



Posgrado en Biotecnología

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD IZTAPALAPA  
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA**

**TESIS**

**"Biotransformación del benzotriazol bajo condiciones nitrificantes"**

Para obtener el grado de  
**DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA:

**M. en C. Rubén Trejo Castillo**

Directora:

**Dra. Anne-Claire Texier**

Asesores:

**Dra. Flor de María Cuervo López**

**Dr. Elie Girgis El Kassis**

Ciudad de México a 22 abril de 2022

## Biotransformación del benzotriazol bajo condiciones nitrificantes

---

Esta tesis se llevó a cabo en el Laboratorio de Fisiología Microbiana (W-004) del Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, gracias al apoyo otorgado por el Consejo Divisional de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa está incluido en el Programa de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001465.

Ciudad de México a 22 de abril del 2022.

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

**"Biotransformación del benzotriazol bajo condiciones nitrificantes"**

que presentó

M. en C. Rubén Trejo Castillo

## **Comité Tutorial:**

Directora: Dra. Anne-Claire Texier

Asesora: Dra. Flor de María Cuervo López

Asesor: Dr. Elie Girgis El Kassis

## **Jurado:**

Presidente: Dra. Flor de María Cuervo López

Secretario: Dra. María de Carmen Fajardo Ortiz

Vocal: Carlos David Silva Luna

Vocal: Jesús Emmanuel Pérez Alfaro

### Agradecimientos

Agradezco a la Dra. Anne-Claire Texier por la dirección, asesoría y revisión durante el trabajo experimental y la escritura de la tesis. Gracias por su profesionalismo, paciencia, dedicación, consejos y el tiempo invertido en mi formación.

A la Dra. Flor de María Cuervo López y al Dr. Elie Girgis El Kassis por su asesoría y colaboración en este trabajo. Gracias por sus sugerencias, disposición y críticas constructivas durante la elaboración de este trabajo.

Al jurado que revisó esta tesis por sus comentarios y sugerencias.

Por último, un agradecimiento en general a todas y cada una de las personas que colaboraron de forma directa e indirecta en la realización de este trabajo, gracias por estar y ser parte de este proyecto.

### Dedicatorias

#### **A mi familia.**

Quienes siempre han estado y estarán ahí para apoyarme, que ayudan a levantarnos cada vez que nos caemos, gracias por todo su amor, cariño, apoyo, comprensión y confianza.

Gracias por su infinito amor.

“La prueba final del conocimiento es tu capacidad de transmitirlo a otra persona”

Richard Phillips Feynman

## Contenido

Resumen .....	1
Abstract .....	3
1 Introducción .....	5
1.1 Nitrificación.....	6
1.1.1 Aspectos básicos de la nitrificación .....	7
1.1.1.1 Microbiología .....	7
1.1.1.2 Bioquímica .....	9
1.1.1.3 Factores ambientales que afectan la nitrificación .....	10
1.2 Contaminantes Orgánicos Emergentes .....	14
1.2.1 Benzotriazol y derivados .....	14
1.2.2 Eliminación de EOCs en el tratamiento biológico de aguas .....	19
1.2.3 Efecto del benzotriazol en la nitrificación .....	27
1.3 Transformación de EOCs por cometabolismo .....	28
1.3.1 Papel de las AOB en la transformación cometabólica de contaminantes recalcitrantes .....	29
1.4 Reactor de lotes secuenciados (SBR).....	31
2 Justificación .....	34
3 Hipótesis.....	35
4 Objetivos .....	35
4.1 Objetivo general.....	35
4.2 Objetivos específicos .....	35
5 Materiales y métodos.....	36
5.1 Obtención del consorcio nitrificante en estado fisiológico estacionario .....	36
5.2 Cultivos nitrificantes en lote .....	38
5.2.1 Evaluación de la biotransformación del BT en cultivos nitrificantes en lote .....	40

5.2.2	Análisis estadístico .....	41
5.3	Reactor de lotes secuenciados (SBR).....	41
5.4	Métodos analíticos .....	44
5.4.1	Proteína microbiana (método de Lowry modificado).....	44
5.4.2	Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV) .....	45
5.4.3	Amonio (electrodo selectivo).....	45
5.4.4	Nitrito y nitrato (HPLC y CIA).....	46
5.4.5	Benzotriazol (HPLC) .....	48
5.4.6	Acetato (cromatógrafo de gases).....	49
6	Resultados y discusión .....	51
6.1	Reactor nitrificante continuo (fuente de inóculo).....	51
6.2	Cultivos en lote nitrificantes para la biodegradación de benzotriazol.....	53
6.2.1	Ensayo control abiótico sin biomasa.....	53
6.2.2	Ensayo control con biomasa esterilizada.....	54
6.2.3	Ensayo control nitrificante .....	55
6.2.4	Biotransformación del benzotriazol por el cultivo nitrificante en lote.....	57
6.2.5	Contribución de la enzima amonio monooxigenasa en la biotransformación del BT.....	62
6.2.6	Efecto de la adición de acetato como cosustrato en la biodegradación del BT en cultivos nitrificantes.....	65
6.2.7	Efecto del benzotriazol sobre el proceso nitrificante en cultivos en lote.....	70
6.3	Reactor SBR.....	74
6.3.1	Ensayo abiótico sin biomasa en el reactor SBR .....	74
6.3.2	Evaluación de la actividad nitrificante del lodo en el reactor SBR .....	75
6.3.3	Biotransformación del BT en el reactor SBR a 300 mg N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /L.....	78
6.3.4	Biotransformación del BT en el reactor SBR al aumentar la concentración inicial de amonio. ....	80
6.3.5	Efecto del BT sobre el proceso nitrificante en el reactor SBR.....	83

<b>7</b>	<b>Conclusiones y perspectivas .....</b>	<b>89</b>
<b>8</b>	<b>Bibliografía .....</b>	<b>92</b>



### Índice de figuras

Figura 1. Reactor nitrificante continuo usado como fuente de inóculo. ....	37
Figura 2. Reactor de lotes secuenciados (SBR) para cultivo nitrificante alimentado con amonio y benzotriazol. ....	42
Figura 3. Ejemplo de una curva de calibración para la cuantificación de proteína microbiana.....	44
Figura 4. Ejemplo de una curva de calibración para la cuantificación de amonio. ....	46
Figura 5. Ejemplo de una curva de calibración para la cuantificación de nitrito y nitrato (HPLC).....	47
Figura 6. Ejemplo de una curva de calibración para la cuantificación de nitrito y nitrato (CIA).....	48
Figura 7. Ejemplo de una curva de calibración para la cuantificación de benzotriazol. ....	48
Figura 8. Ejemplo de una curva de calibración para la cuantificación de acetato. ....	49
Figura 9. Velocidades volumétricas de carga ( $Q_e$ ) y descarga ( $Q_s$ ) del reactor nitrificante de tanque agitado: amonio de entrada (■), amonio residual (X), acumulación de nitrito (◇) y producción de nitrato (▲). ....	51
Figura 10. Perfil de las concentraciones en compuestos nitrogenados y benzotriazol en un cultivo abiótico sin biomasa: consumo de amonio (□), acumulación de nitrito (◇), producción de nitrato (▲) y consumo de BT (X). ....	53
Figura 11. Perfil de las concentraciones en compuestos nitrogenados y benzotriazol en un cultivo con biomasa esterilizada: consumo de amonio (□), acumulación de nitrito (◇), producción de nitrato (▲) y consumo de BT (X). ....	54
Figura 12. Perfil nitrificante obtenido en un cultivo en lote control con 100 mg N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /L: consumo de amonio (□), acumulación de nitrito (◇), producción de nitrato (▲) y pH (○). ....	56
Figura 13. Perfiles de biotransformación de benzotriazol bajo condiciones nitrificantes en ausencia y presencia de amonio a las siguientes concentraciones iniciales (mg N/L): (●) 0, (□) 100, (◇) 200 y (▲) 300. ....	57
Figura 14. Perfil de cultivos nitrificantes a 300 mg N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /L: a) ensayo control nitrificante, b) en presencia de ATU: consumo de amonio (□), producción de nitrito (◇) y producción de nitrato (▲).. ....	62

