varios métodos para lograr la eliminación de los compuestos nitrógenados del agua, los cuales se dividen principalmente en dos tipos: los fisicoquímicos y los biológicos. Entre los métodos fisicoquímicos se encuentran los siguientes: arrastre con aire a pH básico en caso del amoníaco, coagulación por cloración, intercambio iónico, separación por membranas y precipitación (Sorensen y Jorgensen, 1993; Letterman, 1999). Para la eliminación biológica de nitrógeno se encuentran la nitrificación y la desnitrificación (Cheremisinoff, 1996).

Cada método presenta diferentes eficiencias de eliminación de nitrógeno dependiendo de la forma de éste (amonio, nitrato y nitrógeno orgánico), de su concentración y de la configuración del tren de tratamiento. La confiabilidad de un proceso de tratamiento en cuestiones operativas, suele ser mayor para los métodos fisicoquímicos que para los biológicos, aunque el tratamiento biológico suele ser más amigable (Sorensen y Jorgensen, 1993).

El ciclo del nitrógeno

Los microorganismos desempeñan un papel fundamental en la transformación del nitrógeno en los ecosistemas, lo que se puede observar por medio del ciclo biogeoquímico del nitrógeno (Figura 1). La fijación del nitrógeno molecular en los sistemas biológicos, se lleva a cabo por medio de la acción de la enzima nitrogenasa (Brock y Madigan, 1991; Ferguson, 1998).

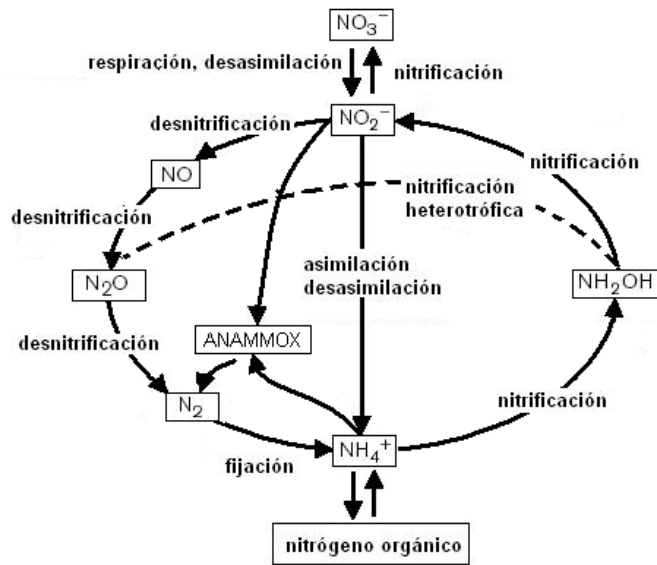


Figura 1. Ciclo del nitrógeno según Richardson y Watmough (1999).

La desnitrificación es el medio por el cual regresa de nuevo a la atmósfera en forma de N_2 mediante la reducción de nitrato, aunque también se puede presentar N_2O , el cual es no deseable ya que está asociado al efecto invernadero (Hong y col., 1994; Cervantes y col. 1998). La nitrificación es complementaria de la desnitrificación, ya que en ella se oxida el amoníaco a nitrato.

El nitrato puede ser reducido a amonio, para su asimilación y la síntesis de biomasa. Otra ruta posible es la reducción desasimilativa de nitrato a amonio (RDNA) (Cole y Brown, 1980; Cole, 1988). También se ha reportado que la hidroxilamina puede ser reducida a óxido nitroso, por nitrificantes heterotróficos bajo condiciones anóxicas y microóxicas (Richardson y col., 1998). La formación de N_2 puede llevarse a cabo también a partir de nitrito y amonio, bajo condiciones anaerobias, proceso de tipo litoautotrófico, al cual se le conoce como ANAMMOX (Van de Graff y col., 1995) y nitrito, amonio y acetato (Cervantes y col., 1999).

La forma más amigable hacia el entorno en la eliminación de nitrógeno, es el conjunto de la nitrificación y la desnitrificación, ya que el producto final es el N_2 , gas inerte que está presente de manera natural en el ambiente. Estos procesos, si se controlan adecuadamente,

permiten eliminar nitrógeno en forma de amonio y nitrato (Knowles, 1982). Los procesos fisicoquímicos sólo transportan el problema hacia otro lugar del ambiente.

Eliminación biológica de nitrógeno por desnitrificación

Las bacterias desnitrificantes (la mayoría del tipo facultativo) pueden usar el nitrato como un aceptor alternativo de electrones, generalmente en ausencia de oxígeno o en muy baja presión del mismo (Mateju y col, 1992). La reducción de nitrato a nitrógeno gaseoso (N_2O y N_2), en ambientes terrestres y acuáticos, es llamada desnitrificación. Este proceso tiene una considerable importancia ecológica con efectos tanto benéficos como nocivos.

Microbiología de la Desnitrificación

Microbiológicamente sólo se consideran como bacterias desnitrificantes a aquéllas que reducen el nitrato a nitrógeno atmosférico (N_2) u óxido nitroso (N_2O). Las bacterias que sólo reducen el nitrato a nitrito no pueden considerarse desnitrificantes (Gaudy y Gaudy, 1981). Los géneros más citados, en los cuales se ha estudiado la actividad desnitrificante incluyen a los géneros: *Alcaligenes*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Thiobacillus* y *Thiosphaera*, entre otros (Tabla 2). Muchos son órganotótrofos y otros pueden litótrofos que utilizan hidrógeno o compuestos azufrados reducidos (Tiedje, 1988). Por esto se considera a la desnitrificación de dos tipos: la desnitrificación organotrófica y la litoautotrófica.

Tabla 2. Géneros bacterianos con capacidad desnitrificante (Cuervo, 2003).

Género	Características	Género	Características
<i>Pseudomonas</i>	Heterótrofas	<i>Rhodopseudomonas</i>	Fotótrofas
<i>Alcaligenes</i>	aerobias		
<i>Flavobacterium</i>			
<i>Paracoccus</i>			
<i>Azospirillum</i>	Heterótrofas	<i>Paracoccus</i>	Litoautotrofas
<i>Bacillus</i>	Fermentativas	<i>Pseudomonas</i>	de H_2
<i>Wolinella</i>			
<i>Rhizobium</i>	Heterótrofas	<i>Thiobacillus</i>	Litoautótrofas que
<i>Rhodopseudomonas</i>	Fijadoras de N_2	<i>Thiospaera</i>	utilizan S^{2-}
<i>Agrobacterium</i>		<i>Thiomicrospira</i>	
<i>Neisseria</i>	Heterótrofas	<i>Nitrosomonas</i>	Litoautótrofas que
<i>Kingella</i>	Patógenas		utilizan NH_4^+
<i>Wollinella</i>			

Bioquímica de la desnitrificación

La desnitrificación es un proceso respiratorio donde el último aceptor de electrones es el nitrato en lugar del oxígeno, por lo que se le considera un proceso de tipo anóxico. De la oxidación de fuentes orgánicas o inorgánicas, se obtiene una carga eléctrica de cuyo transporte se generará la energía en forma de ATP, necesaria para sostener el crecimiento y/o el mantenimiento microbiano (Ferguson, 1998). Todo el mecanismo para obtener energía implica reacciones de óxido-reducción.

Metabólicamente el primer paso en el proceso desnitrificante es la reducción de un transportador de electrones que puede donarlos. Una posible ruta de este primer paso se muestra en la Figura 2.

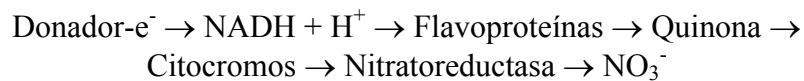


Figura 2 Posible ruta de inicio de la desnitrificación.

La reducción de nitrato se realiza en cuatro pasos como se puede observar en la Figura 3.

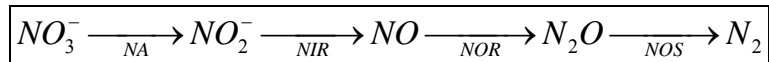


Figura 3. Reducción del nitrato en un proceso desnitrificante: NA = nitrato reductasa, NIR = nitrito reductasa, NOR = óxido nítrico reductasa, NOS = óxido nitroso reductasa.

Enzima nitrato reductasa

El primer paso es la reducción de nitrato a nitrito por la nitrato reductasa (NA), que emplea como cofactor al molibdeno (Stouthamer, 1976; Kroneck y col., 1992; Ferguson, 1998). Se ha visto que este cofactor puede formar fácilmente complejos y la enzima perder su actividad. Existen tres distintas subclases de nitrato reductasa, pero en el proceso desnitrificante generalmente se reportan sólo dos: la NarGHI que se encuentra en el citoplasma anclada a la membrana y la NapABC que se localiza en el espacio periplásmico (Figura 4) (Richardson y Watmough, 1999). Dependiendo del género bacteriano, se pueden tener una o ambas reductasas. La NarGHI es de tipo respiratorio, ya que acopla la

oxidación de dos tipos diferentes de quinona, la ubiquinol (UQH₂) o menaquinona (MQ) a la generación de un gradiente protón motriz (Δp) que sirve para la producción de ATP; mientras que la NapABC, no está acoplada a la formación del Δp . En lugar de eso, puede servir para disipar el exceso de reducción celular, durante el crecimiento en sustratos carbonados reducidos (Sears y col., 1997).

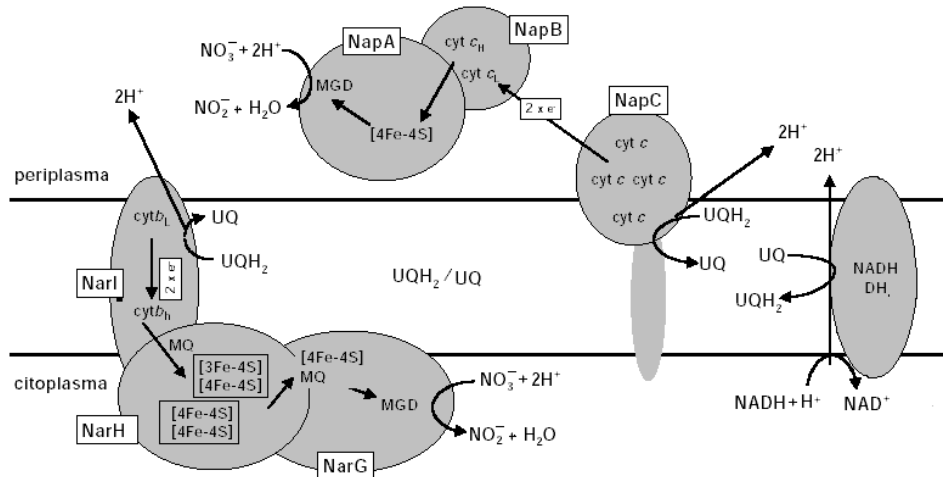


Figura 4. Nitrato reductasa respiratoria (NarGHI) y nitrato reductasa desasimilativa (NapABC) según Richardson y Watmough (1999).

La NarGHI es un ejemplo de la familia de enzimas bacterianas hierro-azufre-molibdeno y se compone de tres subunidades (Figura 4). La NarI se encuentra anclada a la membrana citoplásmica y es un citocromo b con dos grupos hemo-*b* unidos. Estas subunidades tienen la función de realizar la transferencia de electrones para la catálisis de la reacción de óxido-reducción. Los potenciales redox ($E_{m,7.0}$, pH 7) para la subunidad I en los hemo *b_L* y *b_H* son +20 mV y +125 mV respectivamente (Rothery y col., 1999). Esta subunidad se encuentra unida a la proteína NarH que contiene tres grupos [4Fe/4S] y uno [3Fe-4S] que transfieren los electrones de NarI a NarG. Los potenciales ($E_{m,8.0}$, pH 8) que se han encontrado para esta proteína son de +180 mV, y en algunos casos +100 mV para el grupo [3Fe-4S] y de +130, -55, -400 mV en los tres grupos [4Fe-4S]. La proteína NarG contiene molibdeno (Mo) como cofactor y un centro Fe-S en forma de bis-molibdenoproteína guanina dinucleótido (Mo-MGD), éste es el sitio activo de la enzima donde se reduce el nitrato a nitrito (Magalon y col., 1998). Se ha propuesto que los electrones provenientes de NarH

pasan a [4Fe-4S] y de ahí a la Mo-MGD reduciéndose; los potenciales ($E_{m,8.0}$, pH 8) para los estados de oxidación de Mo-MGD son de +195 mV para Mo(V/VI) y de +95 mV para Mo(IV/V) (Magalon y col., 1998; Rothery y col. 1998). El potencial redox de nitrato a nitrito es de +420 mV.

La otra nitrato reductasa, que se ha identificado como desasimilativa se localiza en el periplasma (Figura 4). La NapABC al igual que la NarGHI se compone de tres unidades. La NapC obtiene los electrones de la oxidación del ubiquinol o menaquinona para luego transferirlos a la Nap AB (Cartron y col., 2002). La proteína NapC es un citocromo c tetrahemo con potenciales redox ($E_{m,8.0}$, pH 8) de -56, -181, -207 y -235 mV (Roldan y col., 1998). La NapB contiene dos citocromos c con potenciales redox ($E_{m,7.0}$, pH 7) de -15 y +80 mV (Berks y col., 1994) y acopla el transporte de electrones entre NapC y NapA. Por ultimo, se tiene a la subunidad NapA que es similar a la NarG (que contiene al sitio activo (MGD) para la reducción del nitrato a nitrito y se pueden considerar los mismos potenciales redox (Figura 4).

Enzima nitrito Reductasa

El segundo paso en el proceso desnitrificante es la reducción del nitrito a óxido nítrico por la nitrito reductasa (NIR). De esta enzima se han encontrado dos tipos, la cd_1 NIR y la CuNIR, ambas están localizadas en el periplasma (Figura 5) (Godden y col., 1991; Jetten y col., 1997). El cobre de la enzima puede también formar complejos. Nunca se han encontrado ambas en el mismo género y ambas se consideran respiratorias (Richardson y Watmough, 1999). El citodromo cd_1 NIR es un dímero, que contiene un grupo hemo c y un hemo d_1 . Los potenciales redox ($E_{m,7.0}$, pH 7) son +290 mV y +242 mV, respectivamente (Silvestrini y col., 1994). El mecanismo de reacción que se propone habla de la coordinación entre el NO_2^- y el hierro del hemo d_1 , acoplado a la pérdida de oxígeno en forma de agua, conduciendo a la formación de un intermediario nitrosil hemo d_1 [$Fe_{II}-NO + T Fe_{III}-NO\bullet$]. El ciclo catalítico se completa cuando se transfiere un electrón del hemo c al hemo d_1 y se libera el óxido nítrico (Wasser y col., 2002; Averill y Tiedje, 1982).

La segunda nitrito reductasa CuNIR, es una metaloenzima, un homotrímero que tiene tres centros de cobre tipo Cu(I) y uno Tipo Cu(II) (en el cual los ligandos derivados de la proteína son cisteína, dos histidinas y una metionina) (Dodd y col., 1982) (Figura 5). Uno de los mecanismos propuestos para la reducción en esta enzima es que el nitrito se une al centro Cu(I) reducido (aunque el NO_2^- se puede ligar a Cu(II), que podría reducirse entonces a Cu(I)). El nitrito se protona y se libera agua produciendo $Cu(I)-NO^+$, a esta especie le seguiría la formación de un radical $Cu(II)-NO\bullet$ inestable que libera el óxido nítrico (Averill y col., 1996). Los potenciales redox (E_m , 7.0, pH 7) para esta enzima son para Cu(I) de +240 mV y para Cu(II) +260 mV (Kohozuma y col., 1993; Suzuki y col., 1994). El potencial redox ($E_m,7.0$, pH 7) de nitrito a óxido nítrico es de +320 mV.

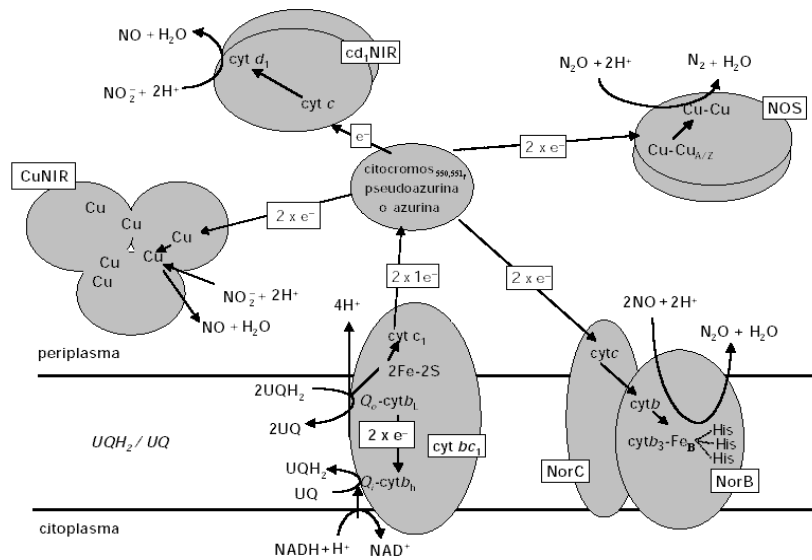


Figura 5. Enzimas desnitrificantes: Nitrito Reductasas (cd_1 NIR y CuNIR), Óxido Nítrico Reductasa (Nor) y Óxido Nitroso Reductasa (NOS) según Richardson y Watmough (1999). La presente figura muestra como se transportan los electrones provenientes del $NADH_2$ a las enzimas desnitrificantes a través del citocromo bc_1 y transportadores de electrones como los citocromos $_{550,551}$, la azurina o la pseudoazurina.

Óxido nítrico reductasa

El tercer paso desnitrificante es la reducción del óxido nítrico a óxido nitroso, por la enzima óxido nítrico reductasa (NorBC), la cual está anclada a la membrana periplásmica y está involucrada en la formación de un enlace N-N (Carr y Ferguson, 1990) (Figura 5). La NorBC se compone de dos unidades, la primera unidad, la NorC, es un citocromo c unido a la membrana periplásmica y recibe los electrones que transporta a la segunda unidad, la NorB, que es la que contiene el sitio activo. Esta enzima transmembranal, también es un citocromo que une dos unidades hemo b y un centro de hierro no hemo (Fe_B), unido a histidinas que junto con los dos grupos hemo tipo b , ensambla el sitio activo, un centro dinuclear de hierro donde dos moléculas de NO se reducen a N_2O ($[Fe(II)-NO-NO-Fe(II)]$) liberando agua (Figura 5) (Berks y col., 1995; Hendriks y col., 1998; Wasser y col., 2002). Los potenciales redox ($E_{m,7.6}$, pH 7.6) son de +280 mV, para el citocromo c de la subunidad NorC y +345 mV del citocromo b , +60 mV del citocromo b_3 y +320 mV del Fe_B de la subunidad NorB (Figura 5) (Grönberg y col., 1998). El potencial redox para la reducción de óxido nítrico a óxido nitroso es de +1117 mV.

Enzima óxido nitroso reductasa

Por último, para cerrar el proceso desnitrificante, la reducción de óxido nitroso a nitrógeno (atmosférico) molecular, la realiza la óxido nítrico reductasa (NOS, Figura 5). La NOS es un dímero que contiene cobre (Cu_A y Cu_Z). La Cu_A es un dímero $[Cu(II)Cu(I)]$ $[/]$ $[Cu(I)Cu(I)]$ unido a un thiolato y la Cu_Z es lo mismo, pero con diferente estado de oxidación del centro de cobre del dímero $[Cu(II)Cu(II)]$ $[y]$ $[Cu(II)Cu(I)]$. Se ha observado que Cu_A puede ser el centro de transporte de electrones y Cu_Z es el centro catalítico. Los potenciales redox ($E_{m,7.5}$, pH 7.5) son de +260 mV para Cu_A y +60 mV para Cu_Z (Farrar y col., 1998). El potencial redox para la reducción de óxido nitroso a nitrógeno atmosférico es de +1770 mV.

Las *cd₁Nir*, la CuNIR, la NorBC y la NOS obtienen los electrones de transportadores en común que son la pseudoazurina ($E_{m,7.0} = +230$ mV) (Martinkus y col., 1980), el citocromo *b₅₅₀* ($E_{m,7.0} = +256$ mV) (Samyn y col., 1994), el citocromo *b₅₅₁* ($E_{m,7.0} = +286$ mV) (Horio y col., 1960) y/o la azurina ($E_{m,7.0} = +274$ mV) (Hwang y col., 2004). Estos transportadores a su vez, toman los electrones del citocromo de tipo *bc₁* que oxida el ubiquinol de la membrana citoplasmática (Parsonage y col., 1986), como se puede observar en la Figura 5 (Pearson y col., 2003).

Como el flujo de electrones se realizará del potencial más negativo hacia el más positivo, debe existir un orden termodinámico de potenciales redox, para que se lleve a cabo la transferencia (espontánea) de la carga eléctrica, independiente del mecanismo de reacción de la enzima. Esto se observa claramente con los valores de los potenciales de las configuraciones de las cuatro enzimas desnitrificantes. El poder reductor con el que operan estas enzimas, parece provenir del $NADH + H^+$ que suele producirse en la oxidación de compuestos orgánicos o inorgánicos. Este poder reductor se puede acoplar a la producción de ATP, en la cadena respiratoria desnitrificante (Figura 5). Es aquí donde se puede observar un ejemplo de la importancia que representa del potencial redox en procesos microbianos.

Factores que afectan la desnitrificación

A menudo se puede presentar acumulación de intermediarios no deseables en la desnitrificación y esto depende de las condiciones en las cuales se lleve a cabo el proceso. Se considera que los tres factores primordiales que inducen y controlan al sistema desnitrificante son: la baja presión de oxígeno, la presencia de nitrato y controles globales que permiten la expresión controlada de la ruta desnitrificante. También ejercen un efecto significativo el tipo de fuente de electrones, la relación carbono-nitrógeno (C/N, estequiométrica), la temperatura, el pH, y algunos nutrientes necesarios como cofactores (específicamente la concentración de Mo y Cu) (Berks y col., 1995; Cervantes y col., 1998; Cuervo, 2003).

El tipo de fuente de electrones es parte importante, debido a que no todas las fuentes se metabolizan de la misma manera, ni con una velocidad similar. Además, el aporte energético es siempre diferente (Mateju y col., 1992). Hay evidencia de que la materia orgánica persistente, por ejemplo, el benceno, tolueno o xileno los (BTX) y los cresoles, puede ser utilizada como fuente de electrones, en la desnitrificación, pero suele ser un proceso lento (Cervantes y col., 2001, Peña-Calva y col., 2005). Adicionalmente la relación C/N es un factor que puede dirigir el metabolismo a la asimilación o la desasimilación y/o rutas alternas entre ellas, como el caso de la RDNA. Cuando la relación C/N es muy grande, el nitrato alcanza un grado de reducción mayor que simplemente a N_2 , produciéndose amonio. Teniendo un buen manejo de la relación C/N, la desnitrificación podrá ser principalmente desasimilativa, no habrá formación de biomasa. En general, la desnitrificación desasimilativa se lleva a cabo con relaciones C/N bajas. Se ha visto que cuando la relación C/N está muy cerca de los valores estequiométricos en la reducción de nitrato a nitrógeno atmosférico, se presenta una acumulación de nitrito (Bernet y col., 1995; Berks y col., 1995; Oh y Silversten, 1999).

Algunas evidencias muestran que la desnitrificación, puede llevarse a cabo, en un amplio intervalo de temperaturas desde 5 a 35°C. La temperatura tiene efecto sobre el crecimiento bacteriano, así como la velocidad y eficiencia de consumo de nitrato. La desnitrificación procede a una velocidad muy baja a 5°C. Por arriba de 20 °C, se ha observado que la

velocidad es constante y mayor. Se recomienda trabajar entre 20 y 35 °C para obtener una velocidad adecuada (Sorensen y Jorgensen, 1993; Cuervo, 2003). Con respecto al pH se ha visto que en la mayoría de los sistemas (con consorcios microbianos), la velocidad desnitrificante se ve inhibida a valores de pH menores que 6 y por arriba de 9. Varios autores han encontrado altas velocidades y altos rendimientos de desnitrificación a valores de pH de 7.0 a 7.5 (Halling-Sorensen y Hjulser, 1992; Sorensen y Jorgensen, 1993; Pérez-Trevilla, 1998).

