
Evaluación de un proceso desnitrificante en continuo con un consorcio halotolerante.

E.R. Meza-Escalante^{1*}, G.E. Dévora-Isiordia¹, M.I. Estrada-Alvarado², M.Y. Soto-Padilla² y F.J. Cervantes-Carrillo³.

¹Departamento de Ciencias del Agua y Medio Ambiente, Instituto Tecnológico de Sonora. Av. 5 de Febrero 818 sur. Cd. Obregón, Sonora, 85000 México.

²Departamento de Biotecnología y Ciencias Alimentarias, Instituto Tecnológico de Sonora.

³División de Ciencias Ambientales, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí, México.

Evaluation of denitrifying process in continuous with halotolerant consortium.

Abstract

Among the biological processes used for the treatment of effluent with nitrogen compounds, is the denitrifying process, which is highly selective for the removal of nitrate coupled to the oxidation of organic matter, including compounds know as recalcitrant, obtaining high percentages removal of substrates; additionally, coupled to the problem of discharges with high content of nitrogen compounds, are water-containing high concentrations of salts, therefore the aim of this work involves looking for microorganisms capable of carrying out the denitrifying continuous process in conditions of salinity. To achieve this, different microorganisms were isolated on selective medium, which were taken from sediments in the Bay of sea salt (San Ignacio Río Muerto, Sonora). There were isolated 21 strains, which were characterized morphologically and biochemically, proving that some of them are capable of reducing nitrate.

To assess the ability of halotolerant microorganisms isolated to conducting denitrifying process, a upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor under continuously denitrifying conditions was operated, fed with acetate, adjusting the nitrate in a stoichiometric ratio C/N of 1.1 with hydraulic residence time (HRT) of 2 d. The loading rate was 78.1 ± 9.4 mg C-acetate/l.d and 82.8 ± 6.8 mg N-NO₃⁻/l.d showing the complete oxidation of acetate coupled to denitrification, consumption efficiencies obtained during the operation were 100% for the carbon compound and nitrate.

Key words Denitrification, salinity, UASB reactor.

Resumen

Dentro de los procesos biológicos utilizados para el tratamiento de efluentes con compuestos nitrogenados, se encuentra el proceso desnitrificante, el cual es altamente selectivo para la eliminación de nitratos acoplado a la oxidación de materia orgánica, incluyendo a los compuestos conocidos como recalcitrantes, obteniendo elevados porcentajes de eliminación de sustratos; además, aunado al problema de descargas con altos contenidos de compuestos nitrogenados, se encuentran las aguas con elevadas concentraciones de sales, por lo que el objetivo de este trabajo implica buscar microorganismos que sean capaces de llevar el proceso desnitrificante en continuo bajo condiciones de salinidad. Para conseguir este fin, se aislaron diferentes microorganismos en medios selectivos, los cuales fueron tomados de sedimentos procedentes de la salina de Bahía de lobos (San Ignacio Río Muerto, Sonora). Se lograron aislar 21 cepas, las cuales se caracterizaron morfológicamente y bioquímicamente, resultando que algunas de ellas presentaron capacidad nitrato reductora.

Para evaluar la capacidad de los microorganismos halotolerantes aislados de llevar a cabo el proceso desnitrificante, se arrancó un reactor de lechos de lodo de flujo ascendente (UASB) en continuo bajo

*Autores de correspondencia
Email: edna.meza@itson.edu.mx

condiciones desnitrificantes, alimentado con acetato, ajustando el nitrato en una relación estequiométrica C/N de 1.1 con un tiempo de residencia hidráulico (TRH) de 2 d. La velocidad de carga fue de 78.1 ± 9.4 mg C-acetato/l.d y 82.8 ± 6.8 mg N-NO₃/l.d, observándose la oxidación completa del acetato acoplada a la desnitrificación, obteniendo durante la operación eficiencias de consumo de 100% para el compuesto carbonado y para el nitrato.

Palabras clave: Desnitrificación, salinidad, reactor UASB.