## Biotransformación del benzotriazol bajo condiciones nitrificantes

---

Figura 15. Perfil de biotransformación de benzotriazol en presencia de 300 mg N/L de amonio sin ( $\Delta$ ) y con ( $\times$ ) alitiourea.....	63
Figura 16. Perfil de biotransformación del benzotriazol en cultivos en lote bajo condiciones nitrificantes en presencia de 300 mg N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /L sin ( $\Delta$ ) y con ( $\circ$ ) acetato como cosustrato. ...	66
Figura 17. Perfiles del proceso nitrificante obtenidos en cultivos en lote con 300 mg N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /L: a) ensayo control sin acetato, b) en presencia de acetato a 200 mg C/L y c) en la presencia de acetato (200 mg C/L) y BT (5 mg/L). Consumo de amonio ( $\square$ ), acumulación de nitrito ( $\diamond$ ), producción de nitrato ( $\Delta$ ) y consumo de acetato ( $\times$ ). ....	68
Figura 18. Perfiles cinéticos del proceso nitrificante obtenidos en cultivos en lote con ( $\square$ ) 100, ( $\diamond$ ) 200 y ( $\Delta$ ) 300 mg N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /L en ausencia de BT: a) consumo de amonio y b) producción de nitrato. En la presencia de BT (5 mg/L): c) consumo de amonio y d) producción de nitrato. ...	72
Figura 19. Perfil de las concentraciones en compuestos nitrogenados y benzotriazol en un cultivo abiótico sin biomasa en el reactor SBR: consumo de amonio ( $\square$ ), acumulación de nitrito ( $\diamond$ ), producción de nitrato ( $\Delta$ ) y consumo de BT ( $\times$ ). ....	75
Figura 20. Perfil nitrificante obtenido en un reactor SBR alimentado con 300 mg N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /L sin BT a diferentes ciclos de operación: consumo de amonio ( $\square$ ), acumulación de nitrito ( $\diamond$ ) y producción de nitrato ( $\Delta$ ). ....	76
Figura 21. Concentración de alimentación (E) y descarga (S) del reactor de lotes secuenciados (mg N/L): amonio de entrada ( $\square$ ), amonio a la salida ( $\bullet$ ), nitrito a la salida ( $\diamond$ ) y nitrato a la salida ( $\Delta$ ).. ....	77
Figura 22. Perfiles de biotransformación del benzotriazol en el reactor SBR a la concentración inicial de amonio (300 mg N/L). ....	79
Figura 23. Perfiles de biotransformación del benzotriazol en el reactor SBR al aumentar la concentración inicial de amonio (mg N/L): ( $\square$ ) 300, ( $\diamond$ ) 400 y ( $\Delta$ ) 500.....	81
Figura 24. Efecto del aumento de la concentración inicial de amonio sobre la biotransformación de BT en el reactor nitrificante SBR.....	82
Figura 25. Perfil nitrificante obtenido en un reactor SBR alimentado con 300 mg N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /L y 5 mg BT/L en el ciclo 15, a) en las primeras 48 horas del cultivo y b) con escala completa de los 35 días: consumo de amonio ( $\square$ ), acumulación de nitrito ( $\diamond$ ), producción de nitrato ( $\Delta$ ) y consumo de BT ( $\times$ ). ....	83

## Biotransformación del benzotriazol bajo condiciones nitrificantes

---

Figura 26. Perfil nitrificante obtenido en un reactor SBR alimentado con 300 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L y 5 mg BT/L a diferentes ciclos de operación: consumo de amonio (□), acumulación de nitrito (◇), producción de nitrato (△) y consumo de BT (X). .....85

Figura 27. Perfil del proceso nitrificante obtenido en un reactor SBR con 300, 400 y 500 mg N/L de amonio a diferentes ciclos de operación en presencia de BT (5 mg/L): consumo de amonio (□), acumulación de nitrito (◇), producción de nitrato (△) y consumo de BT (X). .....87

### Índice de tablas

Tabla 1. Características del benzotriazol (modificado de Alotaibi <i>et al.</i> , 2015).....	15
Tabla 2. Presencia de benzotriazoles en muestras de agua de plantas de tratamiento de aguas residuales y agua de ríos ( $\mu\text{g/L}$ ) (modificado de Herrero <i>et al.</i> , 2014). ....	17
Tabla 3. Estudios acerca de la eliminación de compuestos orgánicos emergentes por lodos activados y lodos nitrificantes. ....	22
Tabla 4. Composición del medio de cultivo del reactor nitrificante continuo.....	37
Tabla 5. Composición del medio de cultivo nitrificante en lote. ....	38
Tabla 6. Condiciones experimentales usadas para la evaluación de la biotransformación del BT en cultivos nitrificantes en lote. ....	40
Tabla 7. Composición del medio de cultivo en el reactor de lotes secuenciados (SBR). ....	42
Tabla 8. Condiciones experimentales usadas para la evaluación de la biotransformación del BT en el reactor SBR.....	43
Tabla 9. Valores promedio de los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) y coeficientes de variación (CV) de las pendientes (m) de las curvas de calibración de los métodos analíticos. ....	50
Tabla 10. Balance de nitrógeno en el reactor continuo. ....	52
Tabla 11. Valores promedio de las variables de respuesta del proceso nitrificante en el reactor continuo.....	52
Tabla 12. Promedio de las concentraciones en compuestos nitrogenados y benzotriazol en el cultivo abiótico sin biomasa. ....	54
Tabla 13. Promedio de las concentraciones en compuestos nitrogenados y benzotriazol en el cultivo con biomasa esterilizada. ....	55
Tabla 14. Variables de respuesta del proceso nitrificante control en lote.....	56
Tabla 15. Biotransformación de benzotriazol bajo condiciones nitrificantes.....	58
Tabla 16. Variables de respuesta del proceso respiratorio nitrificante en cultivos en lote con 300 mg N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /L en ausencia (referencia) y presencia de ATU (50 mg/L).....	63
Tabla 17. Biotransformación de benzotriazol en cultivos en lote con 300 mg N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /L sin y con alitiourea (50 mg/L).....	64
Tabla 18. Biotransformación de benzotriazol en cultivos en lote con 300 mg N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /L sin y con acetato (200 mg C-acetato/L) .....	66

## Biotransformación del benzotriazol bajo condiciones nitrificantes

---

Tabla 19. Variables de respuesta del proceso respiratorio nitrificante en cultivos en lote con 300 mg N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /L en ausencia (referencia) y presencia de acetato (200 mg C/L) o acetato (200 mg C/L) + BT (5 mg/L).....	68
Tabla 20. Variables de respuesta del proceso respiratorio nitrificante en lote en ausencia y presencia de benzotriazol.....	73
Tabla 21. Promedio de las concentraciones en compuestos nitrogenados y benzotriazol en el cultivo abiótico sin biomasa en el reactor SBR. ....	75
Tabla 22. Balance de materia y variables de respuesta del proceso nitrificante en el reactor SBR en ausencia de BT. ....	76
Tabla 23. Concentración promedio de nitrógeno a la entrada (E) y salida (S) del reactor SBR y valores promedio de las variables de respuesta del proceso nitrificante en el reactor. ....	78
Tabla 24. Biotransformación del benzotriazol en el reactor SBR alimentado con 300 mg N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /L. ....	79
Tabla 25. Biotransformación del benzotriazol bajo condiciones nitrificantes en el reactor SBR alimentado con diferentes concentraciones iniciales de amonio. ....	82
Tabla 26. Variables de respuesta del proceso nitrificante en el reactor SBR alimentado con 300, 400 y 500 mg N/L de amonio y 5 mg de BT/L.....	84