Desnitrificación y oxidación de materia orgánica

Entre los procesos de tratamiento de aguas, la desnitrificación es notable, siendo después de la respiración con oxígeno, el proceso respiratorio con mayor rendimiento energético en la naturaleza (Strohm y col., 2007). Esto hace a la desnitrificación una buena candidata para la eliminación de compuestos carbonados de tipo persistente. En la desnitrificación organotrófica, como se mencionó anteriormente, la energía libre de Gibbs (ΔG) se deriva de la oxidación de compuestos orgánicos. Esta oxidación dependiendo de las condiciones ambientales, se puede llevar hasta la formación de CO_2 . Existen diversos reportes acerca de los diferentes tipos de materia orgánica que se pueden oxidar mediante el proceso desnitrificante (Tabla 3). Sin embargo, en la mayoría de los casos no se especifica si el nitrato se redujo completamente a nitrógeno molecular. Muchos de estos reportes no presentan balances de materia o evidencia que indique los productos finales. Podría parecer aventurado mencionar que la oxidación de esos compuestos se llevó a partir de compuestos que se pueden oxidar bajo la reducción del nitrato.

Tabla 3. Compuestos que se mencionan ser oxidados bajo condiciones desnitrificantes.

Compuestos carbonados		Referencias	
Alifáticos halogenados	Tetracloruro de carbono	Bouwer y McCarty	1983
	trihalometanos bromados		
	1,2-diclorometano	Semprini <i>y col.</i>	1992
Compuestos aromáticos fluorados	Cloruro de vinilo		
	2-fluorobenzoato	Vargas <i>y col.</i>	2000
Hidrocarburos poliaromáticos BTX's	4-fluorobenzoato		
	Naftol, naftaleno, acenafteno, bifenilo,	Mohelcic y Lutthy	1988
	dibenzofurano y fenantreno.	Rockne y Strand	1998
	Tolueno, etilbenceno, xilenos, 1,2,4-	Evans	1991
	trimetilbenceno	Hutchins	1991
<i>n</i> -alcanos C ₁₂ -C ₁₅		Fukui <i>y col.</i>	2000
		Peña-Calva <i>y col.</i>	2005
	Hexano, alquilbencenos,	Rabus y Widdel	1996
	<i>n</i> -hexadecano	Rabus <i>y col.</i>	1999
		Fukui <i>y col.</i>	2000
Fenoles		Chayabutra y Ju.	2000
	Fenol, <i>m</i> -cresol, <i>p</i> -cresol.	Bossert y Young	1986
		Tscheck y Fuchs	1987
Cetonas		Ramanand y Suflita	1991
	Acetona, metil-etil cetona, metil isobutil	Mormille.	1994
	cetona, ácido fenil acetico.	Cozzarelli <i>y col.</i>	1995
Alcoholes	Cumeno	Acton y Barrer	1992
	Metanol, etanol, butanol, propanol,	Monteith <i>y col.</i>	1980
	pentanol, glicol	Wilson <i>y col.</i>	1985
Otros		Lewandowski	1985
	Succinato y glutamato	Sacks y Barker	1952
	Nitrobenceno	Lyngkilde y	1992
		Chistensen	
	Piridina	Ronen y Bollag	1992
Estireno	Fu y Alexander	1996	

De las sustancias húmicas a las quinonas

El humus constituye una clase abundante de materia orgánica que es químicamente heterogénea, además, esta ampliamente distribuida en los ambientes terrestres y acuáticos (Field *y col.*, 2000). Las sustancias húmicas (SH) provienen de la repolimerización y biotransformación de fenol y compuestos aromáticos, que resultan de la descomposición de plantas y residuos animales. No pueden ser clasificadas en categorías discretas como polisacáridos, proteínas o polinucleótidos. Las SH son macromoléculas complejas que consisten de una serie homogénea de estructuras aromáticas y alifáticas, enlazadas de forma cruzada por medio de oxígeno o nitrógeno. Son bastante estables y la mayoría no son biodegradables. En general, las SH pueden ser aisladas sin problemas de casi todos los

suelos, aguas y sedimentos. Comprenden tres componentes básicos: huminas, ácidos húmicos y ácidos fúlvicos. Estos componentes están clasificados de acuerdo a su solubilidad. Las huminas son muy poco solubles a todos los valores de pH, los ácidos húmicos son poco solubles por debajo de un valor de pH de 2 y los ácidos fúlvicos son solubles a todos los valores de pH (MacCarthy y col., 1990). Se ha encontrado que este tipo de sustancias tienen una importante interacción con la biota, sobre todo en las reacciones bioquímicas, interaccionando con otros compuestos que pueden regular el crecimiento de microorganismos y plantas (Frimmel y Christman, 1988).

Los grupos funcionales que contienen las SH son los que determinan sus características físicas y químicas. Estos grupos varían dependiendo del origen y edad de la materia húmica. La mayoría de esos grupos funcionales son ácidos carboxílicos, fenoles, hidroxilos de alcoholes y grupos de quinonas. Su estructura les permite a las SH, unirse a materiales hidrofóbicos e hidrofílicos, por lo cual juegan un papel importante en el destino y transporte de metales pesados e hidrocarburos contaminantes del ambiente (Frimmel y Christman, 1988). Los grupos funcionales que contienen las SH, les permiten tener actividad redox, la cual varía de acuerdo al potencial de óxido-reducción que presenten. Un ejemplo de la variabilidad que puede presentar las SH son los valores de potencial de óxido-reducción, los cuales presentan intervalos de -200 mV a + 300 mV y +328 mV a +780 mV (Visser, 1964; Szilagyi, 1973; Österberg and Shirshova, 1997; Hernandez and Newman, 2001; Struyk and Sposito, 2001; Coates *et. al.*, 2002). Por sus cualidades redox, las SH pueden obtener y transferir electrones de compuestos orgánicos o inorgánicos reducidos a varios metales pesados, aromáticos nitrogenados y solventes clorados (Bradley y col., 1998; Lovley y Blunt-Harris, 1999b). Se ha demostrado que las quinonas son los grupos con la actividad redox en las SH (Scott y col., 1998; Newman y Kolter, 2000). Se ha usado a la 2,6-disulfonato de antraquinona (AQDS) (Figura 6) como un modelo de estudio, debido a que ha presentado resultados similares a aquellos obtenidos en SH (Lovley y col., 1999a). Esto ha hecho que la mayoría de los trabajos relacionados con el tema sean basados en estudios con quinonas.

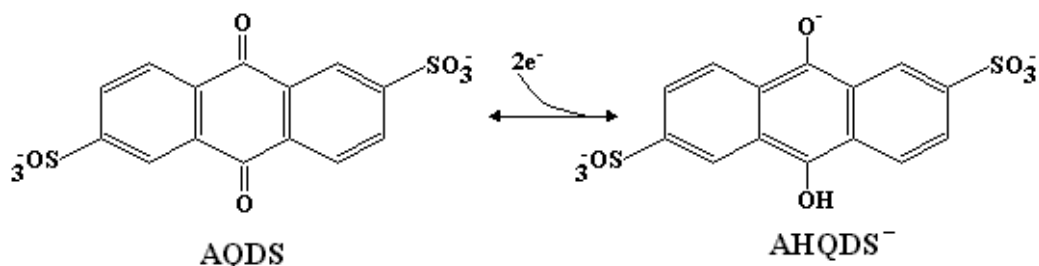


Figura 6. La 2,6 disulfonato de antraquinona, A) forma oxidada, AQDS, B) forma reducida AHQDS

Papel de las sustancias húmicas y quinonas en los procesos biogeoquímicos

Al la fecha se han hecho importantes esfuerzos para estudiar las contribuciones y los alcances de las quinonas y SH en los procesos biogeoquímicos, parte de eso ha sido revisado por Field y Cervantes (2005). Se ha encontrado que las quinonas y SH pueden participar en tres formas: como aceptores de electrones en respiración, como mediadores redox para procesos de reducción y como donadores de electrones en procesos microbiológicos (Field y col., 2002). De acuerdo a estas características, las quinonas y SH han sido ampliamente estudiadas por su aplicación potencial en procesos de bioremediación. Algunas evidencias muestran que los microorganismos que utilizan a las SH y AQDS, ya sea en forma reducida u oxidada, están ampliamente distribuidas en los ecosistemas, por lo cual son diversos los ciclos biogeoquímicos en los que pueden participar (Coates y col. 1998; 2002, Cervantes y col., 2007). Los estudios con quinonas y SH están siendo enfocados principalmente en el metabolismo anaerobio de las bacterias.

La reducción de las SH y de la quinona modelo AQDS podría ser acoplada por los microorganismos a la oxidación de materia orgánica persistente. Compuestos como el benceno, tolueno, metil-terbutil-eter (MTBE), compuestos fenólicos y clorados han sido oxidados mediante procesos respiratorios con SH y/o AQDS (Lovley 1996b; Bradley y col. 1998; Cervantes y col., 2000b, 2001; Finnerand y Lovley, 2001; Cadena y col., 2007). Hay evidencias de que la respiración con quinona, suele ser más favorable que la metanogénesis para materia orgánica de importancia ecológica (Cervantes y col., 2000c). Se ha observado que los procesos de oxidación de materia orgánica con quinonas y HS parecen ser amigables al ambiente, ya que todos se dirigen oxidación con la formación de CO₂, mientras que la metanogénesis produce CH₄.

La AQDS puede mediar la reducción de metales de forma abiótica, acoplándose a procesos respiratorios, tal como la oxidación de materia orgánica (Lovley y col., 1996a, 1998; Lovley y Blunt-Harris, 1999b). Reducidos microbiológicamente, diferentes tipos de quinonas y HS pueden reducir colorantes azoicos a aminas aromáticas ausentes de color. Cabe mencionar que algunos procesos de reducción de colorantes se ven incrementados en su velocidad en presencia de este tipo de mediadores con respecto a cuando no se adicionaron (Kudlich y col., 1997; van der Zee y col., 2001, 2002; Dos Santos y col., 2007). Asimismo, hay trabajos donde se muestra que la forma reducida de las SH y la AQDS reducida, pueden servir como donadores de electrones para el proceso desnitrificante, la RDNA, la respiración con fumarato, arsenato y selenato (Lovley y col., 1999a; Coates y col., 2002). Sin embargo, la mayoría de los estudios comparan el efecto de la quinona AQDS con efectos de SH altamente purificadas y bien caracterizadas, las cuales se alejan de las SH encontradas en la naturaleza. Este podría ser un factor limitante en la aplicación de SH en tecnologías de bioremediación, por lo que es recomendable hacer más estudios, para determinar con más certeza el rol que juegan en los procesos biogeoquímicos y su vez poder hacer propuestas mejores con estas sustancias. Una forma de abordarlo sería estudiando otros tipos de quinona con diferentes estructuras químicas y capacidades redox.

Las quinonas en el proceso desnitrificante.

Como se había mencionado anteriormente, entre los diferentes procesos microbianos aplicados al tratamiento de aguas para la eliminación de materia orgánica, la desnitrificación es una alternativa notable, porque a diferencia de la metanogénesis, en aquel proceso se elimina simultáneamente nitrógeno y carbono, y puede incluirse los compuestos reducidos del azufre (Reyes y col, 2004; Beristain y col 2008). Además, es bien conocido que las quinonas tienen una participación importante en la desnitrificación, ya que están intrínsecamente implicadas en el transporte de electrones de la cadena respiratoria anóxica. Algunos ejemplos de ello son la menaquinona y la ubiquinona (Kröger y col., 1971; Sasarman y col., 1974). Esta característica hace a la desnitrificación un buen candidato para la aplicación de SH y/o quinonas, dado que este tipo de sustancias han mejorado algunos procesos microbianos vía reacciones redox. Hay algunos trabajos acerca

de las posibles contribuciones de las SH, aunque en general la mayoría de los estudios han sido ejecutados con la AQDS.

Se ha visto que la AQDS en su forma reducida puede servir como donador de electrones promoviendo el consumo de nitrato, incluyendo los intermediarios de la ruta desnitrificante, como son el nitrito o el óxido nitroso (Lovley y col., 1999; Coates y col., 2002; Aranda-Tamaura y col., 2007). La reducción de nitrato también puede ser dirigida a amonio cuando hay un exceso de poder reductor de la AHQDS (Lovley y Phillips, 1988). Lovley y colaboradores (1999) señalan la reducción del nitrato a nitrógeno molecular con AHQDS, por la cepa *Paracoccus denitrificans*, mientras que la *Pseudomonas denitrificans* no pudo realizarlo. Aunque resultados de Coates y colaboradores (2002), indican que hay una gran diversidad de géneros bacterianos capaces de acoplar la oxidación de AHQDS a la reducción de nitrato. Por otro lado, hay estudios donde diferentes inóculos tuvieron la habilidad de utilizar AQDS, SH y nitrato como aceptor final de electrones, algunos han sido con cultivos axénicos y otros no tienen caracterización bien definida (Lee y col., 2000; Cervantes y col., 2001; Myers y Myers, 2004). Cervantes y col., (2007) mostraron evidencia de que la AQDS y el nitrato pueden ser reducidos simultáneamente por diferentes lodos anaeróbicos y sedimentos, en los cuales el proceso desnitrificante siempre fue predominante, aunque no había un comportamiento fisiológico bien definido con los inóculos utilizados. Cadena y colaboradores (2007) mostraron que un lodo desnitrificante fisiológicamente estable fue capaz de acoplar la oxidación de acetato y *p*-cresol a la reducción de AQDS, en ausencia de nitrato.

En general, la mayoría de los trabajos existentes describen el efecto que parecen tener las quinonas en los procesos microbiológicos por medio de su potencial redox. Sin embargo, poco se ha estudiado y entendido acerca del efecto que puede realmente tener, dado que las quinonas pueden actuar a dos niveles en la transferencia de los electrones, que parece ser a nivel extracelular o intracelular.

Las quinonas y el transporte de electrones

El transporte de electrones o movimiento del potencial reductor es fundamental en el metabolismo celular. Cada tipo microbiano debe resolver el problema de generación de energía para sobrevivir. Las rutas más productivas para la generación de energía, involucran el establecimiento de una fuerza protón-motriz a través de la membrana citoplasmática para la formación de ATP. La mayoría de los estudios en transferencia de potencial reductor están enfocados en macromoléculas con actividad redox que están embebidas o asociadas con membranas, y es aquí donde las quinonas y SH parecen estar jugando un papel importante.

En los estudios donde se ha encontrado que las bacterias pueden respirar utilizando minerales poco solubles, se ha dirigido la atención a moléculas que están involucradas en el transporte extracelular de electrones (Newman y Kolter., 2000; Nevin y Lovley, 2002). Algunos ejemplos de ello son los géneros *Geobacter sulfurreducens*, *G. metallireducens*, *Shewanella putrefaciens*, y *Pelobacter propionicus* los cuales son capaces de producir proteínas extracelulares unidas a la membrana externa y parecen estar involucradas en el transporte de electrones; también pueden formar pili, los cuales se consideran funcionar como nanoconductores de electrones (Myers y Myers, 1992; Seelinger y col., 1998; Beliaev y Saffarini, 1998; Leang y col. 2003; Reguera y col., 2005).

Se conocen tres formas de cómo los microorganismos transportan el potencial reductor a través de la membrana externa: una de ellas es directamente a compuestos oxidados poco solubles, o bien a los microorganismos; otra, es por medio de moléculas de quinona, que a su vez pueden ser de dos tipos, producidas propiamente por los microorganismos, como la menaquinona y la fenazina, o bien, son adicionadas en el medio de cultivo como la vitamina K₂, la AQDS y las SH (Ingram y Blackwood, 1970; Lovley y col., 1998; Newman y Kolter, 2002; Saffarini y col., 2002). La tercera es que los microorganismos puedan aceptar electrones de las sustancias húmicas reducidas y la AHQDS en el exterior de la célula (Lovley y col., 1999a).

Dada esta propiedad de los microorganismos, de transportar extracelularmente corriente, se ha observado que se pueden oxidar compuestos orgánicos en cultivos microbianos, con

electrodos (con potenciales redox positivos) utilizándolos como aceptores finales de electrones (Bond y col., 2002; Bond y Lovley, 2003). Los electrodos pueden ser utilizados también como donadores de electrones (con potenciales redox negativos) en la respiración anaerobia. Recientemente, se ha podido acoplar estos sistemas a la desnitrificación con *Pseudomonas denitrificans*, y a la reducción de nitrato a nitrito con *Geobacter metallireducens* (Gregory y col., 2004; Beschkov y col. 2004). En otros trabajos han explorado esta habilidad que pueden presentar los microorganismos como una alternativa tecnológica, acoplando los electrodos a la desnitrificación, por medio de la producción de hidrógeno en la superficie del electrodo como donador de electrones (Sakakibara y Kuroda, 1993; Kuroda y col., 1996; Feleke y col., 1998; Sakakibara y Nakayama, 2001). No obstante, en esos trabajos no se han podido diferenciar la contribución real de los electrodos en este tipo de procesos.

En un estudio se observó que la aplicación de un potencial redox en un cultivo con *Pseudomonas denitrificans* tuvo un efecto en la velocidad de reducción de nitrato. En el fermentador, donde se utilizó como electrodo (cátodo) a las mamparas del reactor, se aplicaron diferentes potenciales, y se observó que se podía modificar de manera positiva la velocidad de reducción del nitrato en presencia de materia orgánica (extracto de levadura) (Beschkov y col., 2004). Se observó que conforme se incrementaba el potencial redox de -200 mV a +10 mV (vs. calomel) aumentaba la velocidad el consumo de nitrato. Mientras que a potenciales mayores (+10 mV a +230 mV, vs. calomel) fue decreciendo la velocidad de reducción. Sin embargo, en ese trabajo no se presenta información de cual fue el destino final del nitrato, además de que no se pudo explicar claramente el efecto del potencial redox debido a la presencia de materia orgánica.

De acuerdo a lo descrito, existe la posibilidad de estudiar y entender el efecto del potencial redox en el metabolismo desnitrificante aplicando potenciales eléctricos directamente en el medio de cultivo por medio de electrodos, junto con el seguimiento de los intermediarios de oxidación y reducción, que pueden traducirse en una respuesta metabólica durante la aplicación de un potencial redox característico. Estudiar la oxidación de materia orgánica y la reducción de nitrato por separado aplicando potenciales eléctricos, con un consorcio

desnitrificante, pueden aportar evidencias permitiendo comprender y entender mejor el efecto a nivel fisiológico y bioquímico de las quinonas. Con un conocimiento más detallado de este tipo de procesos se pueden proponer mejoras en un proceso biológico altamente potencial para la eliminación de compuestos tóxicos en el tratamiento de aguas residuales.

Justificación

A pesar de los trabajos mencionados en esta revisión, son escasos los estudios acerca de la oxidación de materia orgánica de tipo persistente en el proceso desnitrificante, donde se hayan utilizado quinonas como posibles coadyuvantes redox. Por este motivo no hay información que claramente señale de algún beneficio y/o perjuicio que pudieran tener la adición de quinonas a la desnitrificación organotrófica, menos aún con inóculos de comportamiento fisiológico bien definido. Ninguno de los trabajos hasta ahora realizados han evidenciado de manera patente que la desnitrificación se pueda llevar a cabo, con base en balances de nitrógeno que demuestren dónde termina realmente el nitrato reducido. Las quinonas así como las SH pueden tener diferentes contribuciones metabólicas que podrían depender de su estructura química y propiedades fisicoquímicas, por lo cual es imprescindible estudiar otros tipos de quinonas con características fisicoquímicas diferentes.

No está totalmente esclarecido si el efecto de las SH y las quinonas se puede asociar al potencial redox o al tipo de estructura química, como lo han mencionado algunos autores (Rau y col., 2002). Por lo cual sería interesante estudiar a qué nivel bioquímico-fisiológico, actúan este tipo de sustancias y tratar de entender el papel que puede jugar su potencial redox. En virtud de la hipótesis de que es el potencial de las quinonas el que les confiere la propiedad de modificar el metabolismo y las velocidades, una forma de entender y comprender el efecto de las quinonas en el proceso desnitrificante con materia orgánica, podría ser aplicando directamente en el cultivo microbiano su potencial redox por medio de electrodos. De esta forma podrían eliminarse posibles contribuciones de la estructura química de la molécula; y por comparación de los estudios con quinonas y con potencial redox, generar información útil sobre su contribución en procesos microbianos y participar en el entendimiento de las quinonas y SH en los procesos biogeoquímicos.

Bibliografía

Acton D.W. y Barker J. F. (1992). *In situ* biodegradation potential of aromatic hydrocarbons in anaerobic groundwaters. *J Contam Hydrol* 9:325-52

Aranda-Tamaura, C., Estrada-Alvarado, M. I., Texier, A.-C., Cuervo, F., Gómez J., Cervantes F. J. (2007). Effects of different quinoid redox mediators on the removal of sulphide and nitrate via denitrification. *Chemosphere* 69:1722–1727.

Averill B. A. y Tiedje J. M. (1982). The chemical mechanism of microbial denitrification - a hypothesis. *FEBS Lett.* 138:8-12.

Averill B. A. (1996). Dissimilatory Nitrite and Nitric Oxide Reductases. *Chem Rev.* 96:2951.

Beliaved A., Saffarini D. A. (1998), *Shewanella putrefaciens mtrB* Encodes an Outer Membrane Protein for Fe(III) and Mn(IV) Reduction. *J Bacteriol.* 180(23):6292-6297.

Berks, B. C., Richardson, D. J., Robinson, C., Reilly, A., Aplin, R. T. and Ferguson, S. J. (1994) Purification and Characterization of the Periplasmic Nitrate Reductase from *Thiosphaera pantotropha*. *Eur J Biochem.* 220:117-124

Berks, B. C., Ferguson, S. J., Moir, J. W. B., y Richardson, D. J. (1995), Enzymes and associated electron transport systems that catalyse the respiratory reduction of nitrogen oxides and oxyanions. *Biochim Biophys Acta* 1232:97-173.

Bernet N., Bizeau C., Moletta R., Cornier J. C. y Deguin A. (1995). Study of Physicochemical Factors Controlling Nitrite Build-Up during Heterotrophic Denitrification. *Environ Technol.* 16:165-172

Beschkov V., Velizarov S., Agathos S.N., Lukova V. (2004). Bacterial Denitrification of Waste Water Stimulated by Constant Electric Field. *Biochem Eng J.* 14:141-145

Bond D. R. y Lovley R. D., (2002). Reduction of Fe(III) Oxide by Methanogens in the Presence or Absence of Extracellular Quinones. *Environ Microbiol.* 4(2):115-124.

Bond, D.R., Holmes, D.E., Tender, L.M., and Lovley, D.R. (2002). Electrode-reducing microorganisms that harvest energy from marine sediments. *Science* 295: 483–485.

Bond, D.R., and Lovley, D.R. (2003). Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes. *Appl Environ Microbiol.* 69: 1548–1555.

Bossert D. I. y Young Y., (1986b). Anaerobic Oxidation of *p*-Cresol by Denitrifying Bacterium, *Appl Environ Microbiol.* 52(5):1117–1122

Bouwer J. E. y McCarty L. P., (1983) Transformations of Halogenated Organic Compounds Under Denitrification Conditions. *Appl Environ Microbiol.* 45(4): 1295-1299.

Bradley M, P., Chapelle H. F., y Lovley R. D. (1998). Humic Acids as Electron Acceptors for Anaerobic Microbial Oxidation of Vinyl Chloride and Dichloroethene, *Appl Environ Microbiol.* 64(8):3102–3105.

Brock, T. y M. Madigan. (1991). Microbiología. 8a. ed. Prentice Hall Hispanoamérica. México. pp.109

Carr, G. y S. Ferguson. (1990). The nitric oxide reductase of *Paracoccus denitrificans*. *Biochem J.* 269:423-429.

Cartron M. L., Roldan M. D., Ferguson S. J., Berks B. C. y Richardson D. J. (2002) Identification of two domains and distal histidine ligands to the four haems in the bacterial c-type cytochrome NapC; the prototype connector between quinol / quinone and periplasmic óxido-reductases, *Biochem J.* 368:425–432.

Cervantes J. F., Monroy F., O., y Gómez J.. (1998). Accumulation of intermediates in a denitrifying process at different copper and high nitrate concentrations. *Biotechnol Lett.* 20:959-961.