Introducción

Poca cantidad del agua del planeta es directamente utilizable para las actividades humanas, ya que la mayor parte está en forma salina o congelada. Según Vitousek *et al.* (1997), el hombre actual utiliza más de la mitad del agua fresca disponible y alrededor del 70% de ésta, se aplica en la agricultura. Así mismo, las prácticas agrícolas han originado la introducción masiva de nitrógeno en suelos y aguas, causando deterioros y desequilibrio para el ambiente (Smil, 1997; Richardson, 2000). Aunado a la descarga de compuestos nitrogenados al ambiente, se encuentran otros compuestos de gran importancia por sus implicaciones ambientales, como los compuestos orgánicos, de difícil oxidación, conocidos como recalcitrantes.

La desnitrificación puede ser definida como un proceso respiratorio en el cual el nitrato es reducido a nitrógeno molecular, ligado a la oxidación de materia orgánica, incluyendo a los compuestos considerados recalcitrantes, hasta CO₂, así como la oxidación de compuestos azufrados reducidos (S²⁻, S₂O₃²⁻, S⁰) a sulfato. La eficiencia de eliminación de nitrato, así como el rendimiento de conversión a N₂ en el proceso de oxidación, puede ser muy alta y alcanzar valores cercanos al 100% (Sierra-Alvarez *et al.*, 2005; Cardoso *et al.*, 2006; Meza-Escalante *et al.*, 2008). Los procesos fisicoquímicos para la reducción de nitrato pueden alcanzar también eficiencias altas, pero con un alto costo de operación y el requerimiento de disposición final de desechos, por lo que no representan una solución efectiva, ya que sólo trasladan el problema de un lugar a otro (Mateju *et al.*, 1992; Reyes-Avila *et al.*, 2004).

Durante las últimas décadas se ha demostrado que las comunidades microbianas pueden encontrarse en diversas condiciones adversas, como temperatura, pH y salinidad, entre otras. Los microorganismos que habitan estos ambientes extremos son llamados extremófilos, y poseen

características bioquímicas y metabólicas que les permiten vivir en hábitats poco comunes, resultando ser microorganismos muy útiles para el desarrollo de nuevos procesos biotecnológicos. (Margesin & Schinner, 2001; Van den Burg, 2003). Dentro de los extremófilos hay microorganismos que viven y se reproducen en ambientes de elevada temperatura, como las fuentes termales (organismos termófilos). Otros por el contrario, se desarrollan en ambientes fríos, próximos al punto de congelación del agua (psicrófilos). Los hay aquellos que toleran valores extremos de pH, tanto bajos (acidófilos) como altos (alcalófilos) y también existen los que sobreviven en ambientes de gran salinidad (halófilos) (Podar & Reysenbach, 2006).

La importancia de los extremófilos se basa en diversos aspectos. De manera particular, las bacterias halófilas moderadas y las halotolerantes han alcanzado recientemente, un gran interés en el campo de la degradación de los residuos tóxicos y constituyen una importante alternativa a los tratamientos microbiológicos convencionales en aquellos casos en los que éstos sean ineficaces, como los procesos industriales que generan aguas residuales salinas. Esto sucede, por ejemplo, en la producción de diversas sustancias químicas como los pesticidas, determinados productos farmacéuticos, industrias de fabricación y manufactura de conservas de productos marinos y vegetales, y los procesos de extracción de petróleo y gas (Castillo *et al.*, 1995; Ramírez *et al.*, 2004).

La ecología y diversidad de los microorganismos halófilos es muy variada; muchos de estos microorganismos han sido aislados de hábitats que presentan alta salinidad, ubicados en diferentes puntos geográficos del planeta. (Ventosa *et al.*, 1995). Estas bacterias son fáciles de cultivar y presentan escasos requerimientos nutricionales; su tolerancia a elevadas concentraciones de sales reduce al mínimo el riesgo de contaminación en el laboratorio; además, son útiles en la biodegradación de residuos (Ramírez *et al.*, 2004).