### Resumen

El benzotriazol (BT) es un inhibidor de corrosión ampliamente distribuido en ambientes acuáticos y uno de los contaminantes orgánicos emergentes (EOCs) más recalcitrantes durante el tratamiento biológico de aguas. Recientemente, se ha reportado que el cometabolismo microbiano puede ser crucial para la biotransformación de los EOCs. El cometabolismo es definido como la transformación de un sustrato de no crecimiento en la presencia obligatoria de un sustrato de crecimiento u otra fuente de energía. Se sabe poco sobre la capacidad cometabólica de lodos nitrificantes estabilizados para biotransformar el BT. En la primera parte del presente estudio, se evaluó la contribución del proceso de nitrificación en la oxidación simultáneos de amonio y biotransformación del BT (5 mg/L) en cultivos en lote de 49 d, inoculados con un lodo producido bajo condiciones nitrificantes en estado estacionario. Se encontró que el lodo nitrificante pudo consumir BT en la presencia obligada de amonio. Además, al aumentar la concentración inicial de amonio (100 - 300 mg N/L), se obtuvieron incrementos de 2.3 y 5.8 veces en la eficiencia y la velocidad específica de consumo de BT, respectivamente. Estos resultados evidenciaron una mayor capacidad de biotransformación cometabólica del BT por parte del lodo nitrificante, con el amonio fungiendo como principal fuente de energía. A 300 mg de  $\text{N-NH}_4^+$ /L, el lodo tuvo la capacidad de biotransformar el 40.8% de BT y el 77.6% de amonio el cual fue completamente oxidado a nitrato. Al usar aliltiurea como inhibidor específico de la enzima amonio monooxigenasa (AMO), se demostró que la totalidad de la biotransformación cometabólica del BT estuvo asociada con la actividad de la AMO de las bacterias amonio oxidantes. La adición de acetato como fuente de energía para los organismos heterótrofos del lodo nitrificante no favoreció la biotransformación del BT. El BT provocó efectos inhibitorios sobre la nitrificación, causando una disminución de 93.4-99.7% en la velocidad específica de oxidación de amonio y de 90.3-99.5% en la velocidad específica de producción de nitrato.

En la segunda parte del estudio, se utilizó un reactor SBR con flujo discontinuo para evaluar la biotransformación del BT bajo condiciones nitrificantes con concentraciones crecientes de amonio. La operación del reactor se dividió en cuatro fases: a) ciclos 1 a 14 con 300 mg N/L de amonio sin BT con una duración de dos días; b) ciclos 15 a 20 con 300 mg N/L de amonio y 5 mg BT/L; c) ciclo 21 con 400 mg N/L de amonio y 5 mg BT/L; d) ciclos 22 a 25 con 500 mg

## Biotransformación del benzotriazol bajo condiciones nitrificantes

---

N/L de amonio y 5 mg BT/L. Todos los ciclos con BT duraron 35 días. Primeramente, se corroboró que el lodo proveniente de un reactor continuo nitrificante mantuviera una actividad respiratoria nitrificante y estable a través de los 14 ciclos de operación con 300 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L sin BT, obteniéndose eficiencias de consumo de amonio de 99.5 ± 0.6% y rendimientos de nitrato cercanos a 1. En el ciclo 15, primer ciclo de adición de BT (5 mg/L), el lodo nitrificante tuvo la capacidad de consumir un 31.4% del BT después de 35 días de operación del reactor SBR. Del ciclo 15 al ciclo 20 (300 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L y 5 mg BT/L) se mantuvo una eficiencia de consumo de BT del 32.2 ± 1.5%, de amonio del 100% y rendimientos de nitrato cercanos a 1. Al incrementar la concentración inicial de amonio (de 300 a 500 mg N/L), se propició un incremento de 2.1 veces en la eficiencia de consumo de BT y de 2.4 veces en su velocidad específica, indicando que el consumo cometabólico del BT por las bacterias amonio oxidantes fue favorecido bajo estas condiciones. En el ciclo 22, con 500 mg N/L de amonio en el reactor SBR, el lodo tuvo la capacidad de biotransformar el 65.9% del BT. Respecto al proceso nitrificante en presencia de BT (del ciclo 15 al ciclo 25), se mantuvo una eficiencia de consumo de amonio del 100% sin acumulación de nitrito y un rendimiento de nitrato cercano a uno. Aunque las velocidades específicas de consumo de amonio y formación de nitrato se vieron afectadas por la presencia de BT, la ruta metabólica nitrificante no se vio afectada ya que todo el amonio consumido fue transformado hasta nitrato como producto final de la nitrificación. Este estudio muestra el papel de las bacterias amonio oxidantes en la biotransformación cometabólica del BT y su uso potencial para la aplicación del cometabolismo en el tratamiento de aguas residuales contaminadas con amonio y BT.

### Abstract

Benzotriazole (BT) is a corrosion inhibitor widely distributed in aquatic environments and one of the most recalcitrant emerging organic contaminants (EOCs) during the biological treatment of wastewater. Recently, microbial cometabolism has been reported as crucial for the biotransformation of EOCs. Cometabolism was described as the transformation of non-growth substrate in the obligatory presence of a growth-substrate or another energy source. Little is known about the cometabolic capacity of stabilized nitrifying sludge to biotransform BT. In the first part of the present study, the contribution of the nitrification process in the simultaneous oxidation of ammonium and biotransformation of BT (5 mg/L) was evaluated in 49 d batch cultures inoculated with a sludge produced in steady-state nitrification. It was found that the nitrifying sludge could consume BT in the obligate presence of ammonium. Moreover, when the initial ammonium concentration was increased from 100 to 300 mg N/L, 2.3- and 5.8-fold increases were obtained in efficiency and specific rate of BT removal, respectively. These results evidenced a higher cometabolic capacity of the nitrifying sludge for biotransforming BT, being ammonium the main energy source. At 300 mg  $\text{NH}_4^+$ -N/L, the sludge biotransformed 40.8% of BT and 77.6% of ammonium which was completely oxidized into nitrate. By using allylthiourea as specific inhibitor of ammonium monooxygenase (AMO), it was shown that the totality of BT cometabolic biotransformation was associated with the AMO activity of ammonium oxidizing bacteria. The addition of acetate as an energy source for the heterotrophic organisms or the nitrifying sludge did not favor the biotransformation of BT. BT provoked inhibitory effects on nitrification, causing decreases of 93.4-99.7% for specific rate of ammonium oxidation and 90.3-99.5% for specific rate of nitrate production.

In the second part of the study, a SBR reactor with discontinuous flow was used to evaluate the biotransformation of BT under nitrifying conditions with increasing concentrations of ammonium. The operation of SBR was divided in four phases: a) cycles 1 to 14 with 300 mg  $\text{NH}_4^+$ -N/L without BT, it had a duration of two days; b) cycles 15 to 20 with 300 mg  $\text{NH}_4^+$ -N/L and 5 mg BT/L; c) cycle 21 with 400 mg  $\text{NH}_4^+$ -N/L and 5 mg BT/L; d) cycles 22 to 25 with 500 mg  $\text{NH}_4^+$ -N/L and 5 mg BT/L. All cycles with BT addition lasted 35 days. Firstly, it was confirmed that the sludge obtained from a continuous nitrifying reactor had a stable and nitrifying respiratory activity through 14 cycles of operation with 300 mg  $\text{NH}_4^+$ -N/L without BT, obtaining



## Biotransformación del benzotriazol bajo condiciones nitrificantes

---

efficiencies of ammonium consumption of  $99.5\% \pm 0.6\%$  and nitrate yields close to 1. In cycle 15, the first cycle of BT addition (5 mg/L), the nitrifying sludge had the capacity to consume 31.4% of BT after 35 days of operation of the SBR reactor. From cycle 15 to cycle 20 (300 mg  $\text{NH}_4^+\text{-N/L}$  and 5 mg BT/L), the efficiency of BT consumption was maintained at  $32.2 \pm 1.5\%$ , the efficiency of ammonium consumption at 100% and nitrate yields close to 1. By increasing the initial ammonium concentration (300 to 500 mg N/L), increases of 2.1- and 1.7-fold were reached for efficiency and specific rate of BT removal, respectively, indicating that the cometabolic consumption of BT by the ammonium oxidizing bacteria was favored under these conditions. In cycle 22, at 500 mg  $\text{NH}_4^+\text{-N/L}$  in the SBR reactor, the sludge biotransformed 63% of BT. Regarding the nitrifying process in the presence of BT (cycle 15 to cycle 25), an ammonium consumption efficiency of 100% was maintained without nitrite accumulation and a nitrate yield close to one. Although the specific rates of ammonium consumption and nitrate formation were affected by the presence of BT, the nitrifying metabolic pathway was not affected since all the ammonium consumed was transformed to nitrate as final product of nitrification.