Cervantes J. F., Monroy O. y Gomez, J. (1999). Influence of ammonium on the performance of a denitrifying culture under heterotrophic conditions. *Appl Biochem Biotechnol* 81:13-21.

Cervantes J. F., Van der Velde S., Lettinga G. y Field J, A. (2000b). Quinones as Terminal Electron Acceptors for Anaerobic Microbial Oxidation of Phenolic Compounds. *Biodegradation.* 11:313-321.

Cervantes FJ, van der Velde S, Lettinga G, Field JA (2000c) Competition between methanogenesis and quinone respiration for ecologically important substrates in anaerobic consortia. *FEMS Microbiol Ecol.* 34:161-171.

Cervantes J. F., Dijkma W., Duong-Dac T., Ivanova A., Lettinga G. y Field J, A. (2001), Anaerobic Mineralization of Toluene by Enriched Sediments with Quinones and Humus as Terminal Electron Acceptors, *Appl Environ Microbiol*, 67(10): 4471-4478.

Cervantes F. J., Gutiérrez C. H., López K. Y., Estrada-Alvarado M. I., Meza-Escalante E. R., Texier A-C., Cuervo F., Gómez J. (2007) Contribution of quinone-reducing microorganisms to the anaerobic biodegradation of organic compounds under different redox conditions. *Biodegradation.* 19(2): 235-246.

Challis, B. C. y Challis, L. A. (1982). N-Nitrosamines and N-nitrosoimines. En: The Chemistry of Amino, Nitroso and Nitro-compounds and their Derivatives, Ed. S. Patai, Wiley, New York, pp. 1151.

- Chayabutra C. y Ju L. (2000). Degradation of *n*-Hexadecane and Its Metabolites by *Pseudomonas aeruginosa* under Microaerobic and Anaerobic Denitrifying Conditions. *Appl Environ Microbiol.* 66(2):493–498
- Cheremisinof T. P. (1996). *Biotechnology for Waste and Waste Water Treatment*, Noyes Publications, pp. 25-27.
- CNA. (Comisión Nacional del Agua). (2004). Situación de los recursos hidráulicos, en: Estadísticas del Agua en México, 2 ed. pp 28-32, México
- CNA. (Comisión Nacional del Agua). (2003). *Inventario Nacional de Descargas de Aguas Residuales*, Gerencia de Saneamiento y Calidad del Agua. SGT. CNA. México.
- Coates, J. D., D. J. Ellis, E. Roden, K. Gaw, E. L. Blunt-Harris, y D. R. Lovley. (1998). Recovery of humic-reducing bacteria from a diversity of environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:1504–1509.
- Coates J. D., Cole A. K., Chakraborty R, O'Connor S. M., Achenbach L. A. (2002), Diversity and Ubiquity of Bacteria Capable of Utilizing Humic Substances as Electron Donors for Anaerobic Respiration. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(5): 2445–2452
- Cole, J. y C. Brown. (1980). Nitrite reduction to ammonia by fermentative bacteria: a short circuit in the biological nitrogen cycle. *FEMS Microbiol Lett.* 7:65-72.
- Cole, J. A. (1988). Assimilatory and dissimilatory reduction of nitrate to ammonia. En: *The Nitrogen and Sulphur Cycles*. Eds J. Cole and S. Ferguson, Cambridge University Press, pp.281-330.
- Cozzarelli I. M, Herman, JS, and Baedecker, MJ (1995). Fate of microbial metabolites of hydrocarbons in a coastal plain aquifer: the role of electron acceptors. *Environ Sci Technol* 29:458-469.
- Cuervo L. F. de M., (2003) Estudio Biológico-Físicoquímico de un Lodo Desnitrificante Alimentado con Diferentes Fuentes de Electrones. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa, México.
- Dodd FE, Van Beeumen J, Eady RR, Hasnain SS: X-ray structure of a blue-copper nitrite reductase in two crystal forms. (1998). The nature of the copper sites, mode of substrate binding and recognition by redox partner. *J Mol Biol.* 282:369-382.
- Douglass, M. L., Kabacoff, B. L., Anderson, G. A. and Cheng, M. C. (1978). The chemistry of nitrosamine formation, inhibition and destruction. *J Soc Cosmet Chem.* 29:581-606.
- dos Santos A. B., Traverse J., Cervantes F. J., van Lier J. B. (2005) Enhancing the electron transfer capacity and subsequent color removal in bioreactors by applying thermophilic anaerobic treatment and redox mediators. *Biotechnol Bioeng.* 89:42-52

- Evans PJ, DT Mang, y LY Young. (1991). Degradation of toluene and m-xylene and transformation of o-xylene by denitrifying enrichment cultures. *Appl Environ Microbiol* 57: 450-454
- Farrar J. A., Zumft W. G. y Thomson A. J. (1998). CuA and CuZ are variants of the electron transfer center in nitrous oxide reductase. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 95(17) 9891-9896
- Feleke Z, Araki K, Sakakibara Y, Watanabe T, Kuroda M. (1993). Selective reduction of nitrate to nitrogen gas in a biofilm-electrode reactor. *Water Res.* 32(9):2728-34.
- Ferguson J. S. (1998). Nitrogen cycle enzymology, *Curr Opin Chem Biol.* 1998, 2:182-193.
- Field J. A., Cervantes F. J., Van Der Zee S, Lettinga G. (2000) Role of Quinones in Biodegradation of priority pollutants: a Review, *Water Sci Technol.* 42(5-6):215-222.
- Field J. A., Cervantes, F. J. (2005). Microbial redox reactions mediated by humus and structurally related quinones. In Use of Humic Substances to Remediate Polluted Environments: From Theory to Practice; Perminova, I. V., Hatfield, K., Hertkorn, N., Eds.; NATOScience Series IV: Earth and Environmental Sciences 52; Springer: Dordrecht, The Netherlands, Chapter 17, pp 343-352.
- Finneran, K. T. y Lovley D. R. (2001) Anaerobic degradation of methyl tert-butyl ether (MTBE) and tert-butyl alcohol (TBA). *Environ Sci Technol.* 35:1785-1790.
- Frimmel H. F., Chistman F. R. (1988). Humic Substances and Their Role in the Environment, Dahlem Workshop Reports; *Life Sci.* 41:179-192.
- Fu M. H. y Alexander M. (1996) Biodegradation of styrene in waterlogged soils and aquifer solids. *Soil Science.* 161: 846-851.
- Fukui M., Harms G., Rabus R., Schamm A, Widdel F., Zengler K., Boreham K., Wilkes H., (2000). Anaerobic degradation of oil hydrocarbons by sulfate-reducing and nitrate-reducing bacteria. *Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology.* Bell CR, Brylinsky M, Johnson-Green P (ed), Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada, 1999. 41:1-9
- Gaudy F. A. Jr., Gaudy T. E. (1981). Microbiology for Environmental Scientists and Engineers, *Mc-Graw Hill International.*
- Godden, J., S. Turley, D. Teller, E. Adman, M. Liu, W. Payne and J. Legall. (1991). The 2.3 angstrom X-ray structure of nitrite reductase from *Achromobacter cycloclastes*. *Science* 253:438-442.

Gregory K.B., Bond D.R., Lovley D.R., (2004). Graphite Electrodes as Electron Donors for Anaerobic Respiration. *Environ Microbiol.* 6(6):596-604

Grönberg, K. L., M. D. Roldán, L. Prior, G. Butland, M. R. Cheesman, D. J. Richardson, S. Spiro, A. J. Thomson, and N. J. Watmough. (1998). A low redox potential heme in the dinuclear center of bacterial nitric oxide reductase implications for the evolution of energy-conserving heme-copper oxidases. *Biochemistry* 38:13780–13786.

Gummin D. A, Hryhorczuk D. O. (2002) Hydrocarbons. En: Goldfrank L. R., Flomenbaum N. E., Howland M. A. y col., Goldfrank's Toxicologic Emergencies. 7th McGraw-Hill; pp. 1303, New York

Halling-Sorensen B. y Hjuler. H. (1992). Simultaneous nitrification and denitrification with an upflow fixed bed reactor applying clinoptilolite as media. *Wat. Treat.* 7:77-88.

Hartman, P. E. (1983). Nitrate/nitrite ingestion and gastric cancer mortality. *Environ Mutagen.* 5(11):1-121.

Hendriks J., Warne A., Gohlke U., Haltia T., Ludovici C., Lübber M. y Saraste M, (1998). The Active Site of the Bacterial Nitric Oxide Reductase Is a Dinuclear Iron Center. *Biochemistry*, 37:13102-13109

Holmes, D.E., Bond, D.R., O'Neil, R.A., Reimers, C.E., Tender, L.E., and Lovley, D.R. (2004b) Microbial communities associated with electrodes harvesting electricity from a variety of aquatic sediments. *Microb Ecol.* 48:178-190

Hong Z., Hanaki K. y Matsuo T. (1994). Greenhouse gas-N₂O production during denitrification in wastewater treatment. *Water Sci Technol*, 28:203-207.

Horio, T., T. Higashi, M. Sasagawa, K. Kusai, M. Nakai, y K. Okunuki. (1960). Preparation of crystalline *Pseudomonas* cytochrome c-551 and its general properties. *Biochem J.* 77:194–201.

Hutchins S. R. (1991). Optimizing BTEX Biodegradation Under Denitrifying Conditions. *Environ Toxicol Chem.* 10:1437-1448.

Hwang H. J., Ang M., Yi Lu. (2004). Determination of reduction potential of an engineered CuA azurin by cyclic voltammetry and spectrochemical titrations. *J Biol Inorg Chem.* 9: 489–494

Ingram J. M. y Blackwood A. C. (1970). Microbial production of phenazines. *Adv Appl Microbiol.* 13:267–282

Jetten, M., S. Logemann, G. Muyzer, L. Robertson, S. de Vries, M. van Loosdrecht y J. Kuenen. (1997). Novel principles in the microbial conversion of nitrogen compounds. *Antonie van Leeuwenhoek.* 71:75-93.

- Knowles, R. (1982). Denitrification. *Microbiology. Rev.*46:43-70.
- Kohzuma, T., S. Shidara, and S. Suzuki. (1993). Direct electrochemistry of copper-containing nitrite reductase from *Achromobacter cycloclastes* IAM1013. *J Inorg Biochem.* 51:368.
- Kudlich, M., Keck, A., Klein, J. y Stolz, A. (1997) Localization of the enzyme system involves in anaerobic reduction of azo dyes by *Sphingomonas* sp. strain BN6 and effect of artificial redox mediators on the rate of azo dye reduction. *Appl Environ Microbiol.* 63:3691-3694.
- Kuroda M., Watanabe T. and Umedu Y. (1996) Simultaneous oxidation and reduction treatments of polluted water by a bio-electro reactor. *Wat Sci Technol.* 34(9):101–108.
- Kröger A., Dadák V., Klingenberg M., Diemer F. (1971). On the role of quinones in bacterial electron transport differential roles of ubiquinone and menaquinone in *Proteus rettgeri*. *Eur J Biochem.* 21:322–333.
- Kroneck, P. M. M., J. Beuerle y R. W. Schumacher. (1992). Metal-dependent conversion of inorganic nitrogen and sulfur compounds, En: H. Siegel and A. Siegel (ed.). Metal ions in biological systems, 28. *Marcel Dekker*, U.S.A. pp. 455-505.
- Leang, C., Coppi, M.V., and Lovley, D.R. (2003) OmcB, a *c*-type polyheme cytochrome, involved in Fe(III) reduction in *Geobacter sulfurreducens*. *J Bacteriol.* 185: 2096–2103.
- Lee G. I., Kim J. S., y Ahn Y-T (2000) Inhibitory effect of nitrate on Fe(III) and humic acid reduction in *Shewanella putrefaciens* DK-1, *J Microb.* 38:180-182
- Letterman D. R. (1999). Water Quality and Treatment. A Handbook of Community Water Supplies. *Mc-Graw Hill* (pp 211–224).
- Lewandowski, Z. (1985), Denitrification by Packed Bed Reactors in the Presence of Chromium (VI) - Resistance to Inhibition, *Water Res.* 19:589-596.
- Lovley R. D., Coates J. D., Blunt-Harris L. E., Phillips E. J. P. y Woodward J. (1996a). Humics Substances as Electron Acceptors for Microbial Respiration, *Nature* 382:445-448.
- Lovley R. D., Woodward J., Chapelle H. F. (1996b). Rapid Anaerobic Benzene Oxidation with a Variety of Chelated Fe(III) Forms, *Appl Environ Microbiol.* 62(1):288-291.
- Lovley D. R., J. L. Fraga E. L. Blunt-Harris L. A. Hayes, E. J. P. Phillips, y J. D. Coates. (1998). Humic substances as a mediator for microbially catalyzed metal reduction. *Acta Hydroch Hydrob.* 26:152–157.

- Lovley D. R., y Phillips E. J. P. (1988) Novel mode of microbial energy metabolism: organic carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese. *Appl Environ Microbiol.* 54:1472–1480.
- Lovley R. D., Fraga L. J., Coates J. D. y Blunt-Harris L. E. (1999a). Humics as an Electron Donor for Anaerobic Respiration, *Environ Microbiol.* 1(1):89-98
- Lovley R. D. y Blunt-Harris B. (1999b). Role of Humic-Bound Iron as an Electron Transfer Agent in Dissimilatory Fe(III) Reduction, *Appl Environ Microbiol.* 65(9):4252-4254.
- Lyngkilde J. y Chistensen T. H. (1992). Fate of organic contaminants in the redox zones of a landfill leachate pollution plume (Vejen, Denmark). *J Contam Hydrol* 10: 291-307.
- MacCarthy P., Clapp E. C., Malcolm L. R., Bloom R. P. (1990). Humic Substances in Soils and Crop Sciences: Selected Readings. *American Society of Agronomy. Inc., Soil Science Society of America, Inc.* pp 1-11.
- Magalon A, Asso M, Guigliarelli B, Rothery RA, Bertrand P, Giordano G, Blasco F (1998). Molybdenum cofactor properties and [Fe-S] cluster coordination in Escherichia coli nitrate reductase A: investigation by site-directed mutagenesis of the conserved His-50 residue in the NarG subunit. *Biochemistry.* 37:7363-7370.
- Martinkus, K., Kennelly, P. J., Rea, T., y Timkovich, R. (1980) Purification and properties of Paracoccus denitrificans Azurin. *Arch Biochem Biophys.* 199, 465-472.
- Mateju V., Cizinska S., Krejeí J., y Janoch T. (1992). Biological Water Denitrification – A Review, *Enzyme Microb Technol.*, 14:170-183.
- Mohelcic R. J. y Luthy G. R., (1988). Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Compounds under Various Redox Conditions in Soil-Water Systems. *Appl Environ Microbiol.* 54(5):1182-1187
- Monteith HD, Bridle TR, Sutton PM (1980) Industrial waste carbon sources for biological denitrification. *Prog Water Tech.* 12:127– 141
- Mormille M. R. Liu, Shi, y Suflita, JM. (1994) Anaerobic biodegradation of gasoline oxygenated: extrapolation of information to multiple sites and redox conditions. *Environ Sci Technol* 28: 1727-1732.
- Myers C. R., Myers M. J. (1992). Localization of Cytochromes to the Outer Membrane of Anaerobically Grown *Shewanella putrefaciens* MR-1. *J Bacteriol.* 174(11):3429-3238.
- Newman K. D. y Kolter R., (2000). A Role for Excreted Quinones in Extra cellular Electron Transfer. *Nature*, 405:94-97.

Nevin K. P. and Lovley D. R. (2002) Mechanisms for Fe (III) oxide reduction in sedimentary environments. *Geomicrobiol J.* 19:141-159

Oakes D. (1996). Nitrate in Water, En: Hill Michael (Eds), Nitrates and Nitrites in Food and Water. *Woodhead Publishing Limited* (pp 33-58). UK

Oh J. y Silversten J. (1999). Acetate Limitation and Nitrite Accumulation During Denitrification. *J Environ Eng.* 234-242.

Österberg R. y Shirshova L. (1997). Oscillating nonequilibrium redox properties of humic acids. *Geochim Cosmochim Acta.* 61: 4599–4604.

Parsonage D., Greenfield A. J., Ferguson S. J. (1986). Evidence that energy conserving electron transport pathways to nitrate and cytochrome o branch at ubiquinone in *Paracoccus denitrificans*. *Arch Microbiol.* 145(2):191-196.

Pearson V. I., Page D. M., van Spanning R. J., Ferguson S. J. (2003). A Mutant of *Paracoccus denitrificans* with Disrupted Genes Coding for Cytochrome c550 and Pseudoazurin Establishes These Two Proteins as the In Vivo Electron Donors to Cytochrome cd1 Nitrite Reductase, *J Bacteriol* 185:6308–6315.

Perez-Trevilla J. (1998). Estudio y evaluación del efecto del pH y la fuente de electrones en la desnitrificación en estado estacionario. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa, México.

Peña-Calva A., Olmos-Dichara A., Viniestra-González G., Cuervo-López F. M., y Gómez J. (2005). Denitrification in presence of benzene, toluene, and m-xylene, Kinetics, mass balance, and yields. *Appl Biochem Biotechnol.* 119:195-208

Rabus R. y Widdel F. (1996). Utilization of alkylbenzenes during anaerobic growth of pure cultures of denitrifying bacteria on crude oil. *Appl Environ Microbiol* 62:1238-1241

Rabus R, Wilkes H, Schamm A, Harms G, Behends A, Amann R, Widdel F., (1999) Anaerobic utilization of alkylbenzenes and n-alkanes from crude oil in an enrichment culture of denitrifying bacteria affiliating with the β -subclass of *Proteobacteria*. *Environ Microbiol.* 1(2):145

Ramanand, K y Suflita, J. M., (1991) Anaerobic degradation of m-cresol in anoxic aquifer slurries: Carboxylation reactions in a sulfate-reducing bacterial enrichment. *Appl Environ Microbiol.* 57(6):1689-1695

Rau J., Knackmuss H-J. y Stolz A. (2002). Effects of different quinoid redox mediators on the anaerobic reduction of Azo Dyes by bacteria. *Environ Sci Technol.* 36:1497-1504.

Reguera G., McCarthy K. D., Mehta T., Nicoll J. S., Tuominen M. T., Lovley D. R., (2005). Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature.* 435:1098-1101.

Richardson D. J. y Watmough N. J. (1999), Inorganic nitrogen metabolism in bacteria, *Curr Opin Chem Biol*, 3:207–219

Richardson D. J., Wehfritz J. M., Keech A., Crossman L. C., Roldan M. D., Sears H. J., Butler, C. S., Reilly A., Moir J. W., Berks B.C. (1998). The diversity of redox proteins involved in bacterial heterotrophic nitrification and aerobic denitrification. *Biochem Soc Trans*. 26:401-408.

Rockne J. K. y Strand S. E. (1998). Biodegradation of Bicyclic and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Anaerobic Enrichments. *Environ Sci Technol*. 32:3962-3967

Roldán, M. D., Sears, H. J., Cheesman, M. R., Ferguson, S. J., Thomson, A. J., Berks, B. C., and Richardson, D. J. (1998) Spectroscopic characterization of a novel multihaem c-type cytochrome widely implicated in bacterial electron transport. *J Biol Chem*. 273, 28785-28790

Ronen Z. y Bollag J. M. (1992) Rapid anaerobic mineralization of pyridine in a subsurface sediment inoculated with a pyridine-degrading *Alcaligenes* sp. *Appl Microbiol Biotechnol* 37: 264-269.

Rothery R., Magalon A., Giordano G., Guigliarelli B., Blasco F., y Weiner H. (1998) The Molybdenum Cofactor of *Escherichia coli* Nitrate Reductase A (NarGHI). *J Biol Chem*. 273(13):7462–7469.

Rothery, R. A., Blasco, F., Magalon, A., Asso, M., and Weiner, J. H. (1999). The hemes of *Escherichia coli* nitrate reductase A (NarGHI): potentiometric effects of inhibitor binding to NarI. *Biochemistry* 38:12747-12757.

Sacks L. E. y Barker A. H. (1952). Substrate Oxidation and Nitrous Oxide Utilization in Denitrification. *J Bacteriol*. 64:247-252

Saffarini D. A., Blummerman L. S., Mansoorabadi J. K. (2001). Role of Menaquinones in Fe(III) Reduction by Membrane Fractions of *Shewanella putrefaciens*. *J Bacteriol*. 183(3):846-848.

Samyn, B., Berks, B. C., Page, M. D., Ferguson, S. J., y Van Beeumen, J. J. (1994) Characterisation and amino acid sequence of cytochrome c-550 from *Thiosphaera pantotropha*. *Eur J Biochem*. 219, 585-594.

Sakakibara Y, Kuroda M. (1993). Electric prompting and control of denitrification. *Biotechnol Bioeng*. 42:535–537.

Sakakibara Y, Nakayama T. (2001). A novel multi-electrode system for electrolytic and biological water treatments: electric charge transfer and application to electric charge transfer and application to denitrification. *Water Res*. 35(3):768–78.

- Sasarman A., Puervis p., and Portelance V. (1974) Role of menaquinone in nitrate respiration in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 117:911-913
- Scott D., Mcknigth D., Lovley R. D., Kolesar S. y Blunt-Harris L. E. (1998). Quinone Moieties, as Electron Acceptor in the Reduction of Humic Substances by Humic-Reducing Microorganisms. *Environ Sci Technol.* 32:2984-2989.
- Sears HJ, Spiro S, Richardson DJ (1997) Effect of carbon substrate and aeration on nitrate reduction and expression of the periplasmic and membrane-bound nitrate reductases in carbon limited cultures of *Paracoccus denitrificans* Pd1222. *Microbiology* 143:3767-3774.
- Sellinger S., Cord-Ruwish R., Schink B. (1998). A Periplasmic and Extracellular *c*-Type Cytochrome of *Geobacter sulfurreducens* Acts as a Ferric Iron Reductase and as an Electron Carrier to Other Acceptors or to Partner Bacteria. *J Bacteriol.* 180(14):3686-3691.
- SEMARNAT (2002a). Agua, En: Informe de la Situación del Medio ambiente México, Compendio de Estadísticas ambientales. Cap. 4, pp 129- 154.
- SEMARNAT (2002b). Normatividad, En: Informe de la Situación del Medio Ambiente - México, Compendio de Estadísticas ambientales.
- Semprini L, Hopkins GD, Mccarty PL.. (1992) In-situ transformation of carbon tetrachloride and other halogenated compounds resulting from biostimulation under anoxic conditions. *Environ Sci Technol* 26: 2454-2461
- Shuker, D. E. G. (1988). The chemistry of N-nitrosation. In: *Nitrosamines: Toxicology and Microbiology*. Ed. M. J. Hill, Ellis Horwood, Chichester, p. 48.
- Szilagyi M. (1973). The redox properties and the determination of the normal potential of the peat-water system. *Soil Sci.* 115:434–437.
- Silvestrini, M. C., S. Falcinelli, I. Ciabatti, F. Cutruzzola`, and M. Brunori. (1994). *Pseudomonas aeruginosa* nitrite reductase (or cytochrome oxidase): an overview. *Biochimie Cell Biol.* 76:641–654.
- Sorensen H. B. y Jorgensen S.E. (1993). The removal of nitrogen compounds from wastewater, Studies in Environmental Science 54. *Elsevier*. pp 119-15
- Stouthamer, A. (1976). Biochemistry and genetics of nitrate reductase in bacteria. *Adv. Microbiol Physiol.* 14:315-375
- Strohm O. T., Griffin B., Zumft G. W., Schink B. (2007). Growth yields in bacterial denitrification and nitrate ammonification. *Appl Environ Technol.* 73: 1420–1424
- Struyk Z. y Sposito G. (2001). Redox properties of standard humic acids. *Geoderma* 102:329–346.

Suzuki, S., T. Kohzuma, Deligeer, K. Yamaguchi, N. Nakamura, S. Shidara, K. Kobayashi, and S. Tagawa. 1994. Pulse radiolysis studies on nitrite reductase from *Achromobacter cycloclastes* IAM 1013: evidence for intramolecular electron transfer from type 1 Cu to type 2 Cu. *J. Am. Chem. Soc.* 116:11145–11146.