Hamoda *et al.* (1995), afirman que el tratamiento de las aguas residuales salobres mediante el uso de lodos activados puede mejorarse mediante la selección progresiva de microorganismos halófilos, aplicando un período previo de aclimatación con salinidad en el agua, pudiendo alcanzar una remoción similar a la de lodos activados convencionales de aguas dulces. Por otra parte, Méndez-Gómez *et al.* (2008) encontraron que al aumentar la salinidad en el agua residual se produjo una reducción en la cantidad de lodos activados, reportando que al aumentar el período de adaptación de 1 a 3 meses, se logra conservar la eficiencia en la degradación, por lo que se puede aprovechar la condición de este tipo de microorganismos de estar presentes comúnmente a lo largo de las costas. Por otro lado, se ha encontrado que los microorganismos de suelos salinos, como los presentes en el lago de Texcoco, pueden inmovilizar una gran concentración de nitrato (NO_3^-) en presencia de sustratos que se descomponen fácilmente produciendo nitrito (NO_2^-) y amonio (NH_4^+), en el suelo del mismo lago (Vega-Jarquín, 2003), por lo que es interesante evaluar si este tipo de microorganismos extraídos de diferentes sedimentos pueden llevar a cabo el proceso desnitrificante para el tratamiento de aguas residuales con compuestos carbonados y posteriormente, de manera simultánea con compuestos azufrados, en condiciones de salinidad elevada. Cabe señalar que bajo este escenario, se podrían tratar aguas residuales con altos niveles de compuestos nitrogenados y alto contenido de sales como el caso de la industria petroquímica; así como biorremediar sitios como lagunas costeras o lagos salinos.

Materiales y método

Sitio de muestreo

La zona de muestreo se ubica en Bahía de lobos (San Ignacio Río Muerto, Sonora), el cual se localiza en latitud: 27°24'47'', longitud: 110° 14'48'' al suroeste del estado de Sonora.

Muestreo

Se llevó a cabo tomando dos muestras distintas en las orillas de la salina de Bahía de lobos (San Ignacio Río Muerto, Sonora). Se descartaron los primeros 5 cm de profundidad, con la ayuda de una pala; ya que se logró distinguir sólo sal, por lo que

las muestras se recolectaron en los siguientes 10 cm de profundidad. Las muestras fueron guardadas en condiciones asépticas a una temperatura de -4°C , para su posterior análisis siguiendo la metodología reportada por Valenzuela-Encinas *et al.* (2009).

Aislamiento

Se prepararon tres medios selectivos para aislar microorganismos salinos, mismos que se reportan en la literatura, bajo condiciones similares a las del presente estudio; Halovivax, Natronobacter y Marine broth. Se utilizó la técnica de dilución y siembra en placa para el aislamiento de los microorganismos, incubándose por 3 días a 37°C . Las colonias observadas posteriormente de su incubación se sembraron en el mismo medio de cultivo para obtener la cepa pura (Michael *et al.*, 1993).

Medio de crecimiento

Los microorganismos aislados crecieron y se conservaron en medio Agar Marine (DIFCO) y Marine Broth (DIFCO). El crecimiento se llevó a cabo a una temperatura de 37°C durante 3 días de incubación, a una salinidad del 2 %.

Diseño del medio del cultivo para el bioreactor

Se puso en marcha un reactor desnitrificante tipo lecho de lodos de flujo ascendente (UASB) de 1.6 l. El influente se constituyó de 2 medios de cultivo (uno con la fuente de N y la fuente de C y el otro con el medio marino), buscando no provocar un stress fuerte al consorcio microbiano, de tal manera que inhibiera su crecimiento. La composición de la fuente de carbono y nitrógeno alimentada al reactor fue (g/l): CH_3COONa (1.16), NaNO_3 (1.92), KH_2PO_4 (0.6), K_2HPO_4 (1.6), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.2) y 2 ml/l de la solución de elementos traza, cuya composición ha sido descrita previamente por Meza-Escalante *et al.*, (2008).