This study shows the role of ammonium oxidizing bacteria in the cometabolic biotransformation of BT and their potential use for cometabolism application in treatment of wastewater contaminated with ammonium and BT.

### 1 Introducción

Debido al aumento poblacional, al intercambio intercultural y a la globalización, el medio ambiente ha sufrido cambios muy drásticos en las últimas décadas. A causa del consumismo y de la poca reutilización de los materiales que se fabrican día con día, la sustentabilidad de los ecosistemas se ha visto amenazada. La sobreexplotación de los recursos naturales contribuye de manera irreversible al desequilibrio de los ecosistemas. El sector industrial es una fuente continua de contaminación para el ambiente a través de la generación de desechos y gases tóxicos, así como de aguas residuales contaminadas. Además de los contaminantes que las industrias arrojan al medio ambiente como solventes, compuestos orgánicos, compuestos nitrogenados, hidrocarburos, etc., también hay una contaminación por compuestos trazas llamados contaminantes orgánicos emergentes (EOCs por sus siglas en inglés), los cuales ponen en riesgo a los ecosistemas y a la salud humana a pesar de estar presentes a concentraciones muy bajas (Fernandez-Fontaina *et al.*, 2012; Tran *et al.*, 2013; Sorensen *et al.*, 2014). Los EOCs han sido detectados en diferentes ecosistemas como aguas residuales, acuíferos, sedimentos y en agua potable en niveles traza desde ng/L hasta µg/L (Stasinakis *et al.*, 2013; Tran *et al.*, 2013; Petrie *et al.*, 2015).

Los EOCs de origen farmacéutico, productos de cuidado personal, algunos plaguicidas, pesticidas, productos veterinarios, compuestos industriales, aditivos alimentarios etc., pueden introducirse al medio ambiente a través de diferentes rutas, ya sea de forma directa o indirecta, por medio de efluentes industriales o a través de plantas de tratamiento de aguas residuales. Los EOCs permanecen debido a que el tratamiento ha sido insuficiente e ineficaz, o fueron parcialmente degradados debido a las propiedades fisicoquímicas de estos compuestos (Barbosa *et al.*, 2016; Naidu *et al.*, 2016; Matamoros *et al.*, 2017). La presencia de estos contaminantes en ecosistemas hídricos produce efectos dañinos a los organismos acuáticos y cambios que amenazan la sustentabilidad de dichos ecosistemas (Tran *et al.*, 2013; García-Rodríguez *et al.*, 2014).

Aunque los EOCs están presentes a menudo en aguas naturales y aguas residuales en concentraciones traza, muchos de ellos son tóxicos y/o resistentes al consumo microbiano

(Tran *et al.*, 2013; Petrie *et al.*, 2015). Diversas comunidades de microorganismos, como bacterias y hongos, de suelos y aguas, pueden consumir los EOCs como sustratos a través de su metabolismo celular, favoreciendo así la eliminación y/o biotransformación de estos contaminantes. Por lo cual, en sistemas de tratamiento de aguas residuales, se puede explotar la capacidad metabólica de los consorcios microbianos para la biotransformación de los EOCs (Tran *et al.*, 2013). Los EOCs presentes en el medio ambiente pueden no ser considerados como las únicas fuentes de carbono o energía para mantener el crecimiento de la biomasa e inducir las enzimas correspondientes para su biodegradación. En este contexto, se requiere críticamente la presencia obligatoria de un sustrato de crecimiento u otro compuesto utilizable como fuente de energía para mantener la biomasa e inducir las enzimas y/o cofactores necesarios para la biodegradación de los EOCs. Este proceso se conoce como cometabolismo. De acuerdo con Tran *et al.* (2013), la biodegradación de los EOCs tanto en sistemas naturales como de ingeniería se atribuye tanto al metabolismo como al cometabolismo por los microorganismos pertinentes.

### 1.1 Nitrificación

El nitrógeno es un elemento abundante en la naturaleza que es usado por animales y plantas a través del ciclo del nitrógeno, sin embargo, debido a la actividad del ser humano este ciclo se ha visto afectado alterando el medio ambiente y repercutiendo sobre el agua, suelo y atmósfera. El exceso de compuestos nitrogenados descargados en cuerpos de agua resulta en una sobre estimulación de crecimiento de algas y cianobacterias, lo que lleva a una disminución de la concentración de oxígeno disuelto, causando la eutroficación y afectando a los organismos acuáticos, provocando inclusive hasta la muerte (Ge *et al.*, 2015; Soliman y Eldyasti, 2018). Uno de los métodos biológicos para la eliminación del nitrógeno de las aguas residuales es el tratamiento por nitrificación acoplada a la desnitrificación, el cual es considerado económico y eficiente. La nitrificación se lleva a cabo en dos etapas de oxidación biológica del amonio por dos diferentes grupos de bacterias autótrofas, las bacterias amonio oxidantes (AOB, por sus siglas en inglés) y las bacterias nitrito oxidantes (NOB, por sus siglas en inglés) (Ge *et al.*, 2015; Soliman y Eldyasti, 2018). En la primera etapa, las AOB oxidan el amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) y posteriormente, en la segunda etapa, las NOB oxidan el nitrito

formado a nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ). En años recientes, se ha descubierto que arqueas oxidantes de amoníaco (AOA) también participan en la oxidación del amonio (Ren *et al.*, 2020). Además, se ha informado de bacterias que llevan a cabo la completa oxidación de amonio a nitrato (COMAMMOX), las cuales pueden utilizar el amonio y el nitrito como donadores de electrones (Ren *et al.*, 2020). Se ha reportado que la oxidación de amonio podría acoplarse a la reducción de hierro (Fe III), teniendo como productos finales  $\text{N}_2$ ,  $\text{NO}_2^-$  o  $\text{NO}_3^-$  en diferentes ambientes (FEAMMOX) (Yin *et al.*, 2019; Ren *et al.*, 2020). En el proceso de oxidación anaerobia de amonio (ANAMMOX), el amonio puede utilizarse como donador de electrones y reducir el nitrito a  $\text{N}_2$  de forma autotrófica (Ren *et al.*, 2020). Por otra parte, la desnitrificación es llevada a cabo por un grupo de bacterias anaerobias organótrofas o litótrofas, las cuales realizan la reducción de nitrato a nitrógeno molecular (Van Rijn *et al.*, 2006).

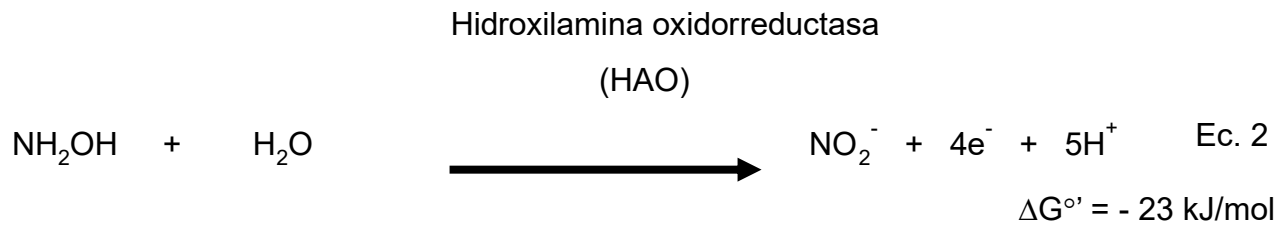
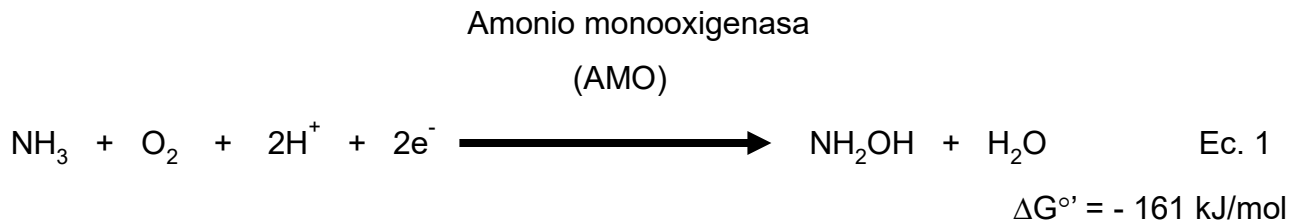
### 1.1.1 Aspectos básicos de la nitrificación