Tiedje, J. M. (1988). Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium, En: A. J. B. Zehnder (ed.). *Biology of anaerobic microorganisms*. Wiley-Liss, New York. pp. 179-218

Tender, L.M., Reimers, C.E., Stecher, H.A., Holmes, D.E., Bond, D.R., Lowy, D.L. (2002). Buried treasure; harnessing microbial power generation on the seafloor. *Nature Biotechnology*. 20: 821–825.

Tschech, A y Fuchs, G. (1987). Anaerobic degradation of phenol by pure cultures of newly isolated denitrifying pseudomonads. *Arch Microbiol.* 148: 213-217

Van der Graff, A., A. Mulder, P. Bruijn, M. Jetten, L. Robertson and J.G. Kuenen. (1995). Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process. *Appl Environ Microbiol.* 61:1246-1251.

van der Zee, F. P., Bouwman, R. H. M., Strik, D. P. B. T. B., Lettinga, G. y Field, J. A. (2001) Application of redox mediators to accelerate the transformation of reactive azo dyes in anaerobic bioreactors. *Biotechnol Bioeng.* 75:691-701.

van der Zee, F. P., Bisschops I. E., Lettinga, G. (2003) Activated Carbon as an Electron Acceptor and Redox Mediator during the Anaerobic Biotransformation of Azo Dyes. *Environ Sci Technol.* 37:402-408

Vargas B. C., Song B., Camps M. M., Haggblom M., (2000), Anaerobic degradation of fluorinated aromatic compounds. *Appl Microbiol Biotechnol.* 53: 342-347

Visser S. A. (1964). Oxidation-reduction potentials and capillary activities of humic acids. *Nature* 204:581–583.

Wasser I. M., Vries S., Moëne-Loccoz P., Schöder I. Karlin K. D. (2002). Nitric Oxide in Biological Denitrification: Fe/Cu Metalloenzyme and Metal Complex NO_x Redox Chemistry. *Chem Rev.* 102(4):1201-1234

Wilson J. T., McNabb J. F., Cochran J. W., Wang T. H., Tomson M. B. y Bedient P. B., (1985). Influence of microbial adaptation on the fate of organic pollutants in ground water. *Environ Toxicol Chem.*

OBJETIVOS

HIPOTESIS

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar y comprender la contribución bioquímica y fisiológica de la adición de quinonas y los cambios de potencial redox en el metabolismo desnitrificante de un consorcio (lodo) microbiano fisiológicamente estable.

OBJETIVOS PARTICULARES

a) Evaluar, analizar y entender el papel de diferentes tipos de quinonas y de su concentración en la orientación del metabolismo desnitrificante microbiano en la oxidación del *p*-cresol, en un lodo desnitrificante.

b) Evaluar y entender el acoplamiento de distintos potenciales eléctricos, aplicados con electrodos,

A la oxidación del *p*-cresol, en un cultivo desnitrificante.

A la reducción anaerobia del nitrato a nitrógeno molecular.

HIPOTESIS

La adición de quinonas o la aplicación de un potencial eléctrico sobre un lodo desnitrificante orientan el metabolismo microbiano en la oxidación anaerobia de compuestos fenólicos.

CAPITULO 1

COMPARISON OF THE EFFECTS OF MENADIONE, ALIZARINE AND ANTHRAQUINONE-2,6-DISULFONATE ON THE DENITRIFICATION

Abstract

Denitrification using *p*-cresol as electron source was studied in the presence of three quinones, menadione, alizarine and anthraquinone-2,6-disulfonate, at different molar concentrations (0 to 2 mM). Results showed that substrates consumption efficiency was mainly affected when menadione was present. In all cases the yield for N₂ and inorganic carbon values remained around 0.9. In presence of alizarine and menadione specific consumption rates for *p*-cresol and nitrate decreased 40% and 90% (for both substrates), compared to controls not exposed to quinones. The sludge previously exposed to quinones was submitted to recovering denitrifying studies using acetate and *p*-cresol. After exposing to anthraquinone-2,6-disulfonate and alizarine with *p*-cresol and acetate, the metabolic activity of denitrifying sludge was completely recovered, but previous exposition at any menadione concentration resulted in a very low metabolic recuperation. An attempt in elucidating the underlying mechanisms in which the quinones function in the denitrification, shown that menadione and alizarine can have a marked inhibitory effect on denitrifying process and AQDS no effect at all. The results suggested that menadione modify the transport system and alizarine affected some denitrifying enzymes by complexing the molybdenum. A model based on óxido-reduction potentials of the enzymes implied in denitrifying pathway and *p*-cresol oxidation suggested that the effect of quinones on the denitrification process appears to be more associated to quinone moiety structural properties and hydrophobicity than to their oxidative-reductive capacity.

Key words: denitrification; *p*-cresol; AQDS; alizarine; menadione

Introduction

Role of humic substances (HS) and quinones in biogeochemical processes has been widely investigated because of their potential contribution in bioremediation processes, such as in

the anaerobic oxidation of organic pollutants or in the reduction of metal oxides, azo dyes, chlorinated and nitroaromatic compounds (Field and Cervantes, 2005). It is broadly accepted that quinone moieties are the principal responsible for HS interactions with priority pollutants and microorganisms (Scott *et. al.*, 1998). Quinones confer redox properties participating in three ways: final electron acceptors, electron donors, and electron shuttles (Field *et. al.*, 2000).

Among the different anaerobic microbial processes for wastewaters treatment to eliminate organic matter, denitrification is noteworthy, being the highest-energy-yielding respiration process in anoxic environments (Strohm *et. al.*, 2007). Denitrification is a redox process that can couple organic substances oxidation to nitrate reduction into dinitrogen gas. In this way, denitrification is a good candidate for exploring HS application. There are some works about the possible contributions of HS in denitrification, and most studies describing the effects of quinones on denitrifying processes were performed with the humic model compound, anthraquinone-2,6-disulfonate (AQDS). This quinone moiety is the most studied HS model compound because it has been found to present similar results to those found with HS (Coates *et. al.*, 1998). It has been shown that AQDS in its reduced form, anthrahydroquinone-2,6-disulfonate (AHQDS), can promote the reduction of nitrate and denitrification intermediates (nitrite and N₂O) by serving as electron donor (Lovley *et. al.*, 1999; Coates *et. al.*, 2002; Aranda-Tamara *et. al.*, 2007). Lovley *et. al.* (1999) reported the reduction of nitrate with AHQDS by the denitrifying bacterium *Paracoccus denitrificans* while *Pseudomonas denitrificans* was unable to do it. However, results from Coates *et. al.* (2002) indicated a broad diversity of the microorganisms capable of carrying out AHQDS oxidation coupled to nitrate reduction. Several studies have shown that different anaerobic sludge or sediment samples were able to use AQDS as final electron acceptor from a wide variety of organic compounds for the anaerobic oxidation (Bradley *et. al.*, 1998; Coates *et. al.*, 1998; Cervantes *et. al.*, 2008). Cadena *et. al.* (2007) recently demonstrated the possibility to couple acetate and *p*-cresol oxidation to AQDS reduction by a sludge stabilized in steady-state denitrification with a well defined physiological denitrifying behavior. However, there is still little information on this metabolic ability for denitrifying

consortia and when the organic matter oxidation process is coupled to nitrate reduction into N_2 . It is of special interest investigating more on how different quinoid redox mediators could participate in the denitrification respiratory process.

The aim of this study was to evaluate and compare the possible contribution of three distinct quinoid compounds (menadione, MEN; alizarine, ALZ; anthraquinone-2,6-disulfonate, AQDS) added at different initial concentrations, on the denitrifying respiratory process for *p*-cresol oxidation, using a sludge with a stable and well defined physiological behavior.

Materials and Methods

Inoculum and culture medium composition.

The denitrifying sludge used for inoculating batch cultures was produced in steady-state denitrification in a continuous stirred tank reactor under heterotrophic conditions with sodium acetate. Under these culture conditions, consumption efficiencies were $99.8 \pm 1.2\%$ for nitrate and $89.2 \pm 1.5\%$ for acetate. Yields for final products: biomass, molecular nitrogen, and inorganic carbon (HCO_3^- and CO_3^{2-}) were 0.19 ± 0.02 g biomass-C/g acetate-C consumed, 0.71 ± 0.06 g N_2 /g NO_3^- -N consumed, and 0.67 ± 0.04 g inorganic carbon/g acetate-C consumed, respectively. Before inoculation, the sludge was washed with a solution of NaCl (9.0 g/L)

The basal medium composition used for batch cultures was (g/L): KH_2PO_4 (2.0), $CaCl_2(2H_2O)$ (0.6), $NaMoO_4(2H_2O)$ (0.12), $MgSO_4(7H_2O)$ (0.4), $FeCl_3(6H_2O)$ (0.1), and $CuSO_4(5H_2O)$ (0.02). The distilled water used for preparing micronutrients solutions was boiled for 5 min to remove oxygen traces. *p*-Cresol was used as electron donor at an initial carbon concentration of 50 mg C/L. The initial NO_3^- -N concentration was adjusted to obtain a C/N ratio of 0.98 (w/w) close to the stoichiometric value. Four initial concentrations of each quinone (MEN, ALZ, or AQDS; Figure 1) were tested: 0.035, 0.2, 1.0, and 2.0 mM. For sterile controls, the sludge was sterilized at 120°C for 20 min and the culture medium was filtered through a nylon membrane (0.45 μ m).

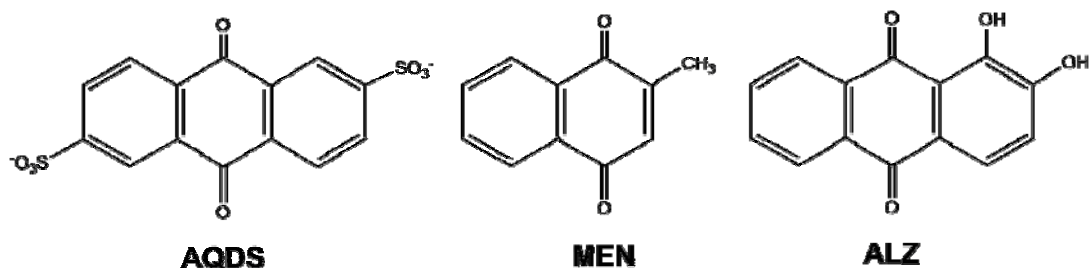


Figure 1. Quinones molecules used in the present study: menadione (MEN); alizarine (ALZ); anthraquinone-2,6-disulfonate (AQDS).

Batch cultures

All experiments were conducted by triplicate in 60 mL glass serum bottles. The liquid volume was 50 mL with a headspace of 10 mL. The medium, previously flushed with helium (He) for 10 min, was put in the bottles. Sludge was disposed in the medium at 1 g volatile suspended solids (VSS) per liter and flushed again with He for 15 min. Finally, *p*-cresol was added at 50 mg C/L. The initial pH value was adjusted to 7.0 with a 1 N NaOH solution. The vials were sealed with butyl rubber stoppers and aluminium crimps, then the headspace was saturated with He. Control cultures were carried out without *p*-cresol, nitrate or quinones. The control cultures in the presence of quinones and the absence of *p*-cresol or nitrate were conducted at the following initial quinones concentrations: 0.035, 0.2, 1.0, and 2.0 mM. All the cultures were incubated at 30°C in darkness and shaken at 150 rpm. For kinetic studies, samples were withdrawn at different times in different experimental units, centrifuged (2000 rpm, 15 min), filtered (0.45 μm) and analyzed. NO_3^- and *p*-cresol consumption efficiencies (E_{NO_3} , (g NO_3^- -N consumed/g NO_3^- -N fed) × 100; E_{p-cr} (g *p*-cresol-C consumed/g *p*-cresol-C fed) × 100), denitrifying and oxidation yields (Y_{N_2} , g N_2 /g NO_3^- -N consumed; Y_{IC} , g inorganic carbon/g *p*-cresol-C consumed) and specific consumption rates (q_{NO_3} , q_{p-cr} , mg substrate consumed/g VSS.h) were determined to evaluate the physiological response of the denitrifying sludge to the presence of quinones.

Analytical methods.

p-Cresol, *p*-hydroxybenzylalcohol (pOHBOL), *p*-hydroxybenzaldehyde (pOHBD), *p*-hydroxybenzoate (pOHBT), nitrate, and nitrite were analyzed by HPLC (Waters, 600) with

a photodiode array detector (Waters, 2996). For the analysis of organic compounds, a C18 Bondclone column (300 x 3.9 mm, 10 μ m; Phenomenex) was employed, and the mobile phase was acetate buffer (50 mM, pH 4.6)/acetonitrile (70:30, v/v) at 1.2 mL/min. The detection was performed at 280 nm. Nitrate and nitrite were detected at 214 nm after being separated with an ion exchange column Ic-Pak Anion HC (4.6 x 150 mm, Waters) and a borate/gluconate mobile phase at 2 mL/min. Acetate was measured by capillary electrophoresis (Prince Technologies CE 221) as previously described by Cadena *et al.* (2007). The IC was measured with a total organic carbon (TOC) analyzer (Shimadzu, TOC-5000). CO₂, CH₄, N₂O, and N₂ were determined by gas chromatography (Varian Star 3350 model) using a thermal conductivity detector as previously described by Peña-Calva *et al.* (2004). The VSS were determined according to Standard Methods (APHA, 1998).

Results and Discussion

Control denitrifying batch cultures

Results from sterile controls showed that there was no significant consumption of *p*-cresol and nitrate. In culture controls with active inoculum, without *p*-cresol as electron donor or NO_3^- as electron acceptor, the consumption for nitrate or *p*-cresol was negligible, indicating that there was no significant endogenous metabolism (data not shown).

In denitrifying cultures with *p*-cresol and NO_3^- , E_{p-cr} was $88.8 \pm 1.4\%$ after 27h (Figure 2). *p*-Cresol was completely mineralized ($Y_{IC} = 1.0 \pm 0.03$) and nitrate ($E_{\text{NO}_3} = 100\%$) totally reduced to dinitrogen ($Y_{\text{N}_2} = 1.0 \pm 0.08$). Specific consumption rates for nitrate and *p*-cresol were 2.23 ± 0.06 mg NO_3^- -N/g VSS.h and 2.05 ± 0.16 mg *p*-cresol-C/g VSS.h, respectively. These values were used as references for comparing them with the denitrification specific rates obtained in the presence of quinones. Nitrite was only detected in a transitory way. *p*-Cresol oxidation to IC was stoichiometrically coupled to NO_3^- reduction into N_2 . pOHBOL, pOHBD, and pOHBT were detected as intermediates from the *p*-cresol oxidation at trace levels. These results suggest that *p*-cresol followed the oxidation pathway proposed by Bossert and Young (1986) for denitrifying cultures through the sequential formation of pOHBOL, pOHBD, and pOHBT. It has been reported that the latter can be totally transformed to benzoyl-CoA under denitrifying conditions, a common key compound in the ring-cleavage of mono-aromatics (Biegert *et al.*, 1993; Schink *et al.*, 2000).

High values obtained for Y_{IC} and Y_{N_2} and negligible microbial growth (data not shown) demonstrated that the denitrifying process was mainly dissimilative under the experimental conditions used. This was mainly due to the low C/N ratio used, close to the stoichiometric value given by the denitrifying respiratory process with *p*-cresol. While several authors reported noteworthy effects of quinones on microbial growth, the focus of the present work was on the effect of different redox mediators on the denitrifying respiration, using sludge with a stable and well defined physiological behavior.

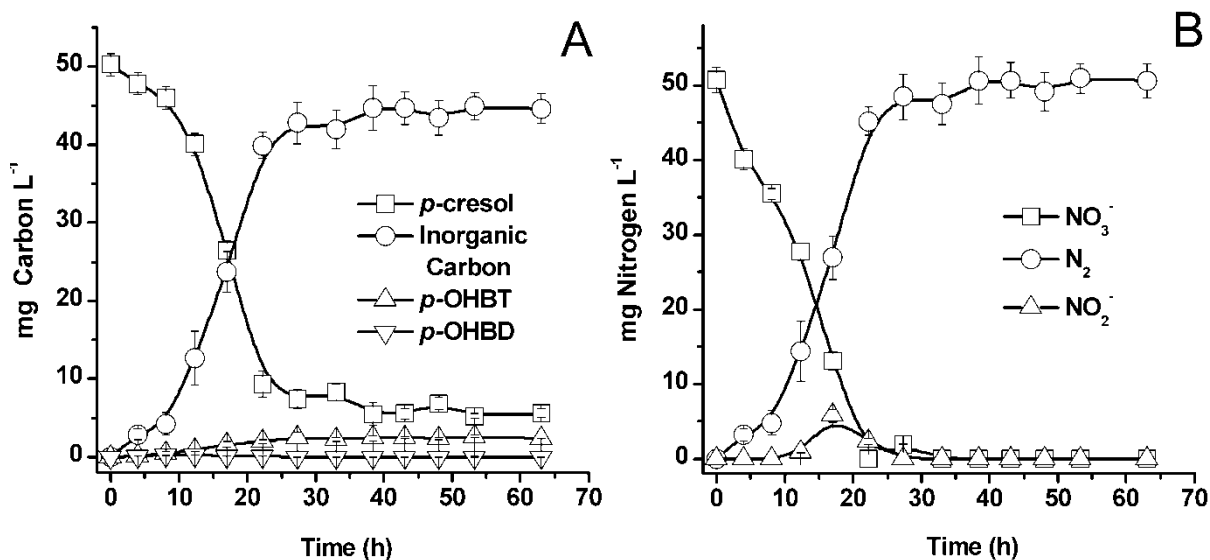


Figure 2. Kinetic profiles of denitrifying process with *p*-cresol (50 mg C L⁻¹). A) Carbonated compounds, B) Nitrogenous compounds.

Effect of menadione (MEN) on denitrifying process

In the following culture controls: NO₃⁻/inoculum/MEN without *p*-cresol, *p*-cresol/inoculum/MEN without nitrate, and *p*-cresol/ NO₃⁻/sterile inoculum/MEN, all concentrations of the different compounds remained constant for 63 h. Kinetic profiles were established for *p*-cresol, nitrate, and their respective products when MEN was added at the initial concentrations of 0.035, 0.2, 1.0, and 2.0 mM into the denitrifying cultures (Figure 3). At 1.0 and 2.0 mM of MEN, no significant consumption for *p*-cresol and nitrate was observed. At 0.035 and 0.2 mM, after 63h, E_{p-cr} was only of $39.5 \pm 2.3\%$ and $21.0 \pm 2.1\%$, and E_{NO_3} of $54.7 \pm 3.1\%$ and $18.8 \pm 0.2\%$, respectively. These results showed that instead of being improved, the denitrifying process was affected by the presence of MEN. When MEN was present at 0.035 mM, both q_{p-cr} and q_{NO_3} decreased by 90%, indicating an inhibitory effect of MEN on the denitrifying process. It must be noted that, in all cases, the *p*-cresol consumed was totally oxidized to IC ($Y_{IC} = 1.0 \pm 0.04$) with a transitory accumulation of the same intermediates than those observed in the control cultures without quinone. The nitrate consumed was mainly reduced to nitrogen ($Y_{N_2} = 0.85 \pm 0.23$). *p*-Cresol mineralization was stoichiometrically coupled to nitrate reduction into N₂. Oxidative and reductive pathways from the denitrifying process were not altered by the presence of

MEN, but specific rates of substrates consumption decreased drastically, with a consequent fall in the efficiencies values.

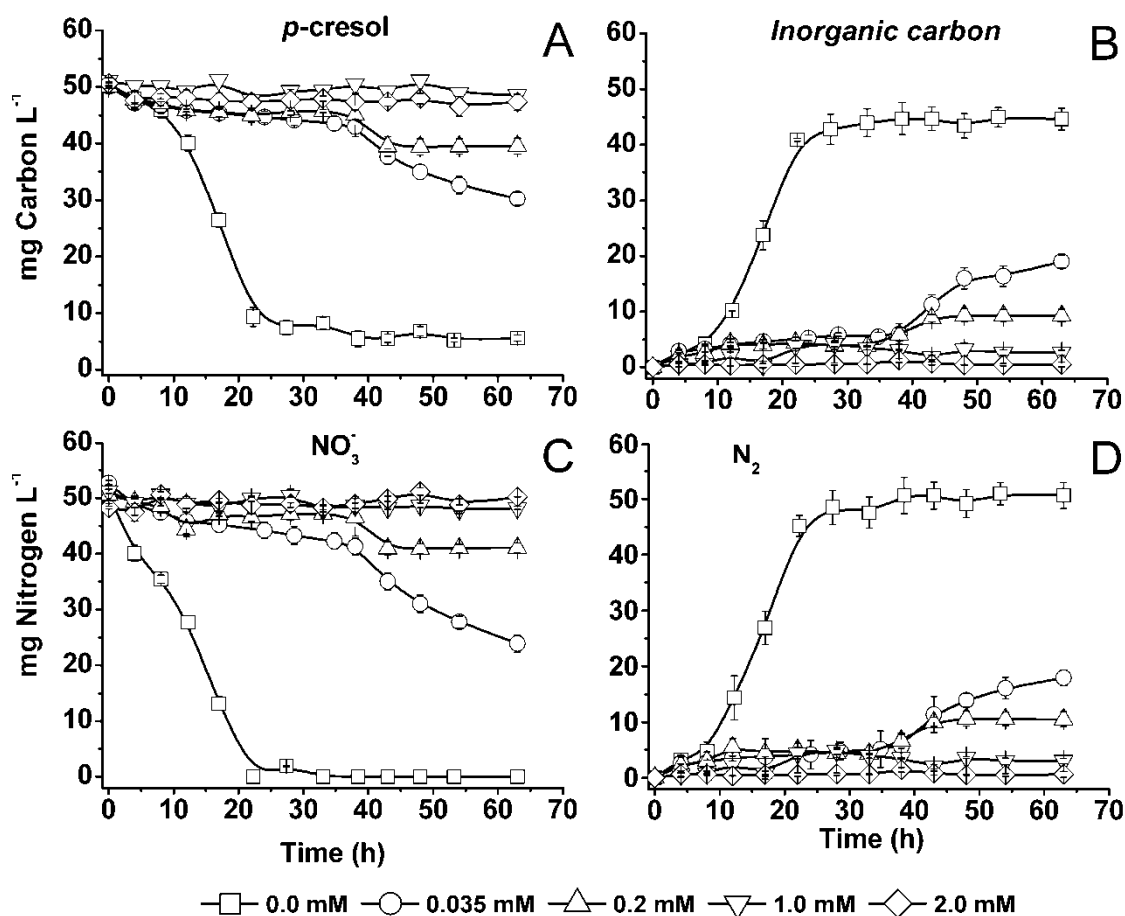


Figure 3. Consumption and production profiles of carbonated and nitrogenous compounds in denitrifying cultures with *p*-cresol (50 mg C L⁻¹) at different initial concentrations of menadione (0.0, 0.035, 0.2, 1.0, and 2.0 mM).