Para identificar si el reactor se encontraba en régimen estacionario, se realizaron mediciones de los compuestos carbonados (medidos como DQO) y nitrogenados (NO_3^- , NO_2^-) en el influente y efluente del reactor respectivamente, para calcular las velocidades de carga y descarga de carbono y nitrógeno con respecto al tiempo.

Métodos de medición

Antes de realizar los análisis las muestras fueron filtradas a través de una membrana de nylon de 0.45

µm. Los iones NO_3^- y NO_2^- fueron cuantificados por el método de reducción de nitrato a través de una columna de cadmio cuperizado. La materia orgánica fue determinada por el método estándar para determinación de DQO (método HACH). El carbono orgánico total y el carbono inorgánico se determinaron en un analizador de carbono orgánico total. Los sólidos suspendidos volátiles fueron analizados por el método estándar (APHA). Para el análisis del proceso desnitrificante se determinaron variables de respuesta como eficiencias de consumo de sustratos, así como las velocidades específicas de consumo.

Resultados y discusión

Obtención y caracterización de las cepas

Se obtuvieron 21 cepas aisladas de suelos salinos con características morfológicas distintas, realizando un estudio sobre sus propiedades bioquímicas mostradas en tabla 1.

Como se puede observar, las cepas M25, M23E, M25Z M25A, M23C y H14A presentaron actividad nitrato reductasa, por lo que éstas pueden utilizarse en la degradación de residuos tóxicos en un proceso desnitrificante, presentándose por otra parte, una leve actividad nitrato reductasa en las cepas M13E y M23A.

Tabla 1. Características morfológicas y bioquímicas de las cepas aisladas de muestras de sedimentos procedentes de Bahía de Lobos.

Nombre	Forma celular	Tinción gram.	Hidrólisis del almidón	Hidrólisis de la caseína	Catalasa	Oxidasa	Gelatina	Caldo nutritivo	Tween 80	Nitrato Reductasa
M14B	Cocoide	+	*	-	-	-	+	-	-	-
M13B	Cocoide	+	-	-	+	+	+	-	-	-
M14A	Bacilar	+	-	-	-	+	-	-	*	-
M23D	Cocoide	+	-	-	-	-	-	-	+	-
N25Y	Cocoide	+	-	+	+	-	+	-	+	-
M13E	Bacilar	+	+	+	+	-	+	-	-	*
H14C	Cocoide	+	-	-	+	-	-	-	*	-
M25	Bacilar	-	+	+	-	+	-	-	+	+
M13D	Cocoide	+	*	-	+	+	-	-	-	-
M23E	Cocoide	+	*	-	+	+	+	-	-	+
M23B	Cocoide	-	-	+	+	-	+	-	-	-
M25Z	Cocoide	+	-	+	-	+	+	-	+	+
H14B	Cocoide	-	-	-	-	-	+	-	-	-
M23A	Cocoide	+	-	-	-	-	-	-	-	*
M23C	Bacilar	+	-	+	-	-	+	-	-	+
H14A	Cocoide	+	*	+	-	-	+	-	-	+
M14C	Bacilar	+	*	-	-	-	+	-	*	-
N25Z	Cocoide	+	+	+	+	+	+	-	-	-
M25A	Cocoide	+	+	-	+	+	+	-	-	+

(*) + levemente

Reactor en continuo

El reactor contaba con un dispositivo para la recolección del biogás formado, el cual consistió de una columna de solución salina saturada. El reactor se inoculó con un consorcio elaborado con las 21 cepas microbianas aisladas procedentes de los suelos salinos de la zona de Bahía de Lobos (San Ignacio Río Muerto, Sonora), midiendo la concentración de biomasa, expresada como sólidos suspendidos volátiles (SSV), obteniendo una concentración final de 4.9 g SSV/L.

El reactor desnitrificante se alimentó a una relación estequiométrica teórica C/N de 1.1, con acetato como fuente de carbono. Cada medio (marino y fuente de carbono y nitrógeno) se alimentó al reactor a través de una bomba peristáltica obteniendo una concentración al 1% de salinidad y un tiempo de retención hidráulica (TRH) de 2 días.