#### 1.1.1.1 Microbiología

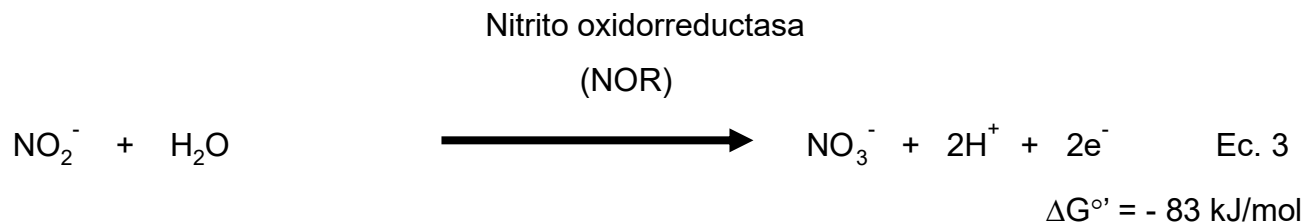
La nitrificación es la oxidación biológica de amonio a nitrato vía nitrito, siendo realizada por bacterias de la familia *Nitrobacteriaceae*. La nitrificación es llevada a cabo por las bacterias amonio oxidantes de las cuales cinco géneros han sido reconocidos y clasificados en la subclase  $\beta$ -proteobacteria que incluye a *Nitrosomonas* (incluyendo *Nitrosococcus mobilis*), *Nitrospira*, *Nitrosolobus*, *Nitrosovibrio* y un grupo de *Nitrosococcus* que pertenece a la subclase de  $\gamma$ -proteobacteria (Soliman y Eldyasti, 2018). De las bacterias nitrito oxidantes, se describen cuatro grupos filogenéticamente distintos, se asignaron dos géneros de *Nitrococcus* y *Nitrobacter* a la subclase  $\alpha$  y  $\gamma$  de proteobacteria, respectivamente. El género de *Nitrospira*, incluido en su propia subdivisión *phylum Nitrospira*, se agrupó a la subclase  $\delta$  (Zepeda Pedreguera, 2005; Silva Luna, 2011; Tran *et al.*, 2013; Ge *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015; Lawson y Lückner, 2018; Soliman y Eldyasti, 2018). Ambos grupos de bacterias litoautótrofas obtienen su energía a través de la oxidación del amonio y nitrito, respectivamente y el carbono de la fijación del  $\text{CO}_2$ . Las dos etapas de la nitrificación se muestran en las siguientes reacciones (Ec. 1 a 3) (Bock *et al.*, 1991; Bejarano Ortiz, 2015):

## Biotransformación del benzotriazol bajo condiciones nitrificantes

- ✓ La oxidación de amoníaco a nitrito, llevada a cabo por bacterias amonio oxidantes:



- ✓ La oxidación del nitrito a nitrato, llevada a cabo por bacterias nitrito oxidantes:



En las plantas de tratamiento de aguas residuales, en los lodos activados usados para la eliminación de carbono y nitrógeno coexisten microorganismos heterótrofos y bacterias nitrificantes bajo condiciones aerobias. Dentro de las bacterias nitrificantes, el grupo de las AOB en recientes años ha sido ampliamente estudiado debido a su capacidad para eliminar simultáneamente amonio y contaminantes orgánicos recalcitrantes (Roh *et al.*, 2009; Margot *et al.*, 2016; Kumwimba y Meng, 2019). Por ejemplo, *Nitrosomonas europaea* es una bacteria quimiolitótrofa amonio oxidante obligada que deriva su energía para el crecimiento exclusivamente a partir de la oxidación del amonio a nitrito y se sabe que, también es capaz de oxidar diversos compuestos carbonados tales como metano, metanol, fenol y benceno, así como hidrocarburos halogenados y en varios casos se ha demostrado que la enzima AMO

está involucrada en la oxidación de estos compuestos (McCarty, 1999; Shi *et al.*, 2004). A partir de estos datos, varias investigaciones se han centrado en la utilización de lodos nitrificantes enriquecidos para aumentar la eficiencia de eliminación en la biodegradación de EOCs en el tratamiento de aguas residuales (Tran *et al.*, 2009; Fernandez-Fontaina *et al.*, 2012; Mai *et al.*, 2016).

### 1.1.1.2 Bioquímica

La conversión de amoníaco a hidroxilamina y a nitrito es catalizada por dos enzimas, la enzima AMO y la enzima HAO. La AMO es una enzima de cobre hetero-trimérica que está unida a la membrana, con amplios rangos de sustrato y perfiles de inhibidor de acetileno. La AMO está codificada por tres subunidades de genes, *amoC* (31.4 kDa), *amoA* (31.4 kDa) y *amoB* (38 kDa), pero solo una parte del gen *amoA* actúa como un gen de función de AOB (Bock *et al.*, 1991; Tran *et al.*, 2013; Ge *et al.*, 2015). La inactivación de la enzima AMO se produce al romperse las células; sin embargo, todavía es factible probar la actividad de forma *in vitro*. La enzima HAO está situada en el periplasma y tiene subunidades multi-*c*-heme y homotrímico (64 kDa). Fue codificada por los grupos de genes de *hao* (hidroxilamina oxidorreductasa, 1710 pb), que revelaron un gen altamente conservado que codifica proteínas, especialmente en la subdivisión  $\beta$  (Bock *et al.*, 1991; Ge *et al.*, 2015).

Las NOB obtienen energía de la oxidación de nitrito a nitrato. La enzima involucrada en esta oxidación es la nitrito oxidorreductasa (NOR) en *Nitrobacter*, y como sistema oxidante de nitrito en los géneros de *Nitrococcus*, *Nitrospina* y *Nitrospira*. La composición compleja de la NOR consta de 2-3 subunidades con hierro, molibdeno, azufre y cobre, como subunidad  $\alpha$ , NorA (115-130 kDa), subunidad  $\beta$  y NorB (65 kDa). NorA podría comprender el sitio catalítico de NOR y NorB podría funcionar eficazmente como una proteína canalizadora de electrones entre NorA y la cadena de transporte de electrones integrada en la membrana (Bock *et al.*, 1991; Ge *et al.*, 2015).

### 1.1.1.3 Factores ambientales que afectan la nitrificación

El éxito de una buena nitrificación depende del conocimiento de los parámetros que afectan al proceso respiratorio y al crecimiento de las bacterias AOB y NOB, algunos de estos parámetros que se deben regular son la concentración de oxígeno disuelto (OD), la temperatura, el pH, el tiempo de retención hidráulico (TRH), el tiempo de retención de sólidos (STR), así como la presencia de compuestos tóxicos o inhibitorios. Si estos parámetros no se regulan adecuadamente los procesos amonio y nitrito oxidantes se verán afectados de manera diferente ya que son microorganismos y enzimas diferentes las que participan en cada ruta de oxidación (Ge *et al.*, 2015; Soliman y Eldyasti, 2018). Debido a esto, es necesario tomar en cuenta ambos procesos (amonio y nitrito oxidación) cuando se evalúa la nitrificación bajo diferentes condiciones ambientales, considerando además los productos obtenidos, velocidades específicas de consumo de sustrato o producción de producto, parámetros cinéticos o cualquier efecto inhibitorio que pudiera afectar el proceso.