Various possible effects might be involved. MEN could have a toxic influence on the sludge as previously reported for various quinones (Monks *et al.*, 1992; Rodriguez *et al.*, 2004), provoked enzymatic inhibition, or affected the substrates transport through the bacterial membrane. To obtain more information on the effect of MEN on the denitrifying sludge, the biomass from each culture previously exposed for 48h to different MEN concentrations was washed and newly used in denitrifying cultures without MEN. *p*-Cresol and acetate as easily oxidizable compounds were used independently as electron sources. Figure 4 shows the consumption efficiencies for *p*-cresol, acetate, and nitrate. In the batch

cultures with *p*-cresol as substrate, the inoculum previously exposed to 0.035 mM of MEN did not totally recover its denitrifying activity with a $E_{p\text{-cr}}$ of $21.8 \pm 5.1\%$ and a E_{NO_3} of $37.3 \pm 7.8\%$. The inocula that have been in the presence of MEN from 0.2 to 2.0 mM were not able to consume nitrate again and all the $E_{p\text{-cr}}$ were low with an average of $5.4 \pm 0.9\%$. Results were different when acetate was used as electron donor (Figure 4). In this case, the sludge previously exposed up to 0.2 mM of MEN was able to reassume its denitrifying activity, presenting values for $E_{Acetate}$ and E_{NO_3} higher than 85% and Y_{IC} and Y_{N_2} higher than 0.94. At higher concentrations of MEN (1.0 and 2.0 mM), denitrifying activity was not recovered and efficiencies dropped to $23.8 \pm 12.1\%$ for acetate and $2.4 \pm 2.0\%$ for nitrate. Results showed that denitrifying activity was more difficult to recover in assays with *p*-cresol than acetate

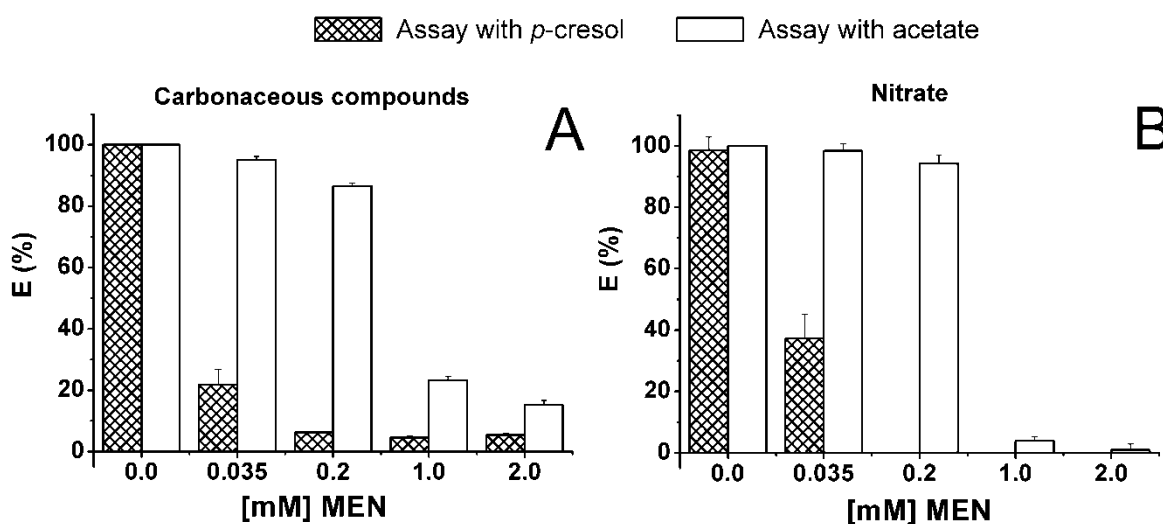


Figure 4. Recoverability of activity of the denitrifying sludge previously exposed to different initial concentrations of menadione (0.0, 0.035, 0.2, 1.0, and 2.0 mM) for 48 h and reused as inoculum in batch cultures without menadione for 63 h.

This could partly support the hypothesis that MEN might have affected the transport of substrates. *p*-Cresol and acetate are known to be transported through different ways into the bacterial cells. Acetate can freely cross the membrane while *p*-cresol needs a specific transport system (Kihara and Macnab, 1981; Cronin *et al.*, 1999). Mauzeroll and Bard (2004) evidenced that MEN can be absorbed in biological membranes. It is lipophilic compound with a logarithm of the partition coefficient between octanol and water (log

K_{OW}) of 2.45 (Ran *et al.*, 2001). Accumulation of hydrophobic compounds in the membrane may lead to alteration of the membrane structure, permeability, and function, and affect the transport system (Sikkema *et al.*, 1995). Such considerations could explain why bacteria recovered their denitrifying activity after being exposed to MEN up to an initial concentration of 0.2 mM when acetate was used as substrate, but did not when *p*-cresol was employed. At higher concentrations of MEN (1.0 and 2.0 mM), both acetate and *p*-cresol transport could have been more affected due to a major accumulation of the quinone in the membrane. Results suggested that the decrease in specific rates of substrates consumption due to the presence of MEN could be related to its hydrophobicity and high affinity for membranes. However, another possible toxic and inhibitory effect can not be totally discarded and further work is required in this direction to elucidate the processes involved in the negative effects of MEN on microbial activity.

Effect of alizarine (ALZ) on denitrifying process.

As observed with MEN, it was first verified that in the culture controls with ALZ (NO_3^- /inoculum/ALZ without *p*-cresol, *p*-cresol/inoculum/ALZ without nitrate, and all components with sterile inoculum), there was no significant consumption of the substrates for 63 h. Figure 5 compares the effect of different initial concentrations of ALZ on the denitrifying process. At the lowest concentration (0.035 mM), ALZ did not present any effect on denitrification. At 0.2 and 1.0 mM of ALZ, a lag phase appeared for *p*-cresol and NO_3^- consumption while surprisingly, at a concentration of 2.0 mM, there was not. In all cases, efficiencies values kept high ($E_{p-cr} = 88.1 \pm 1.6\%$, $E_{NO_3} = 93.5 \pm 8.1\%$) even though specific rates for substrates consumption decreased significantly (Table 1). The inhibitory effect of ALZ on denitrifying process was less than the inhibition observed with MEN. It is interesting to note that, at 1.0 mM of ALZ, Y_{IC} decreased by 15% mainly as a consequence of a higher accumulation of pOHBT in the cultures. Regarding the NO_3^- reduction, the main final product was nitrogen with Y_{N_2} values close to 1, indicating that the reductive pathway from the denitrifying process was not affected in the presence of ALZ. As MEN, under the experimental conditions used in this study, ALZ did not present a beneficial effect on denitrification with *p*-cresol.

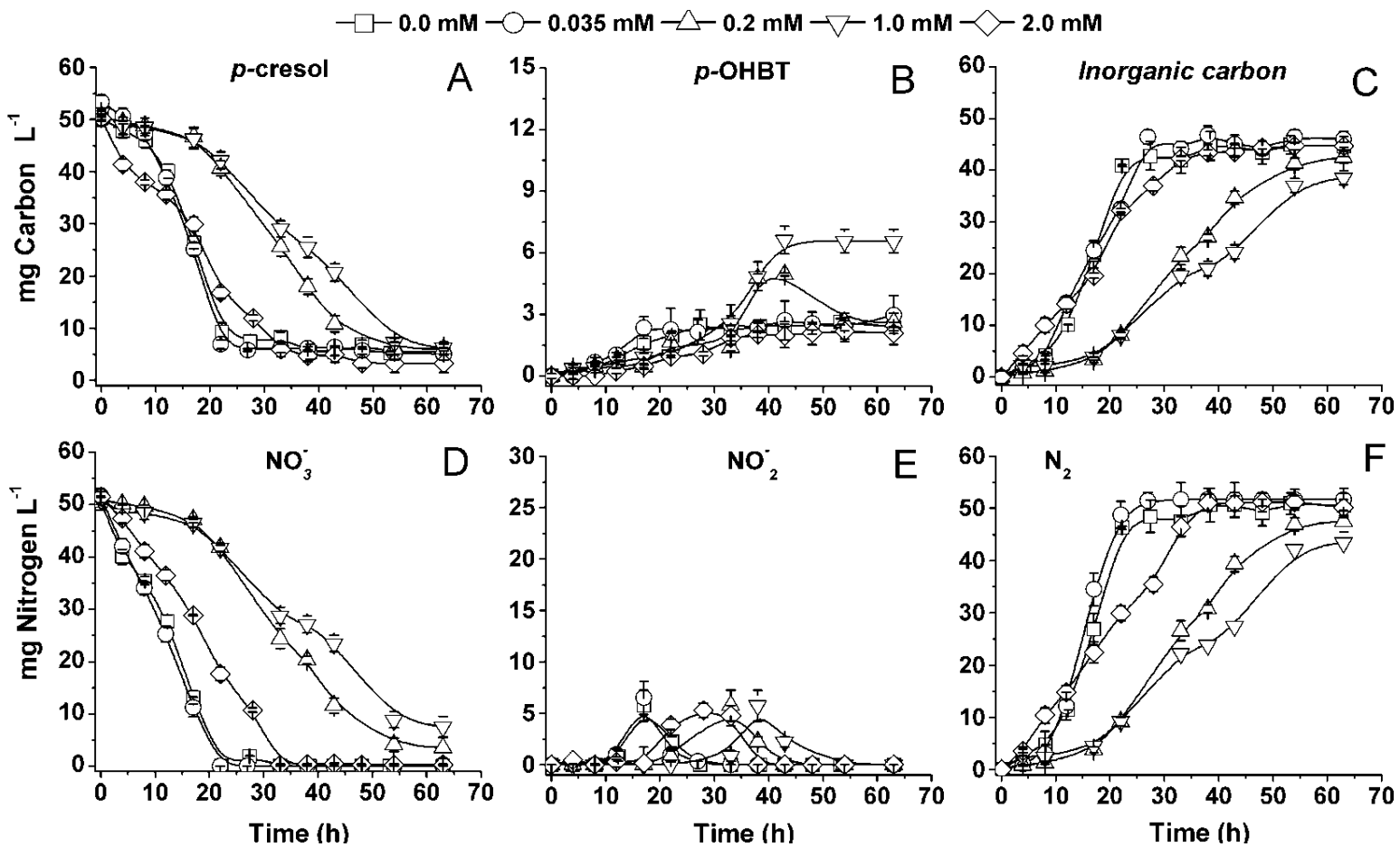


Figure 5. Consumption and production profiles of carbonated and nitrogenous compounds in denitrifying cultures with *p*-cresol (50 mg C L⁻¹) at different initial concentrations of alizarine (0.0, 0.035, 0.2, 1.0, and 2.0 mM).

Effect of anthraquinone-2,6-disulfonate (AQDS) on denitrifying process

When AQDS was added into the denitrifying cultures, the denitrification kinetic profiles were similar to those obtained in the control culture without AQDS (data not shown). The sludge previously exposed to AQDS for 48h and newly inoculated into batch cultures without quinone presented a denitrifying activity with values for efficiencies, yields and specific rates similar to those obtained in the control denitrifying batch culture. Under the experimental conditions used, and at all the initial quinone concentrations tested (0.035, 0.2, 1.0, and 2.0 mM), AQDS did not present any effect on denitrification. Throughout the experiments, the characteristic change to red coloration due to AQDS reduction was not observed. Not only AQDS did not participate in the denitrifying process, but also it could not be used as electron acceptor for *p*-cresol oxidation even in the absence of nitrate. An additional experiment showed that AQDS was not used either as electron acceptor for acetate oxidation.

Some bacteria can respire using extra-cellular insoluble minerals, quinones and humic substances as final electron acceptors (Newman and Kolter, 2000; Nevin and Lovley, 2002). This respiratory property has been attributed to extra-cellular proteins linked to the external membrane (Leang *et al.*, 2003; Reguera *et al.*, 2005). Actually, a wide diversity of microbial genus is known to be able to transport electrons in an extra-cellular way and AQDS is used as indicator of this ability as the medium turned red when AQDS is reduced (Coates *et al.*, 2002; Bond and Lovley, 2002). In a previous work, Cadena *et al.* (2007) demonstrated that a denitrifying sludge was able to use AQDS as final electron acceptor to mineralize *p*-cresol, suggesting that quinone-reducing bacteria were present in the consortium. Although the denitrifying sludge used in the present study was produced too in steady-state denitrification under similar culture conditions, it was unable to reduce AQDS. This suggests that microbiological composition of the inocula used, and particularly presence of AQDS-reducing bacteria, is a decisive factor in their ability to use extra-cellular quinones for respiration. Even though humic-reducing bacteria are considered to be broadly distributed in nature, special care must be taken.

Redox implications of quinones

Contribution of quinone moieties in microbial processes is associated with their oxidation and reduction properties, and the reduction potential (E°) of the quinoid redox mediators is a commonly used parameter to explain experimental results in the literature. Then, E° values were determined for each quinone for better understanding the results obtained in this work. Potential values were determined directly in the denitrifying cultures under the experimental conditions used in this study by cyclic voltammetry as previously described by Cadena *et al.* (2007). The reduction potential was found to be of + 104 mV for MEN, - 187 mV for ALZ, and - 279 mV vs SHE for AQDS (culture medium, 25°C, pH = 7.0). Quinones (e. g., menaquinone and ubiquinone) are known to be implied in electron transport of nitrate respiration (Kröger *et al.*, 1971; Sasarman *et al.*, 1974). Advancing the hypothesis that the quinones added into the cultures could participate in the metabolic pathways of microbial processes, a model was proposed for the denitrifying process coupled to *p*-cresol oxidation that included estimated values for redox potential of the different involved enzymes (Figure 7). These redox potential values were obtained from literature and for the majority of the enzymes, a range of potential is presented due to the fact that different values are reported in the distinct available studies. The cyclic redox capacity of quinones allowed them to be reduced by some proteins (flavoproteins) with electrons that could be used in other ways (Powis and Appel, 1980). According to the *p*-cresol oxidation pathway under denitrifying conditions, both *p*-cresol oxidation to pOHBOL and pOHBOL oxidation to pOHBD reactions are carried out by a methylhydroxylase (Figure 7). It has been reported that this flavoprotein presents redox potentials in the range of + 226 to + 250 mV (Hopper, 1983; Hopper *et al.*, 1991). In the following step corresponding to the pOHBD oxidation to pOHBT, another flavin type protein, a NAD^+ -dependent dehydrogenase, is involved with a redox potential of + 152 mV (Göβner *et al.*, 1994). The enzyme in charge of the pOHBT transformation is a ligase that does not catalyze a redox reaction and only depends on ATP and coenzyme A (Heider *et al.*, 1998). Redox potential values of the four enzymes responsible for nitrate reduction to molecular nitrogen are comprised between + 130 mV and + 322 mV (Figure 7) (Silvestrini

et al., 1994; Farrar *et al.*, 1998; Grönberg *et al.*, 1998; Magalon *et al.*, 1998). It is interesting to observe that the three quinones employed in this work in their oxidized state presented reduction potentials lower than those of the reduced enzymes involved in the denitrification metabolic pathways. This indicates that, according to the estimated redox potential values from the figure 7, redox properties of these quinones did not allow them to be reduced by any enzyme, discarding the possibility that they could have been implicated in the denitrifying process. The main contribution of the quinones added into the denitrifying cultures appears to be more associated to quinone moiety structural properties and hydrophobicity than to their oxidative-reductive capacity.

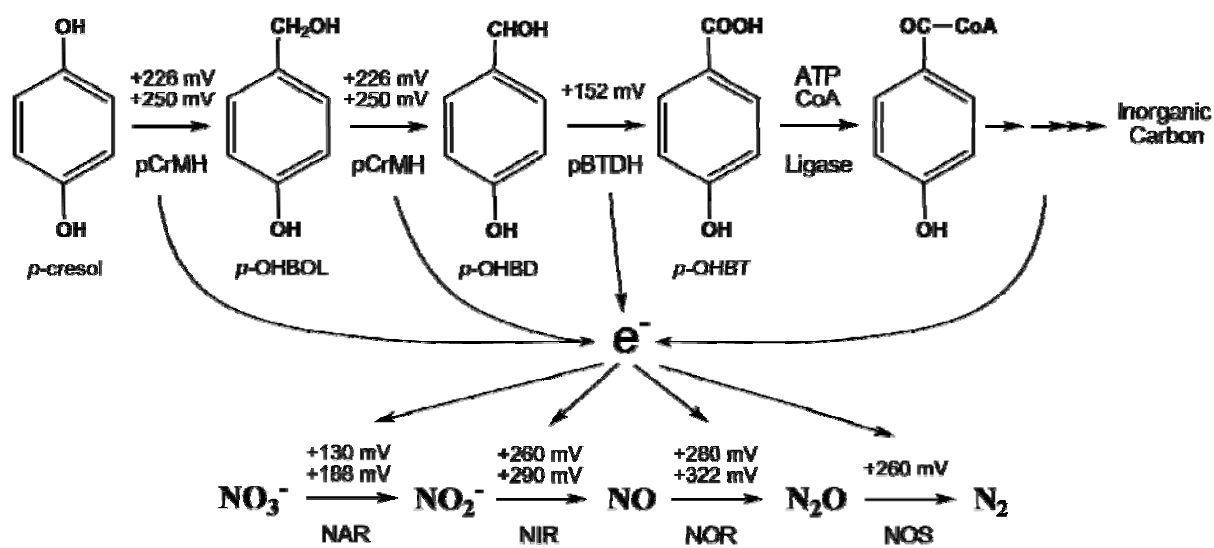


Figure 6. Proposed model for denitrifying process coupled to p-cresol oxidation according to Peters *et al.* (2007). Numerical values represent the oxido-reduction potential ranges for the enzymes involved in the process. This figure does not show the electron transporters implied between the reductive and oxidative processes. All potentials are referred to the standard hydrogen electrode. p-Cresol methylhydroxylase (pCrMH), p-hydroxybenzaldehyde dehydrogenase (pBTDH), nitrate reductase (NAR), nitrite reductase (NIR), nitric oxide reductase (NOR), nitrous oxide reductase (NOS).

Conclusions

While it is generally observed that quinones may be beneficially involved in microbial processes, results from the present work showed that MEN and ALZ can have a marked inhibitory effect on denitrifying process and AQDS no effect at all. As previously discussed, MEN and ALZ could be involved in different mechanisms related with enzymatic inhibition, transport alteration, or toxicity, and additional work is required in this

direction. In this work, results from experiments with AQDS pointed out that the denitrifying inoculum did not present ability to reduce this quinone, suggesting the absence of AQDS-reducing microorganisms in the sludge. The results of this work showed that the chemical structure and the hydrophobicity of quinones besides their redox potential, as chemical models of HS could have additional contributions in microbiological processes. From this discussion, the importance of considering these aspects for the selection of the redox mediators to be added in microbial processes is crucial. This can make more difficult to point out the role of HS in the microbial elimination of contaminants and could limit their application in remediation technologies.

References

- Alkan M., Kharun M., Chmilenko F., 2003. Spectrophotometric determination of molybdenum with Alizarin Red S in the presence of poly(sulfonylpiperidinylmethyle hydroxide). *Talanta* 59, 605–611.
- American Public Health Association (APHA), 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed. APHA, Washington, DC, USA.
- Aranda-Tamaura, C., Estrada-Alvarado, M. I., Texier, A.-C., Cuervo, F., Gómez J., Cervantes F. J., 2007. Effects of different quinoid redox mediators on the removal of sulphide and nitrate via denitrification. *Chemosphere* 69, 1722–1727.
- Biegert T., Altenschmidt U., Ekerskorn C., Fuchs G., 1993. Enzymes of anaerobic metabolism of phenolic compounds. *Eur J Biochem.*, 213, 555–561.
- Bossert D. I., Young L. Y., 1986. Anaerobic oxidation of *p*-cresol by denitrifying bacterium. *Appl Environ Microbiol.* 52, 1117–1122.
- Bradley, M. P., Chapelle, H. F., Lovley, D. R., 1998. Humic acids as electron acceptors for anaerobic microbial oxidation of vinyl chloride and dichloroethene. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3102–3105.
- Bressler C. D., Gray M. R., 2003. Transport and reaction processes in bioremediation of organic contaminants. Review of Bacterial Degradation and Transport. *Int. J. Chem. React. Eng.* 1, 1–16.
- Cadena A., Texier A.-C., González I., Cervantes F., Gómez J., 2007. Qualitative and quantitative determination of a humic model compound in microbial cultures by cyclic voltammetry. *Environ. Technol.* 28, 1035–1044.
- Cervantes, F., Monroy O., Gómez J., 1998. Accumulation of intermediates in a denitrifying process at different copper and high nitrate concentrations. *Biotechnol. Lett.* 20, 959–961.
- Cervantes F. J., Gutiérrez C. H., López K. Y., Estrada-Alvarado M. I., Meza-Escalante E. R., Texier A.-C., Cuervo F., Gómez J. 2008. Contribution of quinone-reducing microorganisms to the anaerobic biodegradation of organic compounds under different redox conditions. *Biodegradation.* 19:235-246.
- Coates J. D., Ellis D. J., Roden E., Gaw K., Blunt-Harris E. L., Lovley D. R., 1998. Recovery of humics-reducing bacteria from a diversity of sedimentary environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1504–1509.

Coates J. D., Cole A. K., Chakraborty R., O'Connor S. M., Achenbach L. A., 2002. Diversity and ubiquity of bacteria capable of utilizing humic substances as electron donors for anaerobic respiration. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2445–2452.

Cooling III F. B., Maloney C. L., Nagel E., Tabinowski J., Odom J. M., 1996. Inhibition of Sulfate Respiration by 1,8-Dihydroxyanthraquinone and other anthraquinone derivatives. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2999–3004.

Cronin C. N., Kim J., Fuller J. H., Zhang X., McIntire W. S., 1999. Organization and sequences of *p*-hydroxybenzaldehyde dehydrogenase and other plasmid encoded genes for early enzymes of the *p*-cresol degradative pathway in *Pseudomonas putida* NCIMB 9866 and 9869. *DNA Sequence* 10, 7–17.

Farrar J. A., Zumft W. G., Thomson A. J., 1998. CuA and CuZ are variants of the electron transfer center in nitrous oxide reductase. *Biophysics.* 95, 9891–9896.

Field J. A., Cervantes F. J., Van Der Zee S, Lettinga G., 2000. Role of quinones in biodegradation of priority pollutants: a Review. *Water Sci. Technol.* 42:215–222.

Field J. A., Cervantes, F. J., 2005. Microbial redox reactions mediated by humus and structurally related quinones. In *Use of Humic Substances to Remediate Polluted Environments: From Theory to Practice*; Perminova, I. V., Hatfield, K., Hertkorn, N., Eds.; NATO Science Series IV: Earth and Environmental Sciences 52; Springer: Dordrecht, The Netherlands, Chapter 17, pp 343–352.

Göbner A., Daniel L. S., Drake L. H., 1994. Acetogenesis coupled to the oxidation of aromatic aldehyde groups. *Arch. Microbiol.* 161, 126–131.

Grönberg, K. L., M. D. Roldan, L. Prior, G. Butland, M. R. Cheesman, D. J. Richardson, S. Spiro, A. J. Thomson, N. J. Watmough., 1998. A low redox potential heme in the dinuclear center of bacterial nitric oxide reductase implications for the evolution of energy-conserving heme-copper oxidases. *Biochemistry* 38, 13780–13786.

Heider J., Boll M., Breese K., Breinig S., Ebenau-Jehle C., Feil U., Gadon N., Laempe D., Leuthner B., Mohamed M. E., Schneider S., Burchhardt G., Fuchs G., 1998. Differential induction of enzymes involved in anaerobic metabolism of aromatic compounds in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica*. *Arch. Microbiol.* 170, 120–131.

Hopper D. J., 1983. Redox potential of the cytochrome *c* in the flavocytochrome *p*-cresol methylhydroxylase. *FEBS Lett.* 161, 100–102.

Hopper J. D., Bossert I. D., Rhodes-Roberts E. M., 1991. *p*-cresol Methylhydroxylase from a denitrifying bacterium involved in anaerobic degradation of *p*-cresol. *J. Bacteriol.* 173, 1298–1301.

- Kihara M., Macnab R. M., 1981. Cytoplasmic pH mediates pH taxis and weak-acid repellent taxis of bacteria. *J. Bacteriol.* 145, 1209–1221.
- Lovley R. D., Fraga L. J., Coates J. D., Blunt-Harris L. E., 1999. Humics as an electron donor for anaerobic respiration. *Environ. Microbiol.* 1, 89–98.
- Magalon A., Asso M., Guigliarelli B., Rothery R. A., Bertrand P., Giordano G. Blasco F., 1998. Molybdenum cofactor properties and [Fe–S] cluster coordination in Escherichia coli nitrate reductase A: investigation by site-directed mutagenesis of the conserved His-50 residue in the NarG subunit. *Biochemistry.* 37, 7363–7370.
- Mauzeroll J., Bard J. A., 2004. Scanning electrochemical microscopy of menadienone-glutathione conjugate export from yeast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 7862–7867.
- Monks T. J., Hanzlik R. P., Cohen G. M., Ross D., Graham D. G., 1992. Quinone chemistry and toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 112, 2–16.
- Newman K. D., Kolter R., 2000. A role for excreted quinones in extra cellular electron transfer. *Nature* 405, 94–97.
- Peña-Calva A., Olmos D. A., Viniestra-Gonzalez G., Cuervo-Lopez F. M., Gomez J., 2004. Denitrification in presence of toluene, m-xylene and benzene by denitrification: kinetics mass balance and yields. *Appl. Biochem. Biotech.* 119, 195–208.
- Peters F., Heintz D., Johannes J., van Dorsselaer A., Boll M., 1980. Genes, Enzymes, and Regulation of para-Cresol Metabolism in Geobacter metallireducens, *J. Bacteriol.*, 189, 4729-4738.
- Powis G., Appel L. P., 1980. Relationship of single-electron reduction potential of quinones to their reduction by flavoproteins. *Biochem. Pharmacol.* 29, 2567–2572.
- Ran Y., Jain N., Yalkowsky H. S., 2001. Prediction of aqueous solubility of organic compounds by the general solubility equation (GSE). *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 41, 1208–1217.
- Reguera G., McCarthy D. K., Mehta T, Nicoll S. J., Tuominen T. M, Lovley D. R., 2005. Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature* 435, 1098–1101.
- Rodríguez C. E., Shinyashiki M., Froines J., Yu R. C., Fukuto J. M., Cho A. K., 2004. An examination of quinone toxicity using the yeast Saccharomyces cerevisiae model system. *Toxicology* 201, 185–196.
- Sasarman A., Puervis P., Portelance V., 1974. Role of menaquinone in nitrate respiration in Staphylococcus aureus. *J. Bacteriol.*, 117:911-913

Schink B., Philipp B., Müller J., 2000. Anaerobic degradation of phenolic compounds. A review. *Naturwissenschaften* 87, 12–23.