Durante la operación del reactor, se obtuvieron velocidades de carga de 82.8 ± 6.8 mg N-NO₃⁻/l.d y 78.1 ± 9.4 mg C-acetato/l.d.

Como se observa en la figura 1, no hubo presencia de NO₃⁻ ni NO₂⁻ en el efluente del reactor, obteniendo una eficiencia de consumo de nitrato (E_{NO₃⁻}) del 100 %. La eficiencia en el consumo de los compuestos carbonados, medidos como DQO, fue del 92%. A pesar de no cuantificar el N₂ producido, se puede inferir cómo ocurrió el proceso desnitrificante en base a los datos experimentales

obtenidos; las altas eficiencias de consumo de acetato y nitrato, la presencia despreciable de NO₃⁻ y NO₂⁻ en el sistema, sugieren que la mayoría del nitrato consumido fue reducido a N₂ y que el consorcio utilizado como inóculo en el reactor UASB, llevó a cabo el proceso desnitrificante.

Conclusiones

Los microorganismos aislados en la zona de Bahía de lobos (Sonora), son caracterizados como microorganismos halotolerantes debido a su crecimiento en condiciones de alta y baja concentración de salinidad. Estos microorganismos actualmente constituyen una alternativa importante en la degradación de residuos tóxicos, mostrando la capacidad de llevar el proceso desnitrificante mediante e consumo de la materia orgánica utilizada (acetato), obteniendo una eficiencia de consumo de sustratos del 100%.

Agradecimientos

Agradecemos el apoyo al PROMEP (103.5/09/4028) por el financiamiento para la realización de la presente investigación, además al Ing. Rafael Angulo del laboratorio de Ecodesarrollo del ITSON por su apoyo en el desarrollo de las técnicas de laboratorio.

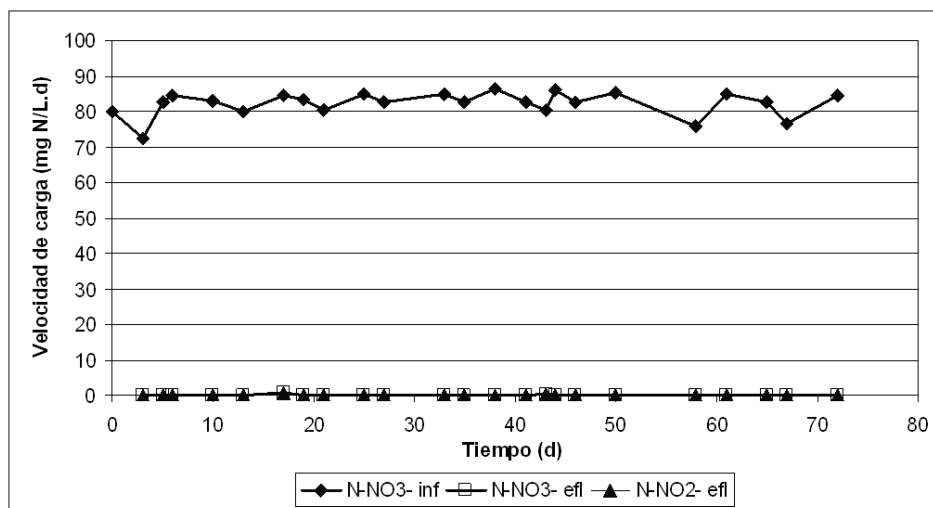


Figura 1. Perfil de los compuestos nitrogenados del reactor desnitrificante en continuo.