- Concentración de oxígeno disuelto (OD): en el tratamiento de aguas residuales contaminadas con amonio, el oxígeno debe estar presente para que se lleve a cabo la nitrificación, si hay una limitación de oxígeno en el sistema habrá una disminución en la velocidad del proceso. Estudios muestran que la concentración de oxígeno disuelto afecta la estructura de la comunidad microbiana, así como la eficiencia y la velocidad en la eliminación de los contaminantes (Chen *et al.*, 2017). Basado en las diferencias de la constante de saturación de oxígeno de Monod ( $K_s$ ), para las AOB y NOB de 0.3 y 1.1 mg/L, respectivamente, las AOB presentan una mayor afinidad por el oxígeno que las NOB (Bejarano Ortiz, 2015; Soliman y Eldyasti, 2018), debido a esto, cuando se tiene una baja concentración de oxígeno disuelto, se ha observado una menor actividad respiratoria y un menor crecimiento de las NOB. Asimismo, se ha reportado que con una concentración de OD de 0.5 mg/L, no hubo efectos en la oxidación de amonio mientras que la oxidación de nitrito fue afectada (Hanaki *et al.*, 1990); mientras que, a concentraciones de OD de 1.5-4.0 mg/L, se obtuvo una completa nitrificación sin acumulación de nitrito (Soliman y Eldyasti, 2018). Sin embargo, no hay condiciones óptimas de OD para que se lleve de manera

completa la nitrificación, puesto que también dependerá del inóculo y su concentración, tipo y concentración de sustrato, sistema de trabajo utilizado, etc.

- Temperatura: este parámetro tiene efecto sobre el crecimiento de las AOB y NOB, aunque éstas en general pueden sobrevivir en un intervalo de temperatura de 4-45 °C. Sin embargo, al ser microorganismos mesófilos la temperatura debería ser considerada entre los 28 y 36 °C (Bejarano Ortiz, 2015; Bock *et al.*, 1991).
- pH: la variación de pH afecta la composición microbiana, aunque en las plantas de tratamiento de aguas residuales los microorganismos pueden crecer en un rango de pH de 6-9 (Chen *et al.*, 2017). En el proceso nitrificante, el pH influye directamente en los cambios sobre el equilibrio químico entre el amonio y amoniaco (amoniaco libre, AL) ( $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ ,  $\text{pK}_a = 9.24$  a 25 °C) y el ácido nitroso (ácido nitroso libre, ANL) y nitrito ( $\text{HNO}_2/\text{NO}_2^-$ ,  $\text{pK}_a = 3.34$  a 25°C) (Ec. 4) (Bejarano Ortiz, 2015; Soliman y Eldyasti, 2018).

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \left( \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \right) \quad \text{Ec. 4}$$

Donde:  $\text{pK}_a$  es la constante de disociación del ácido,  $[\text{A}^-]$  es la concentración de la especie básica y  $[\text{HA}]$  es la concentración de la especie ácida.

Las NOB son más sensibles al amoniaco libre mostrando inhibición a valores de 0.1-1.0 mg AL/L, sin embargo, se requieren concentraciones de 10-150 mg AL/L para que las AOB presenten una inhibición. A concentraciones de 0.22-2.8 mg ANL/L, hay inhibición de los organismos nitrificantes (Anthonisen *et al.*, 1976; Soliman y Eldyasti, 2018). Por otro lado, la oxidación de amonio a nitrito ocurre bajo condiciones de pH entre 7.5 a 8.0 (moderadamente alcalinas), sin embargo, también se puede dar en condiciones ligeramente ácidas (pH entre 5 y 6) (Bejarano Ortiz, 2015).

- Tiempo de retención hidráulica (TRH) y tiempo de retención de sólidos (STR): el tiempo de duplicación de las AOB es de 7 a 8 h y el de las NOB de 10 a 13 h (Bock *et al.*, 1986). En sistemas continuos o dinámicos, los microorganismos con una velocidad específica de



crecimiento máxima baja, solo pueden mantenerse a un STR largo, por lo tanto, un ajuste de TRH o STR en los tratamientos puede conducir a cambios en los procesos de amonio y nitrito oxidación (Ge *et al.*, 2015; Soliman y Eldyasti, 2018). Estos parámetros pueden influir directamente sobre el proceso de la nitrificación ya que pueden provocar cambios en la comunidad microbiana en los sistemas utilizados y verse favorecido un tipo de bacterias.

- Compuestos tóxicos o inhibitorios: se ha reportado que diversos compuestos pueden causar una parcial o completa inhibición en el proceso nitrificante de los organismos autótrofos presentes en los lodos activados. Se ha demostrado que la enzima AMO, además de oxidar amonio como su principal fuente de energía, tiene un amplio rango de sustratos para su oxidación catalítica y que los efectos de muchos compuestos inhibidores se deben a la competencia por el sitio activo (McMarty, 1999). Algunos compuestos inhibidores de la nitrificación que contienen S son tiosulfatos, xantatos, amonioácidos, pesticidas y fungicidas (algunos compuestos específicos son el disulfuro de carbono (CS<sub>2</sub>), tiourea, aliltiourea, guaniltiourea, dietilditiocarbamato de sodio, tiocarbamato de sodio, tioemicarbazida, etc.) (McMarty, 1999). En cultivos puros con *N. europaea* se descubrió que el acetileno (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>) inhibía la oxidación del NH<sub>3</sub>. Varios compuestos heterocíclicos son potentes inhibidores de la oxidación del NH<sub>3</sub> en el suelo, entre ellos encontramos al nitrapirina, etriazol, 2-etinilpiridina, 4-amino-1,2,4-triazol, etc. (McMarty, 1999), además se ha demostrado que compuestos heterocíclicos de N que contienen dos o tres átomos de N adyacentes en el anillo (pirazol, 1,2,4-triazol, piridazina, benzotriazol (BT) e indazol) también inhiben significativamente la nitrificación en el suelo (McCarty y Bremner, 1989).

A nivel de laboratorio con aguas sintéticas, se ha observado que compuestos orgánicos pueden ocasionar una disminución en la eficiencia de consumo de amonio ( $E_{NH_4^+}$ ) y en las velocidades de la nitrificación (velocidad específica de consumo de amonio y velocidad específica de producción de nitrato,  $q_{NH_4^+}$  y  $q_{NO_3^-}$ , respectivamente) (Texier y Gomez, 2007; Martínez-Hernández *et al.*, 2011; Tran *et al.*, 2013, Martínez-Jardines *et al.*, 2018). Por ejemplo, Zepeda *et al.* (2006) reportaron una disminución de la actividad nitrificante de un lodo en un 57 y 26% de la  $E_{NH_4^+}$  en presencia de 10 mg C/L de benceno y *m*-xileno, respectivamente

y una disminución del 76-99% en la  $q_{\text{NH}_4^+}$  y un 45-98% en la  $q_{\text{NO}_3^-}$  en presencia de benceno, tolueno y *m*-xileno (BTX). Silva *et al.* (2009) observaron que, usando un lodo con actividad nitrificante en cultivos en lote, el *p*-cresol (25 mg C/L) inhibía el proceso amonio oxidante disminuyendo la  $q_{\text{NH}_4^+}$  en un 83% sin embargo, después de 48h de cultivo el 96% de amonio fue consumido y transformado hasta nitrato. En los estudios de Martínez-Jardines *et al.* (2018) utilizando un reactor SBR y un lodo con actividad nitrificante a diferentes concentraciones de amonio inicial (100 a 500 mg N/L), reportaron que la presencia de 2-clorofenol (60 mg C/L) retardó el consumo de amonio entre 10 y 14 d, hubo acumulación de nitrito en todas las concentraciones de amonio utilizadas y la formación de nitrato se dio de manera completa en algunos casos a los 16 días del ciclo de operación, sin embargo al final del periodo de cultivo se obtuvo una completa nitrificación ( $E_{\text{NH}_4^+} = 99\%$  y rendimiento de producción de nitrato de 0.93) y una completa eliminación del 2-clorofenol durante los primeros 7 días de cultivo. Los autores sugieren que este comportamiento en la oxidación del proceso nitrificante en un largo tiempo se debe a la presencia del 2-clorofenol, provocando una afectación significativa en los procesos de formación y oxidación de los intermediarios del proceso nitrificante (hidroxilamina, nitrito y nitrato).