Schultz T. W., Bearden A. P., 1998. Structure-Toxicity relationships for selected naphthoquinones to tetrahymena pyriformis. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 61, 405–410.

Scott D. T., McKnight D. M., Blunt-Harris E. L., Kolesar S. E., Lovley D. R., 1998. Quinone moieties act as electron acceptors in the reduction of humic substances by humics-reducing microorganisms. *Environ. Sci. Technol.* 32, 2984–2989.

Silvestrini, M. C., Falcinelli S., Ciabatti I., Cutruzzola F., Brunori M., 1994. *Pseudomonas aeruginosa* nitrite reductase (or cytochrome oxidase): an overview. *Biochimie.* 76, 641–654.

Sikkema J., De Bont J. A. M., Poolman B., 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.* 59, 201–222.

Strohm O. T., Griffin B., Zumft G. W., Schink B., 2007. Growth yields in bacterial denitrification and nitrate ammonification. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 1420–1424.

CAPITULO 2

PHYSIOLOGICAL IMPLICATIONS OF ELECTRIC FIELDS APPLIED ON A DENITRIFICATION PROCESS

Abstract

The effect of the application of three electric potentials (EP) (-187 mV, -279 mV and +104 mV) on a denitrifying process was explored. It was observed that the denitrifying sludge was able to support the oxidation of *p*-cresol with the application of the EP in the absence of nitrate, but it was unable to drive the denitrification without an electron donor. On denitrification, the applied EP uncoupled the oxidative from the reductive process, favoring the *p*-cresol oxidation over the production of N₂. Additionally effects at biochemical level were observed. At potentials of -279 and +104 mV, the nitrate and nitrite consumption was affected as well as the transformation of *p*-hydroxybenzoate. However, at -187 mV, effects seemed to occur only on transport of substrates. This paper presents evidence that denitrification had very characteristic and different physiological behaviors for each EP assayed.

Keyword: denitrification, p-cresol, electric potential

Introduction

Denitrification is the strongest oxidative process after the aerobic respiration. Therefore, this process is of great importance for biogeochemical cycles and it is widely applied to wastewaters treatment. Several studies have been done in order to study the variables that can influence the denitrification. Some of these variables are the pH, temperature, microbial community, relation between nitrate and organic matter concentration, ORP, kind of electron source, trace elements, and most recently the electric fields (Bernet *et. al.*, 1995; Mateju *et. al.*, 1992; Feleke *et. al.*, 1993; Hoon *et. al.*, 2003; Beschkov *et. al.*, 2004).

There are many works that have been published about the possible effects of electric fields over denitrification, but the majority has not taken into account physiological aspects from the denitrifying cultures. Gregory *et. al.* (2004) and Beschkov *et. al.* (2004) have imposed electric fields to the denitrification in *Pseudomonas denitrificans* and the nitrate reduction

to nitrite on *Geobacter metallireducens*. However, it was not possible to differentiate the real contribution from the electrodes in this type of processes, because the current intensities used (5 mA to 75 mA) lead to electrolysis reactions that have an abiotic impact on denitrification process. Zhang *et al.* (2005) have given evidences of the anode and the cathode separately, which can create microenvironments that influence in very different way the denitrifying responses due to highly oxidative and highly deoxidizing substances produced by reactions over the electrodes.

Some physiological aspects that have not been taken into account were the fact that electron transport movement is fundamental in the cellular metabolism. The most productive routes for the energy generation, involve the establishment of a proton-motive force through the cytoplasmic membrane for the ATP formation. Concerning this, there are macro-molecules with oxido-reduction activity associated to membranes that can transport electrons extracellularly (Newman and Kolter, 2000; Nevin and Lovley, 2002). These physiological evidences have lead to use electrodes on the denitrification, using them as electron donors or final electron acceptors. It has been observed that organic compounds can be oxidized in microbial cultures, using anode (with positive electric potentials) as final electron acceptors (Bond *et. al.*, 2002; Bond and Lovley, 2003). The cathodes can be also used as electron donors (with negative electric potentials) in the anaerobic respiration. In other denitrification works it has been explored the ability of microorganisms to use as electron donor, the hydrogen produced by electrolysis on the surface of electrodes (Sakakibara and Kuroda, 1993; Kuroda *et. al.*, 1996; Feleke and cabbage., 1998; Sakakibara and Nakayama, 2001).

The form which the electrical field is applied could lead to a series of secondary reactions that may influence the process or mask the true effect of the electrical field on the denitrifying metabolism. For these reasons, it has not been possible to determine the impact of the electric fields on the physiological and biochemical behavior of denitrifying culture. In the present work the effect of tree electric potentials was studied (-187 mV, -279 mV and +104 mV vs. standard hydrogen electrode, SHE). For this purpose, low electric currents (less than 10 μ A) were used in a bioelectrochemical reactor, to evaluate the denitrifying

responses. The microbial denitrifying consortium used was physiologically characterized and produced under continuous steady state conditions.

Materials and Methods

Inoculum and culture medium composition

The denitrifying sludge used for inoculating batch cultures was produced in a continuous stirred tank reactor with sodium acetate, according to media and culture conditions by Cadena *et. al.* (2008). At these culture conditions the consumption efficiencies were $99.7 \pm 1.3\%$ for nitrate and $88.9 \pm 1.1\%$ for acetate. The yield values for products such as biomass, molecular nitrogen, and inorganic carbon (HCO_3^- and CO_3^{2-}) were 0.20 ± 0.08 g biomass-C•g acetate-C consumed⁻¹, 0.75 ± 0.1 g N_2 •g NO_3^- -N consumed⁻¹, and 0.70 ± 0.07 g inorganic carbon•g acetate-C consumed⁻¹, respectively. The steady state conditions were maintained for 2 years. The basal medium composition used for batch cultures was (g L⁻¹): KH_2PO_4 (2.0), $\text{CaCl}_2(2\text{H}_2\text{O})$ (0.6), $\text{NaMoO}_4(2\text{H}_2\text{O})$ (0.12), $\text{MgSO}_4(7\text{H}_2\text{O})$ (0.4), $\text{FeCl}_3(6\text{H}_2\text{O})$ (0.1), and $\text{CuSO}_4(5\text{H}_2\text{O})$ (0.02). *p*-Cresol was used as electron donor at an initial carbon concentration of 50 mg C L⁻¹. The NO_3^- -N concentration was adjusted to obtain a C/N ratio of 0.98 (w w⁻¹) which was close to the stoichiometric value. Three electric potentials were tested: -279 mV, -187 mV and +104 mV vs SHE, the potential values were obtained from Cadena *et. al.* (2008). For sterile controls, the sludge was sterilized at 120°C for 20 min and the culture medium was filtered through a nylon membrane (0.45 μm).

Culture method.

All experiments were conducted by duplicate in a two liters bioelectrochemical reactor. The working volume was 1250 mL and a headspace of 500 mL. The medium was flushed with helium for 10 min in the reactor. Sludge was disposed in the medium at 1 g volatile suspended solids (VSS) per liter and flushed with He until reaching a constant oxidation-reduction potential value (ORP). Finally, *p*-cresol was added at 50 mg C L⁻¹. The initial pH value was adjusted to 7.0 with a 1 N NaOH solution. After sealed, the reactor headspace

was saturated with He. Control cultures were carried out without *p*-cresol, nitrate or electric potentials.

All the cultures were incubated for 60 h at 30°C in darkness and stirred at 150 rpm. For kinetic studies, samples were taken at different times, centrifuged (450 g, 15 min), filtered (0.45 µm) and analyzed. NO₃⁻ and *p*-cresol consumption efficiencies (E_{NO_3} , (g NO₃⁻-N consumed g NO₃⁻-N fed⁻¹) × 100; $E_{p\text{-cr}}$ (g *p*-cresol-C consumed g *p*-cresol-C fed⁻¹) × 100), denitrifying and oxidation yields (Y_{N_2} , g N₂ g NO₃⁻-N consumed⁻¹; Y_{IC} , g inorganic carbon g *p*-cresol-C consumed⁻¹) and specific consumption rates (q_{NO_3} , $q_{p\text{-cr}}$, mg substrate consumed g VSS-1h⁻¹) were determined to evaluate the physiological response of the denitrifying sludge to electric potentials (-187 mV, -279mV and +104 mV vs. standard hydrogen electrode (SHE)).

Bioelectrochemical reactor

For electrochemical studies a bioreactor was adapted with a stainless steel rotating cylinder electrode as working electrode (work area, 156.4 cm²) and a counter electrode of rolled stainless steel sheet (work area, 480.5 cm²). The counter electrode is concentric to the reference electrode and working electrode (Figure 1). The electric potential was imposed with a standard calomel electrode XR100 (Radiometer Analytical) coupled to a Luigin capillary. Chronopotentiometry were performed with an EG&G PARC 273 potentiostat/galvanostat controlled by an EG&G PARC 270 software, for electric potential (EP) applications. ORP and pH were measured on-line. pH was measured with a Hanna GLP pH meter HI-98140 while ORP with a Ag/AgCl combination electrode (Conductronic, 003B) connected to Digi-Sens meter (Cole-Parmen, 5938-00). The current was measured between counter electrode and working electrode with Hewlett-Packard multimeter model 3478A. The rotating cylinder electrode was turned with a Heidolph stirrer RZR-1.

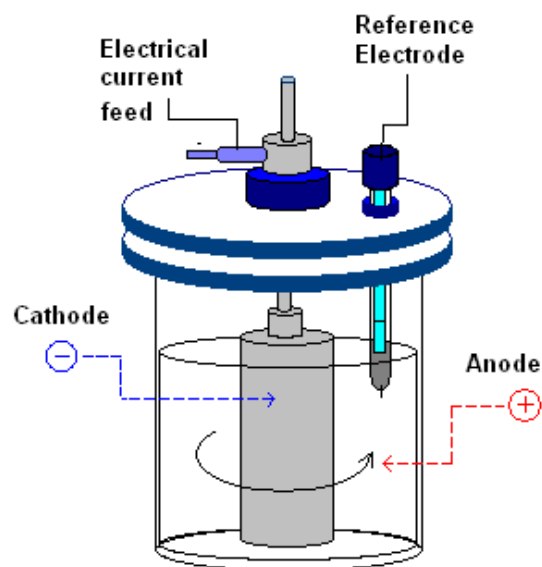


Figure 1. Bioelectrochemical reactor

Analytical methods

Nitrate, nitrite, *p*-cresol, *p*-hydroxybenzylalcohol (*p*-OHBOL), *p*-hydroxybenzaldehyde (*p*-OHBD) and *p*-hydroxybenzoate (*p*-OHBT), were analyzed by HPLC (Waters, 600) with a photodiode array detector (Waters, 2996) as previously described by Cadena *et al.* (2008). The CO₂ and HCO₃⁻ were measured as inorganic carbon (IC) with a total organic carbon (TOC) analyzer (Shimadzu, TOC-5000). CO₂, CH₄, N₂O, and N₂ were determined by gas chromatography (Varian Star 3350 model) using a thermal conductivity detector as previously described by Peña-Calva *et al.* (2004). The VSS were determined according to Standard Methods (APHA, 1998).

Results and Discussion

The results presented below has the following order, first it is presented the data obtained in controls, which evaluates the effect of EP in the culture medium and denitrifying inoculum behavior, first in the absence of a terminal electron acceptor and then the absence of a donor, in order to see what are the contributions of the EP in the sludge endogenous metabolism and to evaluate abiotic contributions of EP. Subsequently, study results show the imposition of the EP in the denitrifying culture with *p*-cresol

Control denitrifying batch cultures

The assays inoculated with sterile biomass showed that there was no significant consumption of *p*-cresol and nitrate, with or without the application of EP (less than 3%). These results suggested that electrolysis (electrochemical reduction or oxidation) of the substrates was negligible. Abiotic reactions were also discarded. The electric current between the working electrode (cathode) and the counter electrode (anode) was kept less than 10 μA in all the experiments. Therefore, the production of highly oxidative and highly deoxidizing substances over electrodes was negligible.

In nitrate/inoculum/EP assay (Figure 2A), the EP application did not promote the microbial reduction of nitrate in the absence of an electron donor. The scarce nitrate consumed at any treatment was converted to nitrite and molecular nitrogen was not detected (Figure 2B). Nitrite formation could not be attributed to EP since control without EP formed nitrite. These results indicated that the cathode could not be used as electron donor.

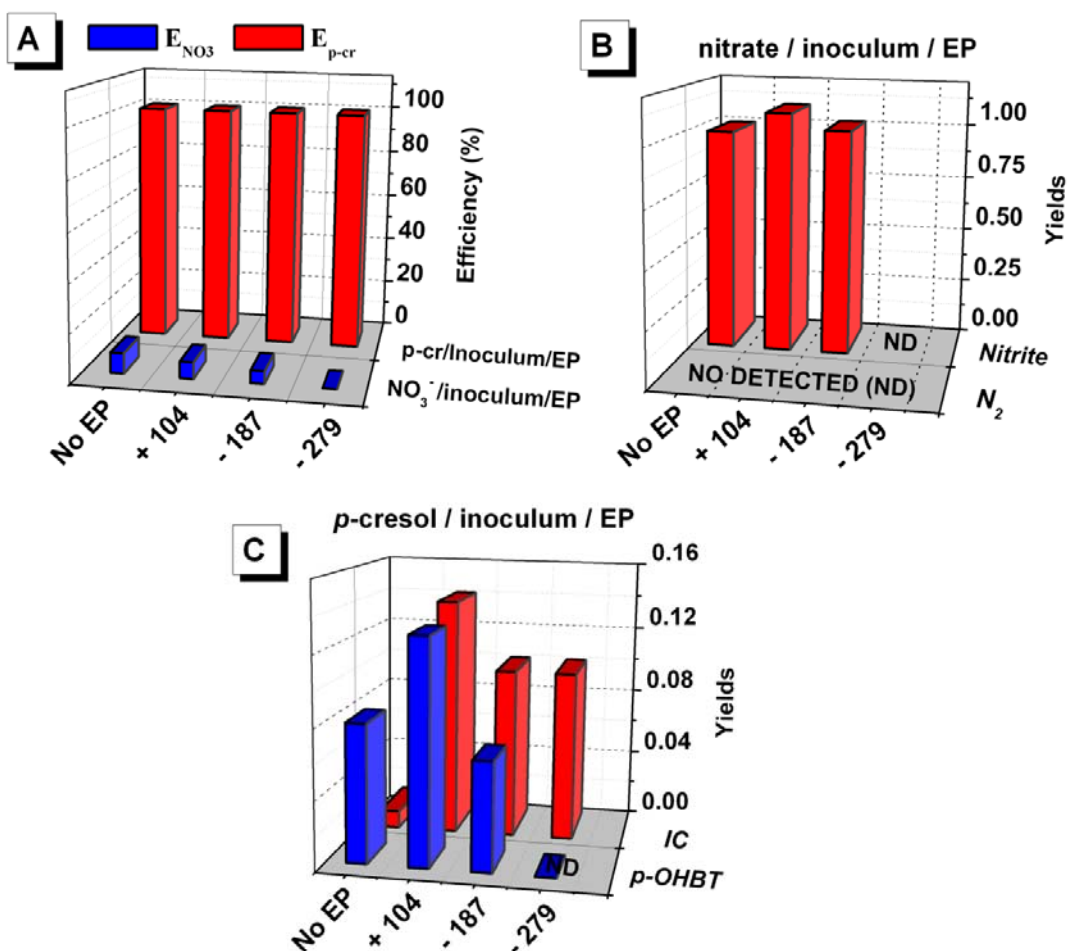


Figure 2. Effect of a denitrifying culture at different electric potentials (EP) imposed on the cylinder electrode. A) Consumption efficiencies for the control *p*-cresol/inoculum/EP and nitrate/inoculum/EP; B) Yields of molecular nitrogen and nitrite for nitrate/ inoculum/EP; C) Yields of inorganic carbon and *p*-OHBT for *p*-cresol/inoculum/EP. ND, product not detected. All the parameters were determined at 30 h of incubation. No EP, control without application of electric potential.

In assays with only *p*-cresol (*p*-cresol/inoculum/EP), measurements of IC and TOC showed that the overall carbon added was recovered as carbon dissolved in the medium after 63 h of incubation. The compounds identified were *p*-OHBT, *p*-OHBD and *p*-OHBOL. The final oxidation product was measured as IC and the other carbon was estimated as organic carbon from a carbon balance. The *p*-OHBD and *p*-OHBOL were negligible. These results suggest that *p*-cresol followed the oxidation pathway proposed by Bossert and Young (1986) for denitrifying cultures through the sequential formation of *p*-OHBOL, *p*-OHBD, and *p*-OHBT. The *p*-cresol consumed (with or without EP) was principally transformed to a

compound that has not been yet identified; but it could be an intermediate of the *p*-cresol oxidation pathway where the *p*-cresol it is transformed to *p*-OHBT.

With or without EP the *p*-cresol was totally consumed (Figure 2A and 3A). As the E_{p-cr} was very high, the EP did not have influence in *p*-cresol consumption (Figure 2A), thus the denitrifying inoculum was able to transform the *p*-cresol in the absence of exogenous electron acceptors, including the EP. The IC yields for each EP were determined at 30 h of culture so that *p*-cresol was totally consumed at this time (Line I, Figure 3).

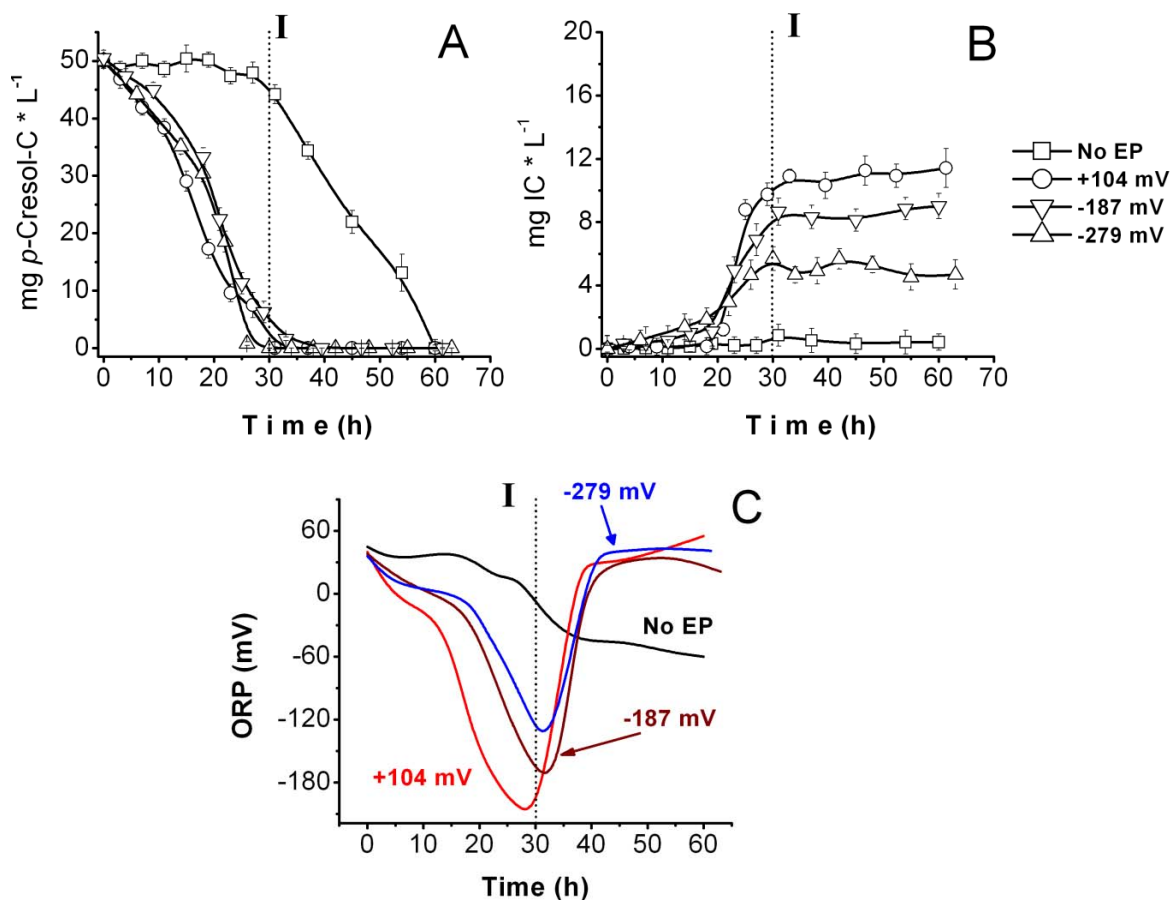


Figure 3. Kinetic profiles of culture control *p*-cresol/inoculum/EP. *p*-Cresol consumption (A) and inorganic carbon production (B) under different electric potential application by electrodes. ORP behavior (C) of *p*-cresol consumption without electron acceptor. No EP, control without application of electric potential.

The application of oxidative potentials, increments the production of IC and *p*-OHBT. At higher values of EP the mineralization activity in electron acceptor absence was increased in 4 to 10 folds (Figure 2C and 3B). The oxidation of organic matter by electrolysis was

previously discarded and the anode could not serve as electron acceptor for the biological oxidation. In this way the results show that the electric fields applied promote the oxidation of organic matter by the endogen metabolism.

The specific consumption rate (q_{p-cr} , mg *p*-cresol consumed/g VSS.h) for the EP -187 mV and -279 mV presents an increment of 36% respect to No EP and +104 mV (Table 1). From the Figure 3A, it can be inferred that application of EP enhanced the *p*-cresol consumption, as the lag phase was considerably shorter when EP was applied. The diminishing of the lag phase could be due to three different possible implications. The two principals are the enhancement on genetic expression or catalytic functions of enzymes implied on *p*-cresol oxidation. Other possibility is the modification of substrate transport. However a combination among them is possible also. It must be noted that the denitrifying inoculum was never exposed to *p*-cresol or another aromatic compound prior to these experiments.

Table 1. Specific consumption rates of p-cresol in absence of final electron acceptors. No EP = no potential applied.

Treatment *	q_{p-cr}
No EP ¹	1.44 ± 0.04
+104 mV ¹	1.89 ± 0.15
-187 mV ²	2.50 ± 0.10
-279 mV ²	2.03 ± 0.15

^{1, 2}. Treatments that did not present significant statistical differences according to Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test with a level of confidence of 95 %.

Measuring of the ORP over time was made. The first assays without electron donor (nitrate/inoculum/EP) shown an ORP up to +40 mV with little variation along the 63 h of culture (data no shown). There was not variation on the ORP behavior at any EP applied, that it is predictable, as no nitrate was consumed which is the main compound that promotes changes in ORP of denitrifying cultures (Hoon *et. al.*, 2003). When *p*-cresol was present a typical ORP with reductive behavior, respect to the control without EP was observed (Figure 3C). At any EP the higher ORP decreasing were reached at 30 hours and

then these values return up to +40 mV. The higher negative ORP value reached (Line I, Figure 3), coincides when the *p*-cresol was totally consumed. This increase of the ORP might be related to the transformation of the *p*-cresol consumed, without discarding the possible influence of the IC produced. The *p*-OHBT produced could not increase the potential in the culture medium (Peres *et. al.*, 2004). The increase in ORP has been associated to transformation of organic matter, so that the biomass and organic pollutants are typically the reducers (Li and Bishop, 2001).