Bibliografía

- Castillo, P., Bezanilla, J., Amieva, J., Jácome, A. & Tejero, I. 1995. Depuración de agua residual con salinidad variable empleando un proceso de biodiscos (RBC). *Ingeniería del Agua*. 2(1): 25-30.
- Cardoso, R.B., Sierra-Alvarez, R., Rowlette, P., Razo, F.E., Gómez, J. and Field, J.A. 2006. Sulfide oxidation under chemolithoautotrophic denitrifying conditions. *Biotechnology and Bioengineering*. 95(6):1148-1157.
- Hamoda, M.F., Al-Aattar, I.M.S. 1995. Effects of high sodium chloride concentrations on activated sludge treatment, *Wat. Sci. Tech.* 31: 61-72.
- Margesin R., Schinner F. 2001. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*. 5:73-83.
- Mateju, V., Cizinská, S., Kreješ, J. and Janoch, T. 1992. Biological water denitrification- A review. *Enzyme Microb. Technol.* 14:170-183.
- Méndez-Gómez, E., Contreras-Bustos, R., Delgado-Álvarez, C. y Ramírez-Alvarado, J. A. 2008. Factibilidad de tratamiento de las aguas residuales salobres. Memorias del VII Congreso Internacional, XII Congreso Nacional, III Congreso Regional de Ciencias Ambientales. Sonora, México.
- Meza-Escalante, E.R., Texier, A.-C., Cuervo-López, F., Gómez, J. and Cervantes, F.J. 2008. Inhibition of sulfide on the simultaneous removal of nitrate and *p*-cresol by denitrifying sludge. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 83(3):372-377.
- Michael, Reid, Chan. Microbiología. Editorial Mc Graw Hill, México, Marzo 1993 4ª edición (2ª edición en español).
- Podar, M. & Reysenbach, A.L. (2006). New opportunities revealed by biotechnological explorations of extremophiles. *Current Opinion in Biotechnology*. 17: 250-255.
- Puig-Grajales, L., Rodríguez-Nava, O. and Razo-Flores, E. 2003. Simultaneous biodegradation of a phenol and 3,4-dimethylphenol mixture under denitrifying conditions. *Water Science and Technology*. 48(6):171-178.
- Razo-Flores, E., Iniestra-González, M., Field, J.A., Olguín-Lora, P. and Puig-Grajales, L. 2003. Biodegradation of mixtures of phenolic compounds in an upward-flow anaerobic sludge blanket reactor. *Journal of Environmental Engineering*. November: 999-1006.
- Ramírez, N., Sandoval, A.H., Serrano, J.A. (2004). Las bacterias halófilas y sus aplicaciones biotecnológicas. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* 24:1-2.
- Richardson David J. 2000. Bacterial respiration: a flexible process for a changing environment. *Microbiology*. 146:551-571.
- Reyes-Avila, J., Razo-Flores, E. and Gómez, J. 2004. Simultaneous biological removal of nitrogen, carbon and sulfur by denitrification. *Water Research*. 38:3313-3321.
- Sierra-Alvarez, R., Guerrero, F., Rowlette, P., Freeman, S. and Field, J.A. 2005. Comparison of chemo-, hetero- and mixotrophic denitrification in laboratory-scale UASBs. *Water Science and Technology*. 52(1-2):337-342.
- Smil, V. 1997. Global population and the nitrogen cycle. *Scientific American*. 277(1): 76-81.
- Van den Burg B. 2003. Extremophiles as a source for novel enzymes. *Curr Opin Microbiol.* 6(3):213-218.
- Valenzuela-Encinas, C., Neria-Gonzales, I., Alcántara-Hernández, R., Estrada-Alvarado, I., Zavala-Díaz de la Serna, J., Dendooven, L., Marsch, R. 2009. Changes in the bacterial populations of the highly alkaline saline soil of the former lake Texcoco (Mexico) following flooding. *Extremophiles*. DOI 10.1007/s00792-009-0244-4
- Ventosa A., Nieto J.J., Oren A. 1995. Biology of moderately halophilic aerobic of halophilic microorganisms. *World J Microb Biotechnol.* 11: 85-94.
- Vega-Jarquín, C., García-Mendoza, M., Jablonowski, N., Luna-Guido, M & Dendooven, L. 2003. Rapid immobilization of applied nitrogen in saline-alkaline soils. *Plant and Soil*. 256: 379-388.
- Vitousek, P.M., Mooney, H.A., Lubchenco, J., Melillo, J.M. 1997. Human domination of earth's ecosystems. *Science*. 5325:494-499.