Por otro lado, se ha indicado que compuestos orgánicos como los EOCs, que generalmente son sustratos de no crecimiento, pueden inhibir directamente a la enzima AMO o bien que los productos de degradación de estos compuestos pueden causar un daño celular, así como causar una cierta competencia por el sitio activo de la AMO entre el sustrato de crecimiento (amonio) y los sustratos de no crecimiento. Como resultado se puede observar una disminución en las velocidades de oxidación de ambos tipos de sustratos (Tran *et al.*, 2013). Sin embargo, en el caso de los EOCs como el BT, todavía son limitados los estudios para evaluar su efecto sobre la nitrificación, así como la contribución de las AOB y la enzima AMO sobre su biotransformación.

### 1.2 Contaminantes Orgánicos Emergentes

Los procesos biológicos pueden jugar un papel importante en la eliminación de EOCs (Tran *et al.*, 2013). La persistencia de los EOCs (productos farmacéuticos, aditivos, productos industriales y productos de cuidado personal) en los procesos de tratamiento de aguas ha provocado que en las últimas décadas, la investigación en esta área se dirija a desarrollar estrategias para su detección y eliminación, y por lo tanto que puedan disminuir su riesgo potencial para los ecosistemas y la salud humana (Helbling *et al.*, 2012; Yuan *et al.*, 2014; García-Rodríguez *et al.*, 2014; Petrie *et al.*, 2015; Ahmed *et al.*, 2017; García *et al.*, 2020). En la literatura, existe información sobre la biodegradación de varios tipos de estos contaminantes emergentes, principalmente sobre los productos farmacéuticos, disruptores endócrinos y productos de cuidado personal, sin embargo, la información es más escasa para algunos de ellos como los benzotriazoles (BTs), benzotiazoles y compuestos perfluorados (Stasinakis *et al.*, 2013). Por lo cual es necesario ampliar la investigación para su detección, distribución y eliminación y/o biotransformación en los diferentes procesos biológicos de tratamiento de aguas residuales.

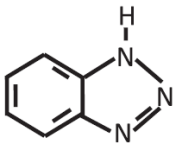
#### 1.2.1 Benzotriazol y derivados

Los BTs son clasificados con altos volúmenes de producción química, con una producción superior a 9000 toneladas/año en todo el mundo (Reemtsma *et al.*, 2010; Loi *et al.*, 2013). Los BTs son compuestos orgánicos emergentes que, como resultado de su generalizada aplicación y su resistencia hacia su transformación abiótica y biótica, han sido detectados en diferentes compartimientos ambientales, especialmente en ambientes acuáticos como en efluentes de plantas de tratamiento, aguas superficiales y agua potable en concentraciones de ng/L a µg/L (Wang *et al.*, 2013; Alotaibi *et al.*, 2015; Bahnmüller *et al.*, 2015; Felis *et al.*, 2016). Sin embargo, los BTs se han encontrado en concentraciones de mg/L, por ejemplo, en aeropuertos (Cancilla *et al.*, 1988; Breedveld *et al.*, 2003). También se han encontrado en sedimentos y lodo, en muestras de polvo en interiores, en tejido y orina humana (Asimakopoulos *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2016; Shi *et al.*, 2019).

## Biotransformación del benzotriazol bajo condiciones nitrificantes

Los BTs son generalmente usados en productos industriales, domésticos, productos de cuidado personal, en aditivos anticorrosivos, anticongelantes y antiempañantes, como agentes complejantes para productos intermediarios químicos y estabilizadores ultravioleta. Se utilizan en el procesamiento de metales, estabilización de polímeros, aplicaciones fotográficas, en el desarrollo de productos farmacéuticos como agentes antivirales, en la síntesis de colorantes y fungicidas. Los BTs se pueden encontrar en los detergentes para lavavajillas, en una amplia variedad de líquidos como líquidos para cortar metales, líquidos anticongelantes y antihielo de aeronaves, líquidos hidráulicos, líquidos de refrigeración, de calefacción, así como líquidos de frenos (Loi *et al.*, 2013; Huntscha *et al.*, 2014; Bahnmüller *et al.*, 2015; Mazioti *et al.*, 2015a, b; Felis *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016; Shi *et al.*, 2019). Los BTs son compuestos heterocíclicos con una estructura química que consiste en un anillo de cinco miembros con tres átomos de nitrógeno (triazol) compartidos a C-C con un anillo de seis miembros (benceno) y otro sustituyente. Los BTs presentan una alta versatilidad, son caracterizados por una alta solubilidad en agua, alta polaridad y baja tendencia a sorberse sobre materia orgánica, además de su bajo coeficiente de partición octanol-agua ( $\log K_{ow} = 1.23-2.17$ ), por lo consiguiente pueden ser muy movibles en ambientes acuáticos (Tabla 1).

Tabla 1. Características del benzotriazol (modificado de Alotaibi *et al.*, 2015).

Nombre común	Benzotriazol o 1H-Benzotriazol
Estructura química	
Fórmula molecular	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> N <sub>3</sub>
Peso molecular	119.13 g/mol
$\log K_{ow}$	1.23, 1.44, 2.17 <sup>a,b</sup>
$\log K_{oc}$	1.02
Punto de fusión	98-99 °C
pKa (ácido conjugado)	8.2, 8.3 <sup>c</sup>
Solubilidad en agua	28 g/L
Solubilidad en metanol	1.33 g/L
Coficiente de Henry (a 25°C)	3.17x10 <sup>-7</sup> m <sup>3</sup> /mol

Mai *et al.*, 2016<sup>a</sup>; Liu *et al.*, 2013<sup>b</sup>; Bahnmüer *et al.*, 2015<sup>c</sup>

Debido a su estabilidad química, los BTs pueden ser muy persistentes a la transformación o biodegradación microbiana y ser parcialmente eliminados en las plantas de tratamiento de aguas residuales y en el medio ambiente (Hart *et al.*, 2004; Herzog *et al.*, 2013, 2014; Bahnmüller *et al.*, 2015). Se han reportado eficiencias de eliminación en sistemas de lodos activados convencionales que van desde 0 a 74% para algunos BTs, de 5 a 28% para algunos benzotiazoles (Felis *et al.*, 2016) y de 23 a 74% para derivados metilados (4 y 5-metilbenzotriazol) en plantas de tratamiento de aguas residuales (Huntscha *et al.*, 2014). En diferentes trabajos donde se estudiaron los contaminantes emergentes de los efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales, los BTs fueron reportados como unos de los compuestos más relevantes, presentando niveles mayores de concentración media y mayor frecuencia de detección (Loos *et al.*, 2013). Se ha encontrado el 5-metilbenzotriazol a concentraciones de hasta 10 µg/L en efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales y superiores a 100 ng/L en aguas de filtración (Yuan *et al.*, 2014). El BT se ha encontrado en aguas subterráneas con un máximo de 1.548 ng/L, en sistemas fluviales con un máximo de 7.997 ng/L y en un pozo de monitoreo de agua en un aeropuerto internacional a una concentración máxima de 128 mg/L (Herzog *et al.*, 2013). En el estudio de Loos *et al.* (2013), se encontraron concentraciones medias en plantas de tratamiento de agua residual de Europa de 2.7 µg/L para el BT y de 2.1 µg/L para el metilbenzotriazol y valores máximos de hasta 221 µg/L y 24.3 µg/L para el BT y toliltriazol, respectivamente. En Alemania, el BT se ha detectado también en efluentes de plantas de tratamiento de aguas a concentraciones de 7-18 µg/L y ha sido frecuentemente detectado en aguas superficiales a concentraciones de 0.1-0.5 µg/L. En la Tabla 2, se muestran más estudios de la detección de BTs en medios acuáticos. Por otro lado, la omnipresencia del BT en el agua puede ser debida a su formación como un producto de biotransformación de sus derivados como el 5-metilbenzotriazol y el clorobenzotriazol (Liu *et al.*, 2013).

## Biotransformación del benzotriazol bajo condiciones nitrificantes

Tabla 2. Presencia de benzotriazoles en muestras de agua de plantas de tratamiento de aguas residuales y agua de ríos ( $\mu\text{g/L}$ ) (modificado de Herrero *et al.*, 2014).