The ORP gives a general reading on the behavior of the oxidizers/reducers in the medium and it has been reported as a variable of response of each biogeochemical process. Additionally, it has been also proposed as a parameter that influences the efficiency of denitrification (Riodet *et. al.*, 1999; Hoon *et. al.*, 2003). Although constant positive potentials were imposed such as +104 mV, the microbial metabolism could decrease the ORP to -200 mV. Despite, that an electric field was applied, the metabolism of the denitrifying inoculum was the main responsible for the ORP behavior. The change on the ORP showed possible metabolic modifications in the endogenous metabolism by the EP imposed. The different EP imposed favored the oxidation of organic matter and decrease the lag phase in metabolism of aromatic compounds. It was also incapable to promote the denitrification or any nitrate reduction in absence of an electron donor.

Denitrification under electrical fields

Under denitrifying conditions the stoichiometric C/N according to Equation 1 for the reduction of NO₃⁻ to N₂ and *p*-cresol oxidation is 0.88 mg *p*-cresol-C/mg NO₃⁻-N⁻¹ and the C/N used in all experiments was of 0.98. The control (no EP applied) transformed the overall *p*-cresol to IC (Figure 4A), showing a *p*-cresol oxidation excess of 11 % that does not correspond to nitrate reduced. This excess might be associated to the endogenous metabolism as it was seen in the controls with no electron acceptor added.



When the three EP were applied (nitrate/*p*-cresol/inoculum/EP) the *p*-cresol was totally consumed (Figure 4). The intermediary *p*-OHBT presented transitory accumulation with

different level for each EP value (Figure 4, lines II and III). There are important effects of the EP applied on the oxidative process. One of the effects appears to be between the *p*-OHBT accumulation and the production of IC. The control (no EP) and -187 mV presented a similar oxidative *p*-cresol behavior with an only apparent time gap around 12 h. There were no differences in lag phase of *p*-cresol consumption at any case. Although there was a diminution in the specific consumption rates when EP was more negative (Figure 5A, q_{p-cr}), the carbon yields (Figure 5C) showed, that the main product of the *p*-cresol oxidation was the IC after the *p*-OHBT.

In the nitrate consumption, the nitrate consumed was recovered as nitrite and/or molecular nitrogen in all cases, showing a very close nitrogen balance at the end of the assays. In all cases, the intermediates detected such as nitrous oxide or nitric oxide at any EP assayed was negligible. Seemingly among the assays with no EP applied and -187 mV (Figure 4B and F) presented a difference in the lag phase of nitrate consumption about 10 hours, which could affect the overall nitrate reduction. This is corroborated with the nitrite accumulation which concentration was the same one in both cases with an difference of 18 hours (Figure 4, lines II' and III'). These time gap agrees with the maximum *p*-OHBT accumulation in both cases (Figure 4, II and III). The EP impacted the consumption of nitrate at EP -279 mV and +104 mV. When cultures were stopped there was a nitrite accumulation of 36 mg and 20 mg of $\text{NO}_2^- \text{-N L}^{-1}$ for EP -279 mV and +104 mV respectively, although they had the same maximum production of N_2 ($11 \text{ mg N}_2 \text{ L}^{-1}$) (Figures 3D and H).

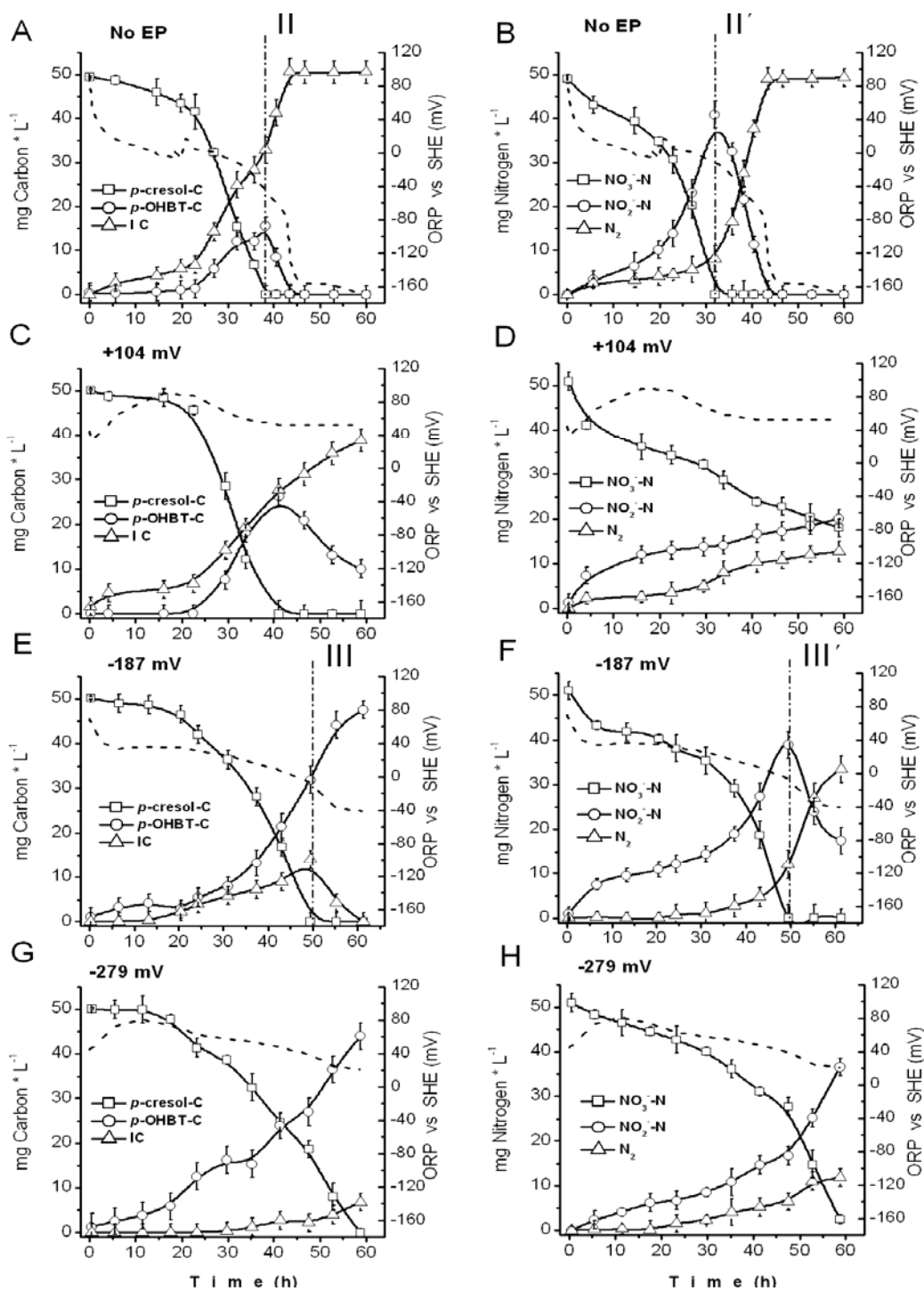


Figure 4. Kinetic profiles of *p*-cresol consumption and oxidation of intermediates identified, under different electric potentials (No EP, +104 mV, -187 mV and -279 mV vs. SCE), each figure shows the ORP (- -) behavior obtained under denitrifying conditions for each potential applied. II and II', III and III', time respectively when the *p*-cresol and nitrate were completely consumed and nitrogen production increases, showing a time gap between denitrification on -187 mV and the control no EP.

Contrary to the organic compound, there was not a linear decreasing in q_{NO_3} with the application of negative potentials (Figures 4A). At positive potentials (+104 mV) the smallest q_{NO_3} value was obtained. Whereas the experiments were stopped to the 63 hours, the production of N_2 remained growing (Figure 5F). The denitrifying process was affected significantly by the application of the electrical fields (Y_{N_2} , Figure 5C). This behavior apparently was a consequence of the decrease in the nitrate consumption and nitrite accumulation.

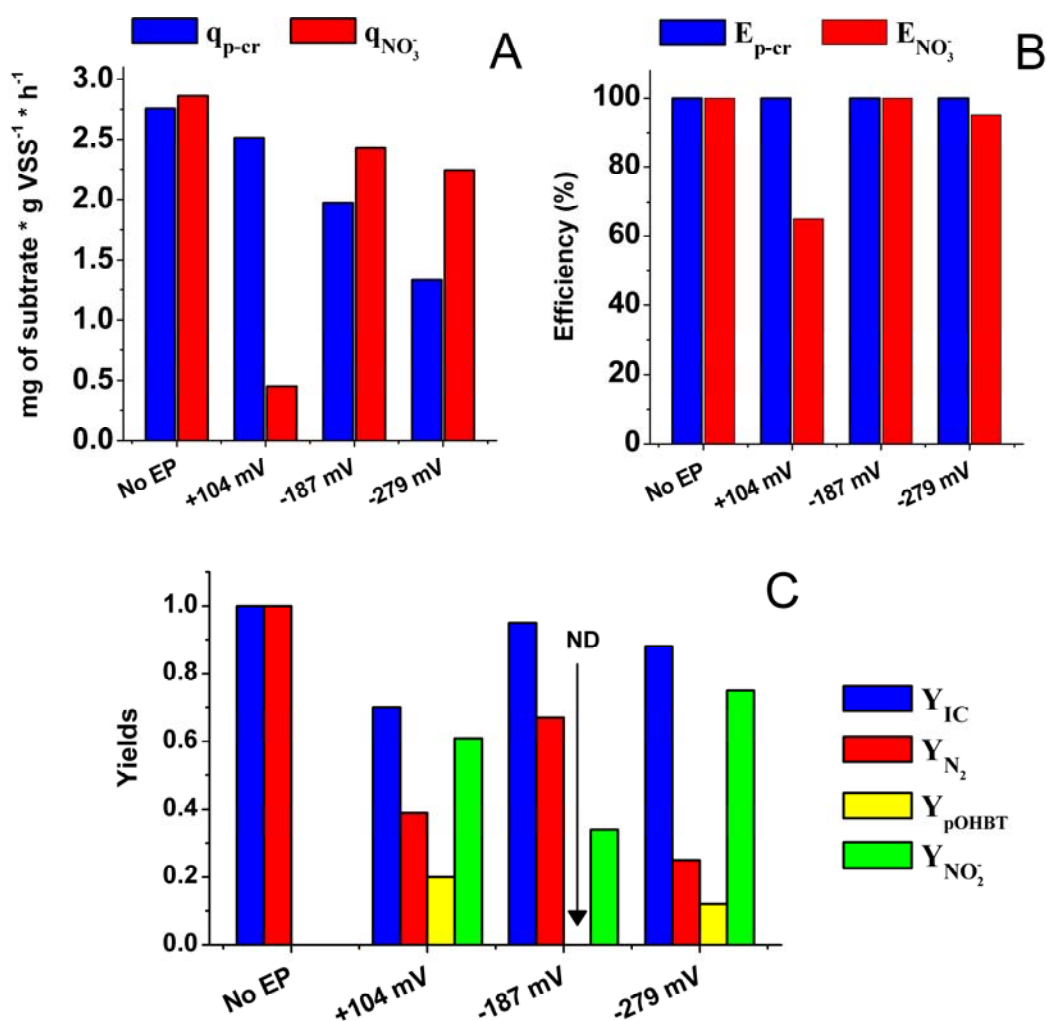


Figure 5. Physiological behavior of the denitrifying process under different electric potentials applied with electrodes: A) Specific consumption rates of *p*-cresol ($q_{\text{p-cr}}$) and nitrate (q_{NO_3}). B) Consumption efficiencies of *p*-cresol and nitrate. C) Yields of IC, N_2 and principal intermediaries identified. No EP, control without electric potential application. ND = *p*OHBT not detected. All the parameters were determined at the 60 h of incubation.

In controls without *p*-cresol, the nitrate could not be reduced at any EP applied, suggesting that there was not a competition between the *p*-cresol and the anode as electron donors for nitrate reduction, as it has been proposed by other authors (Beschkov et. al., 2004). Apparently there was a direct incidence in denitrifying enzymes due to the applied potentials, due to accumulation of nitrite and nitrate consumption behavior. At the EP +104 mV and -279 mV was altered the nitrate reductase and the nitrite reductase mainly. The hypothesis of this effect is related to the fact that all the intermediaries of the denitrifying pathway were measured and the main effect was observed at these biochemical levels.

According to results the biomass growth was negligible with and without application of EP. Thus, the effects observed with the application of EP were centered on the dissimilative metabolism. When data analysis of the oxidative metabolism with the denitrifying reduction (Figure 4) is carried out, it can be seen that there was an uncoupling between both of them, mainly to EP +104 mV and -279 mV.

As in control, at +104 mV and -279 mV (52.5% and 46.8%, respectively) was detected an excess of bicarbonate produced which are not corresponding with the N₂ produced neither to the nitrite accumulated. This suggests an uncoupling of the oxidation process caused by the application of the EP. Part of the oxidation process was operating separately of the denitrifying metabolism. This uncoupling may have provoked the lack of reductive power for the nitrate reduction explaining the nitrite accumulation and low production of molecular nitrogen. The application of those EP levels somehow turns aside the oxidation of the *p*-cresol to the endogenous metabolism as it could be seen in controls, apparently subtracting reducer power to the denitrification.

In the assay nitrate/*p*-cresol/inoculum with no EP applied, (Figure 4A and B), it can be observed that the ORP diminishing in the first 10 h about 90 mV and staying around 0 mV until the 30 h. At this time the whole nitrite accumulated was reduced to N₂. When the process finished, the ORP remained about -160 mV just when the maximum N₂ production increased, behavior proper of the denitrification (Fuerhacker et. al., 2001). With the EP -187 mV, the delay for the denitrifying process it might be due to an increase in the lag phase. This suggestion could be supported by the ORP behavior, since the process began to

denitrify at the 50 hour (III'), which is the time which the ORP began to decay. For EP +104 mV and -279 mV, the ORP were kept above of +40 mV along the 63 hours of assay. The fact that ORP was maintained in a positive level during the whole experiment could be explained by the diminishing in the consumption efficiency of nitrate, and accumulation of nitrite which both are of strong oxidizer nature (Zhang *et. al.* 2005). The presence of nitrate and nitrite in the culture medium did not let see the influence of the organic matter oxidation on the ORP level, as it were seen in the control without final electrons acceptor.

The general effect on the decrease of lag phase could be explained by two possible physiological consequences, the first is that is affected the substrate consumption possibly by an affectation in the substrate transport (Weaver and Chizmadzhev. 1996; Dressa *et. al.*, 2003). The second is that the enzymes of the first *p*-cresol oxidation steps (Cusanovich *et. al.*, 1991), might be affected their genetic expression and production. There was a direct effect of EP over nitrate and nitrite reductases that could vary with its value. The direct effect it is proposed so that the possible effects over the expression of denitrifying enzymes were discarded because they are constitutive on the initial inoculum. In this way a more positive potential imposed could favored the oxidation of the *p*-cresol by an apparently enhanced endogenous metabolism. According to results obtained the ORP behavior in the liquor was more influenced by the relationship of the substrates and byproducts profiles more than different EP applied, showing that ORP is influenced by the nature of the biologically mediated degradation of organic carbon.

Conclusions

The present study showed that some levels of electric fields applied to denitrifying cultures affected the process significantly, uncoupling the oxidative process of the nitrate reduction, favoring the oxidation of organic matter over the molecular nitrogen production. It was also evidenced that through the application of electrical potentials effects at biochemical level were observed as nitrite was accumulated due to inhibition of nitrite reductase enzyme. At the *p*-cresol oxidative level the *p*-OHBT was determined as transitory intermediates. This work showed that the effects on the metabolism of substrates, specific rates and yields are independent of the increase of electric potentials values. The application of EP did not

increase the oxidation rate neither the denitrification yield as the molecular nitrogen decreased.

References

American Public Health Association (APHA), 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed. APHA, Washington, DC, USA.

Bernet N., Bizeau C., Moletta R., Cornier J. C., Deguin A., 1995. Study of physicochemical factors controlling nitrite build-up during heterotrophic denitrification. *Environ Technol.* 16:165-172

Beschkov V., Velizarov S., Agathos S.N., Lukova V., 2004. Bacterial denitrification of waste water stimulated by constant electric field. *Biochem. Eng. J.* 14:141–145

Bond, D.R., Holmes, D.E., Tender, L.M., and Lovley, D.R. 2002. Electrode-reducing microorganisms that harvest energy from marine sediments. *Science* 295:483–485.

Bond, D.R., and Lovley, D.R. 2003. Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:1548–1555.

Bossert D. I., Young L. Y., 1986. Anaerobic oxidation of *p*-cresol by a denitrifying bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 52:1117–1122.

Cadena A., Texier A.-C., González I., Cervantes F., Gómez J., 2009. Inhibitory effects of quinoid redox mediators on a denitrifying culture. In press.

Cusanovich, M. A., Meyer, T. E., Bartsch, R. G. 1991. Flavocytochrome *c*. In *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes*, ed. F. MOiler, 2:377-93. Boca Raton: CRC Press. 506 pp.

Dreesa, K. P., M. Abbaszadegan, and R. M. Maiera. 2003. Comparative electrochemical inactivation of bacteria and bacteriophage. *Water Res.* 37:2291–2300.

Feleke Z, Araki K, Sakakibara Y, Watanabe T, Kuroda M. 1993. Selective reduction of nitrate to nitrogen gas in a biofilm-electrode reactor. *Wat. Res.* 32(9):2728–34.

Fuerhacker M., Bauer H., Ellinger R., Sree U., Schmid H., Zibuschka F. and Puxbaum H. 2001. Relationship between release of nitric oxide and CO₂ and their dependence on oxidation reduction potential in wastewater treatment. *Chemosphere.* 4:1213-1221.

Gregory K.B., Bond D.R., Lovley D.R. 2004. Graphite Electrodes as Electron Donors for Anaerobic Respiration. *Environ. Microbiol.* 6(6):596-604

- Hoon S. S., Yeom H. S., Choi S. S., Yoo J. Y., 2003. Effect of oxidation-reduction potential on denitrification by *Ochrobacterium anthropi* SY509. *J. Microbiol. Biotechnol.* 13:473–476.
- Kuroda M., Watanabe T. and Umedu Y., 1996. Simultaneous oxidation and reduction treatments of polluted water by a bio-electro reactor. *Wat. Sci. Technol.* 34(9):101–108.
- Li B., Bishop L. P., 2001. The application of ORP in activated sludge wastewater treatment processes. *Environ. Eng. J.* 5:309–320.
- Mateju V., Čižinská S., Krejčí J., Janoch T., 1992. Biological water denitrification—A review. *Enz Microbiol Technol.* 3:170-183
- Newman K. D. y Kolter R., 2000. A Role for Excreted Quinones in Extra cellular Electron Transfer. *Nature* 405:94-97.
- Nevin K. P. and Lovley D. R. 2002. Mechanisms for Fe (III) oxide reduction in sedimentary environments. *Geomicrobiol. J.* 19:141-159
- Peña-Calva A., Olmos D. A., Viniegra-Gonzalez G., Cuervo-Lopez F. M., Gomez J., 2004. Denitrification in presence of toluene, m-xylene and benzene by denitrification: kinetics mass balance and yields. *Appl. Biochem. Biotech.* 119, 195–208.
- Peres A. S. J., Melo de Carvalho H. L., Boaventura A. R. R., Costa A. V. C., 2004. Characteristics of *p*-hydroxybenzoic acid oxidation using Fenton's reagent. *J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* 39, 2897–913.
- Riondet C., Cachon R., Wache Y., Alcaraz G., Divies C., 1999. Changes in the proton-motive force in *Escherichia coli* in response to external oxidoreduction potential. *Eur. J. Biochem.* 262, 595–599.
- Sakakibara Y, and Kuroda M. 1993. Electric prompting and control of denitrification. *Biotech. Bioeng.* 42:535–537.
- Sakakibara Y, and Nakayama T. 2001. A novel multi-electrode system for electrolytic and biological water treatments: electric charge transfer and application to electric charge transfer and application to denitrification. *Water Res.* 35(3):768–78.
- Weaver J. C., and Chizmadzhev Y. A. 1996. Theory of electroporation: a review. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 41:135–160.
- Zhang L., Jia J., Ying D., Zhu N., Zhu Y. 2005. Electrochemical effect on denitrification in different microenvironments around anodes and cathodes. *Res. Microbiol.* 156:88–92.

CONCLUSIONES
GENERALES

CONCLUSIONES GENERALES

La evidencia presentada en este trabajo muestra que la presencia de las diferentes tipos de quinonas, cada una con propiedades fisicoquímicas distintas, provoca efectos metabólicos característicos que pueden variar con la concentración. Mientras que en la literatura existe una diversidad de trabajos donde se reporta que las quinonas presentan beneficios a los procesos microbianos. Los resultados de este trabajo indican que la menadiona y la alizarina pueden tener efectos inhibitorios sobre el proceso desnitrificante; además de que la AQDS no presentó efecto alguno sobre el proceso desnitrificante a ninguna de las concentraciones ensayadas. La evidencia apunta a que la menadiona y la alizarina pueden estar implicadas en diferentes procesos relacionados con inhibición enzimática, alteración del transporte de sustratos o toxicidad. Resultados de los experimentos con AQDS, indican que el inoculo no presentó la habilidad de oxidar o reducir a la quinona, mucho menos de utilizarla como coadyuvante redox; sugiriendo la ausencia de microorganismos reductores de AQDS en el inoculo. El comportamiento del proceso desnitrificante, por la aplicación de los potenciales redox de las quinonas mediante electrodos, fue diferente al observado en la adición de quinonas; y aunque también presentó efectos inhibitorios en la desnitrificación, promovió la oxidación de materia orgánica por el metabolismo endógeno, desacoplando la reducción de nitrato a nitrógeno molecular de la oxidación de p-cresol, todo esto por la acción del campo eléctrico.

Los resultados generales, muestran que la estructura química y la hidrofobicidad de las quinonas son las responsables de los fenómenos observados; y aparentemente no hay una implicación de su potencial redox en el proceso microbiológico. Los resultados obtenidos en el trabajo doctoral, resaltan la importancia de considerar los aspectos de la estructura química, en conjunto con el potencial redox, para la selección de mediadores redox que puedan ser utilizados en proceso microbianos. Esta información sugiere que el papel que juegan las sustancias húmicas en los procesos biogeoquímicos, así como en la eliminación biológica de contaminantes, podría implicar limitaciones para su aplicación en tecnologías de bioremediación. Las sustancias húmicas son materia orgánica heterogénea de alto peso molecular, que se puede encontrar indistintamente en la superficie terrestre y ambientes

acuáticos, y pueden presentar una amplia diversidad en su estructura y propiedades. Por lo cual faltaría investigar más al respecto, de las sustancias húmicas y quinonas en los procesos biogeoquímicos para garantizar que su aplicación resulte en una estrategia adecuada para restaurar acuíferos contaminados y aguas residuales.

La contribución principal de este trabajo es que por primera vez se presenta evidencia, en base a balances de nitrógeno, carbono, y seguimiento de intermediarios, del efecto de diferentes quinonas en el proceso desnitrificante organotrófico comp-cresol, mostrando que las quinonas pueden tener contribuciones que no se habían reportado antes en literatura, y que muestran claramente que el potencial de oxido-reducción no es quien gobierna la forma en que actúan este tipo de compuestos. También se presenta por primera vez el efecto que puede tener un campo eléctrico sobre el proceso desnitrificante, sin las contribuciones abióticas que generalmente se presentan con los sistemas electroquímicos, Se evidencia claramente que se puede incidir directamente sobre la ruta metabólica desnitrificante y la mineralización de materia orgánica, reorientando el metabolismo hacia la producción de intermediarios. Esto ofrece otra perspectiva para la aplicación del proceso desnitrificantes en bioceldas para obtención de energía eléctrica, pero falta investigar más al respecto

ANEXOS

ANEXOS MATERIALES Y MÉTODOS

Estabilización del reactor continuo desnitrificante en estado estacionario

Descripción del reactor

Con el fin de obtener un cultivo desnitrificante, fisiológica y metabólicamente estable para utilizarlo posteriormente como inóculo en las pruebas en lote, se utilizó un biorreactor anaerobio de tanque agitado de 10 L (Bioflo 2000 Fermentor, New Brunswick), con un volumen de operación de 5 L. El sistema se operó con dos bombas peristálticas, cada una conectada a un temporizador. Este se controló a una temperatura de 30 °C, con agitación a 230 rpm y se tuvo un sistema de sedimentación a la salida del efluente, el cuál permitió la recirculación de lodo. El gas producido por el reactor se recolectó en una columna rellena con una solución salina (NaCl al 300%, rojo de metilo, pH = 3) para determinar la producción a partir del desplazamiento de la solución.

Inóculo

El inóculo que se utilizó en el biorreactor continuo se obtuvo de la planta de tratamiento de aguas residuales de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. El lodo fue lavado con solución fisiológica (NaCl, 0.9%) antes de inocular el reactor a una concentración final en el reactor de 3.1 g SSV/L.

Medio de cultivo del reactor continuo de tanque agitado

El reactor fue alimentado con dos medios de cultivo por separado: uno que contenía la fuente de carbono ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}$) y otro que contenía la fuente de nitrógeno (NaNO_3), con el fin de evitar la precipitación de las sales y mantener su disponibilidad en el cultivo. Para dirigir el metabolismo del lodo de modo organotrófico y desnitrificante en condiciones desasimilativas, se utilizó como fuente de electrones al acetato y como aceptor final de electrones al nitrato. La relación C/N fue de 1.2. La velocidad de carga de nitrógeno fue de 305 mg de $\text{N-NO}_3^- \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ y de carbono de 360 mg de $\text{C-CH}_3\text{COO}^- \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. El flujo de alimentación de cada uno de los medios fue de 1.75 L d^{-1} . El tiempo de residencia

hidráulica (TRH) fue de 3.5 días. Los nutrientes y micro elementos adicionados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición del medio de cultivo

Medio 1: Fuente de Carbono		Medio 2: Fuente de	
CH ₃ COONa	5.01 g L ⁻¹	NaNO ₃	5.66 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	2 g L ⁻¹	FeCl ₃ (6H ₂ O)	0.1 g L ⁻¹
CaCl(2H ₂ O)	0.6 g L ⁻¹	CuSO ₄ (5H ₂ O)	0.02 g L ⁻¹
NaMoO ₄ 2(H ₂ O)	0.12 g L ⁻¹		
MgSO ₄ (7H ₂ O)	0.4 g L ⁻¹		

Reactor en estado estacionario

Se evaluaron las variables de respuesta del biorreactor por dos años. Se calcularon las velocidades de carga y de descarga de las fuentes de carbono (q_{acet}) y de nitrógeno (q_{NO_3}), midiendo en el influente y el efluente cada uno de los componentes (NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+ , HCO_3^- como carbono inorgánico (IC), CH_3COO^-), así como la velocidad de producción de gas (N_2 , CH_4 , N_2O , CO_2) y de biomasa. Se determinaron los rendimientos de producción de biomasa (Y_{BM}), de nitrógeno molecular (Y_{N_2}) y de carbono inorgánico (Y_{IC}), además de las eficiencias de consumo de nitrato (E_{NO_3}) y acetato (E_{acet}).

Sistema de aplicación de potencial eléctrico

Los ensayos con aplicación de potencial eléctrico fueron realizados en lote en un sólo reactor. El volumen de trabajo fue de 1.25 L con un espacio de cabeza de 0.5 L. La eliminación del oxígeno del medio de cultivo se realizó burbujando helio hasta tener un valor de ORP constante. Se adicionó el *p*-cresol al último después del medio de cultivo y se desplazó el espacio de cabeza con helio para conservar las condiciones anaerobias y se selló el reactor. La agitación fue de 150 rpm. Se aplicaron en el cultivo diferentes potenciales eléctricos: +104 mV, -187 mV y -279 mV con respecto al electrodo estándar de hidrogeno (SHE). El muestreo se realizó a diferentes tiempos tomando 6 ml cada vez, de tal modo que

el volumen de trabajo del reactor no cambió más del 10% al final de la cinética. Se monitoreo potencial de óxido-reducción (ORP) y la corriente eléctrica.

El reactor de utilizado fue agitado con un motor de velocidad variable Heidolph RZR-1. La aplicación del potencial se realizó con un Potenciostato/Galvanostato EG&E Princeton Applied Reseach modelo 173, mediante tres electrodos. El electrodo de trabajo fue un cilindro de acero inoxidable de (13.1 cm x 3.8 cm) el cual se utilizó también como agitador. Como electrodo de referencia se utilizó un electrodo estándar de calomel (SCE) XR 100 (Radiometer analytical) acoplado a un capilar de Luigin dentro del reactor, y como contra-electrodo un cilindro de acero inoxidable pegado a la pared del reactor. El pH y el ORP se midieron en línea con electrodos acoplados al reactor. El pH se midió con un electrodo de pH/temperatura acoplado a un medidor Hanna GLP pH meter HI-98140. El ORP con un electrodo de calomel Conductronic 003B conectado a un medidor Digi-Sens, Cole-Parmen pH/ORP modelo 5938-00. La corriente se midió entre el electrodo de referencia y el de trabajo con un multímetro Hewlett-Packard modelo 3478A.

Métodos de análisis

Cuantificación de Nitrato y Nitrito

La determinación de nitrato y nitrito se realizó mediante cromatografía de líquidos de alta resolución con un HPLC (Waters, 600) con un detector de arreglo de diodos (Waters, 2996). Se utilizó una fase de borato/gluconato a un flujo de 2 ml/min con una columna de intercambio iónico Ic-Pak Anion HC (4.6 x 150 mm) (Waters) con un volumen de inyección de 20 μ l. La determinación se llevó a cabo a 214 nm.

Preparación de las muestras para el análisis: 5 ml de muestra se someten a centrifugación a 12000 rpm por 10 min, y el sobrenadante se filtra con una membrana de nylon (0.45 μ m). Se toman alícuotas y se hacen diluciones en agua desionizada (MilliQ 8.1) para tener un máximo de concentración de NO_3^- o NO_2^- de 50 mg/L, todas las muestras se analizaron por duplicado.

Para establecer una curva de calibración, soluciones de N-NO_2^- y N-NO_3^- fueron preparadas a diferentes concentraciones con agua desionizada (milliQ 8.1) y filtradas a 0.45 μm . Las curvas se realizaron por triplicado (Figura 1).

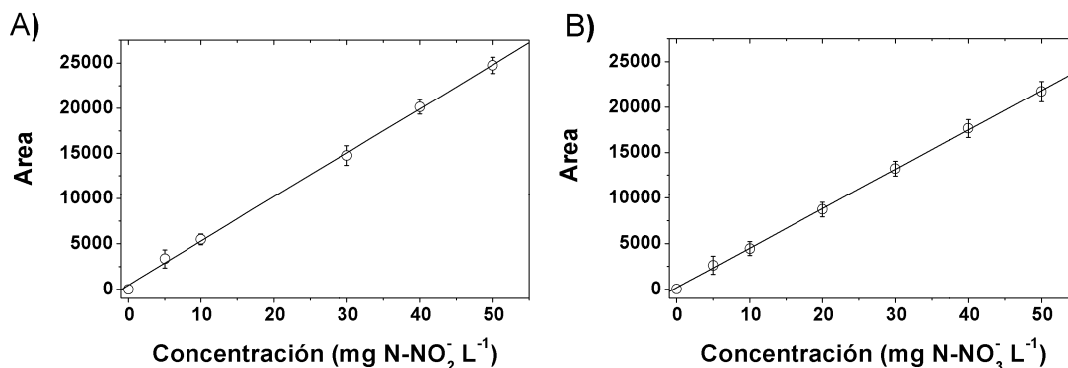


Figura 1. Curvas de calibración de nitrato (A) y nitrito (B), obtenidas por HPLC

Las curvas se analizaron por regresión lineal y se calcularon, la pendiente, la ordenada al origen y el coeficiente de correlación, a los cuales se les estimó el coeficiente de variación (CV), los cuales para cada una de los estimadores fueron menores del 6%.

Análisis de los gases: N_2 , N_2O , CH_4 , CO_2

El análisis se hizo por cromatografía de gases con un cromatógrafo Varian 3350, con un detector de conductividad térmica. La adquisición de datos se realizó con un software Empower 1154 versión 5 (Waters). Como gas de arrastre se usó helio (4.8 Praxair) a un flujo se 16 mL/min. Se utilizó una columna de acero de 1.2 m de largo y 1/8'' de diámetro, empacada con Poropak Q de malla 80-100. La columna se trabajó a una temperatura de 35°C; el inyector a 100°C; el detector a 110°C y el filamento a 135°C. El volumen de inyección fue de 100 μL .

La cuantificación de nitrógeno molecular y óxido nitroso en el reactor se basó en la ley general de los gases, ya que 1 mol de gas a 1 atm y 273 K ocupa 22.4 L. El volumen estándar que ocupa 1 mol de gas bajo las condiciones experimentales se calculó con la siguiente relación, considerando que la presión atmosférica de la ciudad de México es de 0.8 atm.

$$V_{\text{nitrógeno}} = \frac{T_E * P_R * F_{GR} * f}{T_R * P_A} [=] \frac{L}{d} \dots\dots\dots (1)$$

$V_{\text{nitrógeno}}$ = Velocidad de producción de nitrógeno bajo condiciones estándar.

F_{GR} = Flujo del gas medido por desplazamiento de solución salina en una columna (L d⁻¹)

T_E = Temperatura estándar (298.15 K)

P_R = Presión atmosférica a la que opera el reactor. (0.8 atm)

f = fracción del nitrógeno contenido en el flujo de gas medido por cromatografía de gases.

T_R = Temperatura de operación en el reactor (301.15 K)

P_A = Presión estándar (1 atm).

Después se calcula la velocidad volumétrica de producción de nitrógeno atmosférico (mg N L⁻¹ d⁻¹).

$$Q_{N_2} = \frac{V_{\text{nitrógeno}} * P_A * PM_{N_2}}{R * T_E * V_R} [=] \frac{mg * L}{d} \dots\dots\dots (2)$$

Donde;

R = Constante de los gases ideales (0.082 atm L K⁻¹ mol⁻¹)

V_R = Volumen de operación del reactor.

PM_{N_2} = Peso molecular del N₂ (mg/mol)

Para la cuantificación en los ensayos en lote, se realizaron curvas de calibración de nitrógeno atmosférico a diferentes concentraciones. Se presentan las curvas en la Figura 2,

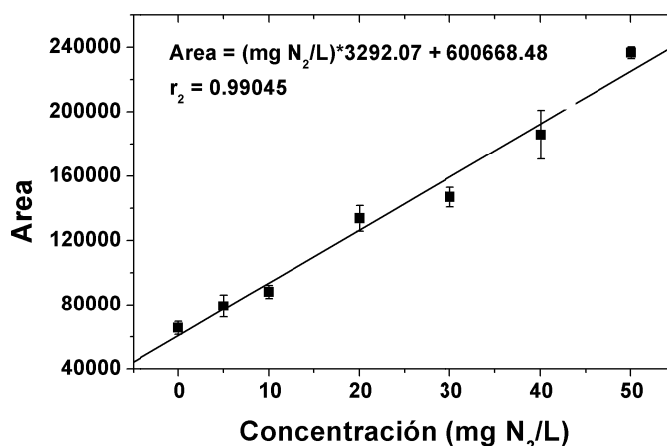


Figura 2. Curvas de calibración nitrógeno atmosférico obtenidas por cromatografía de gases.

Cuantificación de amonio

El método utilizado fue con un electrodo selectivo del ion amonio (pHoenix Electrode Co.) cuya linealidad se produce en un intervalo de 0.01 a 100 mg L⁻¹ de amoniaco.

Preparación de las muestras para el análisis de NH₄⁺ por el electrodo de ion selectivo: en un matraz de 50 ml con un agitador magnético se pone un volumen de muestra de 50 mL previamente centrifugada (4500 rpm, 5 min) y se alcaliniza con 0.5 mL de 10N NaOH. El electrodo se coloca con una inclinación de 45° para evitar la formación de burbujas y se toma la lectura cuando el valor en mV del potenciómetro es estable (3 min aprox.).

Se realizaron curvas de calibración con soluciones estándar de amonio a diferentes concentraciones. Todas las soluciones se prepararon con agua desionizada a partir de una solución estándar de (NH₄)₂SO₄. Se calcularon los estimadores de los componentes de las curvas de calibración para el amonio, (pendiente, ordenada al origen, y coeficiente de correlación), estos estimadores presentaron coeficientes de variación menores al 5.0 %.

Carbono Orgánico e Inorgánico

El carbono orgánico, así como el inorgánico (CI), se cuantificaron en un analizador de carbono orgánico total (Shimadzu, TOC-5000). Este equipo cuenta con un tubo de combustión para carbono que opera a una temperatura de 680°C. Se utilizó oxígeno de alta pureza como fase móvil. La muestra, fue de 2 ml. Los gases de la muestra son registrados

por un detector infrarrojo sensible a CO₂, dando un área que es proporcional a la concentración en carbono que contiene la muestra.

Preparación de las muestras para el análisis en el TOC: 10 ml de muestra se someten a centrifugación a 12000 rpm por 10 min y el sobrenadante se filtra con una membrana de nylon de 0.45 μm. Se hacen las diluciones necesarias en agua desionizada (MilliQ 8.1). Todas las muestras se analizaron por duplicado

Para determinaciones posteriores fue necesario hacer curvas de calibración por triplicado, las cuales se realizaron con diferentes concentraciones de carbono orgánico e inorgánico (los estimadores para estas curvas presentaron coeficientes de correlación menores al 2%). Hay que observar que el pH final en el reactor fue de 9.08 y superior de 7.3 en las cinéticas en lote, de modo que la mayoría del carbono inorgánico producido, se pudo medir en forma de HCO₃⁻.

Sólidos suspendidos volátiles

Para cuantificar la producción de biomasa, se midieron los sólidos suspendidos volátiles con el método descrito en APHA (1985). Dos crisoles se llevaron a peso constante a 550°C por 1 h en una mufla, luego se dejan enfriar en un desecador y se pesan (peso A). Se toman 10 ml de muestra del cultivo totalmente homogeneizado, se evapora totalmente el líquido en una parrilla a baja temperatura, antes de meter los crisoles a una estufa a 105°C por 1 h. Se pesan con la muestra seca hasta que el peso sea constante (peso B). Por último se ponen los crisoles con la muestra en la mufla a 550°C por 45 min para cuantificar los sólidos suspendidos fijos. Se pasa a un desecador y se deja enfriar, se pesa y se verifica que el valor sea constante (peso C). Las determinaciones se hicieron por duplicado.

La concentración de sólidos suspendidos totales (SST), se calculó de la forma siguiente.

$$SST(g/L) = \frac{B - A}{V} \dots\dots\dots (3)$$

Donde A es el peso de crisol (g), B el peso de crisol + muestra seca (g) y V el volumen de la muestra (L).

Los sólidos suspendidos fijos (SSF) se obtienen también en g/L, como

$$SSF(g/L) = \frac{C - A}{V} \dots\dots\dots (4)$$

Donde A es el peso de crisol (g), C el peso de crisol + residuo (g) y V el volumen de la muestra (L).

Por diferencia se tienen los sólidos suspendidos volátiles.

$$SSV(g/L) = SST - SSF \dots\dots\dots (5)$$

Intermediarios de oxidación

La determinación de los intermediarios se realizó por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) (Waters, 600), se utilizó un detector de arreglo de diodos (Waters, 2996). Como fase móvil se utilizó un amortiguador de acetato (50 mM a pH 4.5) y acetonitrilo a una proporción 70:30, con un flujo de 1.2 mL min⁻¹ a 30 °C. La columna de separación fue una columna phenomenex C18 Bondclone (300 x 3.9 mm, 10µm). El volumen de inyección fue de 20 µL.

A cada muestra se le determinaron los componentes a su máxima absorbancia (*p*-cresol, 280 nm; *p*-OH-benzoato, 250 nm; *p*-OH-benzaldehído, 284 nm; *p*-OH-benzilalcohol, 271 nm), y se realizaron barridos de 210 a 360 nm de cada uno de ellos, que se compararon contra los espectros de los estándares. También se ensayaron fenol, benzoato y tolueno.

Preparación de las muestras para el análisis de *p*-cresol en el HPLC: 2 ml de muestra se someten a centrifugación a 12000 rpm por 10 min y el sobrenadante se filtra con una membrana de nylon (0.45 µm) para su análisis posterior. Todas las muestras se analizaron por duplicado. Para validar el método se realizaron curvas de calibración a diferentes concentraciones de *p*-cresol e intermediarios (los estimadores de las curvas presentaron coeficientes de variación menores al 3%).

Estabilización del lodo bajo condiciones desasimilativas

El reactor continuo desnitrificante presentó los perfiles mostrados en las Figuras 3 y 4. Durante mas de 35 veces el tiempo de residencia hidráulica (TRH), el reactor desnitrificante mostró un perfil constante para las velocidades de carga y descarga de los compuestos nitrogenados. La velocidad de descarga de nitrato en el efluente fue muy baja ($q_{N-NO_3}(\text{efluente}) = 0.63 \pm 1.0 \text{ mg N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), así como la producción de nitrito ($g_{N-NO_2}(\text{efluente}) = 0.1 \pm 1.4 \text{ mg N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$). No se detectó amonio, tampoco intermediarios de la desnitrificación como el óxido nitroso. Se obtuvo una eficiencia de consumo de nitrógeno en forma de nitrato (E_{NO_3}) del $99.79 \pm 0.33 \%$. El nitrógeno consumido se recuperó a la salida del reactor en forma de nitrógeno molecular, obteniendo un rendimiento de producción de N_2 (Y_{N_2}) de 0.99 ± 0.04 .

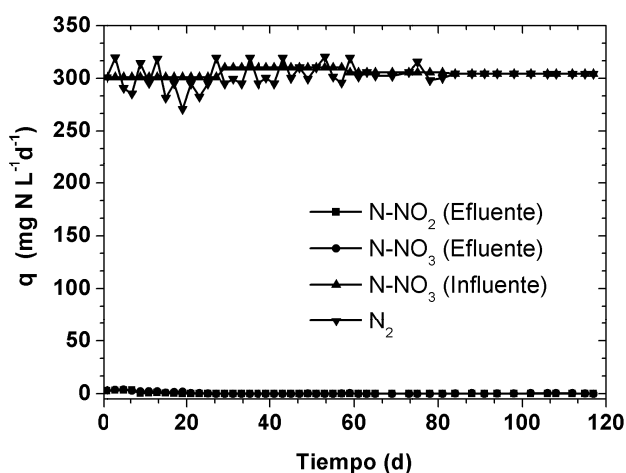


Figura 3. Perfil de las velocidades de carga y descarga de los compuestos nitrogenados en el reactor continuo desnitrificante.

El reactor desnitrificante mostró un perfil constante para las velocidades de carga y descarga de los compuestos carbonados, durante 35 veces el TRH (Figura 4). La velocidad de descarga de acetato fue muy baja ($q_{C-act}(\text{efluente}) = 35,61 \pm 6.05 \text{ mg/Ld}$). No se detectó metano en el efluente gaseoso. Se obtuvo una eficiencia de consumo de carbono en forma de acetato (E_{acetato}) del $90.22 \pm 1.62\%$. El carbono consumido se recuperó en el efluente en forma de carbono inorgánico con un rendimiento (Y_{CI}) de 0.99 ± 0.05 . El valor promedio de pH en este tiempo fue de 9.2 ± 0.70 .

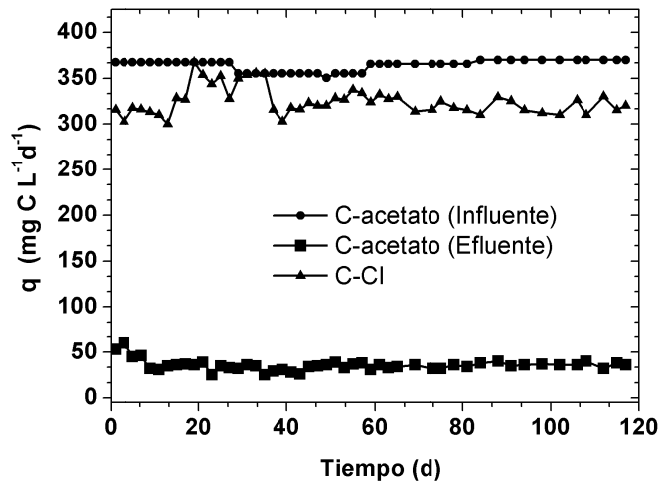


Figura 4. Perfil de las velocidades de carga y descarga de los compuestos carbonados en el reactor continuo desnitrificante.

Dado que las variables de respuesta para los compuestos tanto, nitrogenados como carbonados, se mantuvieron constantes durante 35 veces el TRH y que no fue detectable la formación de lodo en ese periodo, es posible decir que el reactor desnitrificante se mantuvo en estado estacionario y operó en condiciones netamente desasimilativas.

Crecimiento del lodo como fuente de inóculo

Una vez comprobado que el lodo desnitrificante presentó un estado fisiológico constante, se procedió a cambiar la C/N para pasar a un proceso menos desasimilativo y producir más biomasa microbiana. La C/N se incrementó a 1.7, las concentraciones de KH_2PO_4 y $\text{MgSO}_4(7\text{H}_2\text{O})$ se incrementaron a 3 y 0.6 g L^{-1} respectivamente. La velocidad de carga de N-NO_3^- se mantuvo constante en 250 $\text{mg N L}^{-1} \text{d}^{-1}$ con un TRH de 2 d.

El reactor se operó bajo estas condiciones hasta que se alcanzó el nuevo estado estacionario desnitrificante. La eficiencia de consumo para el nitrato (E_{NO_3}) fue de 100% con un rendimiento desnitrificante (Y_{N_2}) de 0.71 ± 0.02 . La eficiencia de consumo de carbono (E_{acetato}) fue de $94.17 \pm 1.24 \%$ con un rendimiento en la producción de carbono inorgánico (Y_{HCO_3}) de 0.75 ± 0.03 . La velocidad de crecimiento de biomasa fue de $164.5 \pm 8.8 \text{ mg BM L}^{-1} \text{d}^{-1}$. Abajo se presentan las velocidades de carga y los balances de materia para el nitrógeno y carbono que se presentaron durante 200 veces el TRH (Ecuaciones 6 y 7).

Balance de materia de nitrógeno:

$$q_{N-NO_3}(\text{influyente}) = q_{N-NO_3}(\text{efluente}) + q_{N-NO_2} + q_{N_2} + q_{N-NH_4} + q_{N-Biomasa} \dots\dots\dots (6)$$

$$250 \pm 3 \text{ mg/L}_d = 0.0 \pm 0.0 \text{ mg/L}_d + 0.0 \pm 0.0 \text{ mg/L}_d + 177.29 \pm 15 \text{ mg/L}_d \\ + 31 \pm 2.3 \text{ mg/L}_d + 17.19 \pm 2.3 \text{ mg/L}_d$$

Balance de materia de carbono:

$$Q_{C-Acetato}(\text{influyente}) = Q_{C-Acetato}(\text{efluente}) + Q_{C-HCO_3} + Q_{C-Biomasa} \dots\dots\dots (7)$$

$$404.85 \pm 11 \text{ mg/L}_d = 25.52 \pm 5.2 \text{ mg/L}_d + 303 \pm 12.26 \text{ mg/L}_d + 82.23 \pm 4.41 \text{ mg/L}_d$$

Estos balances son muy cerrados, tanto para el nitrógeno como para el carbono. Con esto se presenta evidencia de que el reactor continuo desnitrificante alcanzó de nuevo el estado estacionario bajo condiciones semidesasimilativas. El lodo utilizado para inocular los cultivos en lote fue producido continuamente bajo estas mismas condiciones.

Estos balances son muy cerrados, tanto para el nitrógeno como para el carbono. Con esto se presenta evidencia de que el reactor continuo desnitrificante alcanzó de nuevo el estado estacionario bajo condiciones semidesasimilativas. El lodo utilizado para inocular los cultivos en lote fue producido continuamente bajo estas mismas condiciones.