<b>Compuesto (Benzotriazoles)</b>	<b>Influyente de aguas residuales</b>	<b>Efluente de aguas residuales</b>	<b>Agua de río</b>	<b>País</b>
BT	5-7	2-3	-	Australia
	1-44	1-10	< 0.05-3	Alemania
	0.5-3	0.001-0.5	-	Grecia
	0.5-210	0.06-8	0.05-7	España
	13-75	11-100	0.06-5	Suiza
	-	< 8	-	Holanda
	-	0.8-4	0.2	Reino Unido
4-Metilbenzotriazol	2-6	1-2	< 0.05-0.3	Alemania
	< 0.06-11	0.04-7	0.03-0.9	España
	-	3-6	0.4	Reino Unido
	-	-	<80-1670	USA
5-Metilbenzotriazol	5-8	0.4-0.9	-	Australia
	1-5	0.5-2	<0.05-2	Alemania
	<0.06-5	0.02-17	<2	España
	1-2	-	0.04-2	España
	-	3-6	0.04	Reino Unido
	-	-	<80-2160	USA
Toliltriazol	-	5	0.7	Alemania
	3-16	0.3-6	-	Grecia
	0.4-91	0.9	0.2	España
	0.2-6	0.1-4	0.1-625	Suiza
	-	3	-	Holanda
5,6-Dimetilbenzotriazol	0.9-2	0.1-0.2	-	Australia
	0.02	0.01	-	Alemania
	<27	<30	-	Grecia

## Biotransformación del benzotriazol bajo condiciones nitrificantes

	<0.01	0.002-0.07	0.002	España
5-	0.6-2	0.08-0.3	-	Australia
Clorobenzotriazol				
	<0.01-14	<0.005	0.002-0.02	España
2-	0.1-0.5	<0.2	-	Grecia
Hidroxibenzotriazol	12	-	-	España

Por otra parte, aunque las bajas concentraciones de los EOCs en ambientes acuáticos pudieran no causar toxicidad aguda a organismos acuáticos o humanos, las potenciales vías de exposición crónica a los EOCs pueden ejercer riesgos adversos (Mai *et al.*, 2016). Los BTs han sido clasificados como tóxicos para organismos acuáticos, particularmente para productores primarios pelágicos invertebrados (Seeland *et al.*, 2012), mostrando actividades estrogénicas en peces, potencialmente cancerígenos (Herrero *et al.*, 2014; Felis *et al.*, 2016; Molins-Delgado *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017; Shi *et al.*, 2019) y tóxicos para mamíferos terrestres y plantas (Nika *et al.*, 2017). Sin embargo, el efecto tóxico del BT y sus derivados no está del todo claro todavía. Por ejemplo, a concentraciones superiores a 40 mg/L de BT, se han reportado efectos tóxicos en las pruebas Microtox y sobre otros organismos (Herzog *et al.*, 2013), sugiriendo posibles efectos perjudiciales en sistemas acuáticos. Por otra parte, Liang *et al.* (2014) realizaron estudios sobre el efecto del BT en peces adultos de la especie *Gabiocypris rarus* expuestos a concentraciones de 0.05, 0.5 y 5 mg/L durante 28 días. Los autores observaron efectos con daño patológico en el hígado asociado con la hipertrofia de los hepatocitos, núcleos picnosis y vacuolización, degeneración del ovario y la estimulación de la espermatogénesis a concentraciones de 5 mg/L. El nivel de 17 $\beta$ -estradiol en plasma fue significativamente mayor en los machos, pero disminuyó en las hembras a 5 mg/L de BT. En el cerebro, la sobre regulación de CYP19B, HLGn y LHB mRNA se detectó en todas las dosis. Como puede observarse, estos resultados muestran efectos muy significativos en peces cuando se exponen al BT a concentraciones de mg/L. Seeland *et al.* (2012) investigaron el efecto agudo y crónico del BT y del 5-metilbenzotriazol sobre el alga verde *Desmodesmus supspicatus*, la planta de agua *Lemna minor* y dos daphnias (*Daphnia magna* y *D. galeata*) a

diferentes concentraciones para cada uno de sus ensayos que van desde 0.1 a 115 mg/L de contaminante. De acuerdo con sus resultados, los BTs son tóxicos para plantas e invertebrados acuáticos, ya que ambos compuestos inhibieron el crecimiento y la reproducción de los organismos.

Aun no se tiene del todo claro cuáles son las formas de acción del BT y sus efectos a largo plazo. Es clara la urgente necesidad de desarrollar más estudios para su eliminación de los sistemas acuáticos, por lo cual es importante tomar en cuenta las propiedades fisicoquímicas del contaminante, las condiciones ambientales y condiciones redox (aerobias o anaerobias) para su biodegradación.

### **1.2.2 Eliminación de EOCs en el tratamiento biológico de aguas**

Las plantas de tratamiento de aguas residuales se han diseñado principalmente para la eliminación de compuestos de carbono orgánico, nitrógeno, azufre y fósforo de las corrientes de aguas residuales domésticas, comerciales e industriales. Sin embargo, durante las últimas décadas, se ha demostrado que estos efluentes contienen también una variedad de microcontaminantes: productos farmacéuticos, productos de cuidado personal, detergentes, entre otros compuestos químicos, y las plantas convencionales de tratamiento biológico de aguas no han sido diseñadas para la eliminación de estos microcontaminantes (De Gusseme *et al.*, 2009; Helbling *et al.*, 2012; Barbosa *et al.*, 2016; Naidu *et al.*, 2016; Matamoros *et al.*, 2017). Esto resulta en la presencia de algunos EOCs en los efluentes tratados de las plantas de tratamiento de aguas residuales a concentraciones relativamente altas o en los efluentes industriales, provocando la contaminación de ríos, corrientes, aguas superficiales y ambientes acuáticos en ng/L a µg/L en todo el mundo (Mai *et al.*, 2016). Debido a esto, los trabajos más recientes se han centrado en estudios para saber qué tipo de microcontaminantes se eliminan biológicamente en el tratamiento de las aguas residuales. Se han monitoreado diferentes plantas de tratamiento de aguas residuales bajo diferentes condiciones de operación, pero sólo se han registrado eficiencias globales de eliminación (García-Rodríguez *et al.*, 2014; Petrie *et al.*, 2015). El proceso de lodos activados ha demostrado lograr una significativa eliminación de muchos microcontaminantes, sobre todo debido a la biodegradación aerobia y adsorción sobre



los sólidos o coloides, pero poco se sabe acerca de los mecanismos y parámetros de operación, lo que podría explicar la disparidad de las eficiencias de eliminación encontradas para tecnologías similares en la literatura (Fernandez-Fontaina *et al.*, 2012; Stasinakis *et al.*, 2013; Petrie *et al.*, 2015). Es importante mencionar también que, al conocer únicamente la eficiencia de eliminación de estos contaminantes por lodos de plantas de tratamiento de aguas residuales, sin identificar los productos formados (biomasa, gases: CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, metabolitos...), no se puede asociar la eliminación de estos contaminantes con procesos respiratorios biológicos aerobios (degradación organotrófica o nitrificación) y anaerobios (metanogénesis, desnitrificación o sulfatorreducción). Por lo tanto, se desconoce también el papel de las diferentes poblaciones microbianas en plantas de tratamiento de aguas en la transformación de los EOCs.

Diversas comunidades de bacterias, hongos y protozoos en lodos activados son capaces de transformar diversos microcontaminantes (Huntscha *et al.*, 2014). Los lodos activados han mostrado mejores eficiencias de biodegradación de diferentes contaminantes a tiempos de retención largos, probablemente asociado con el desarrollo de diversas capacidades metabólicas y cepas microbianas de lento crecimiento, incluyendo el crecimiento y la respiración de bacterias nitrificantes (McAdam *et al.*, 2010; Tran *et al.*, 2013). La eliminación de los EOCs en procesos de lodos activados es muy variable y se ha reportado una mejor eliminación de varios microcontaminantes (productos farmacéuticos, disruptores endocrinos, inhibidores de la corrosión etc.) en relación con el nivel de nitrificación alcanzado durante el tratamiento biológico (Tran *et al.*, 2013; Margot *et al.*, 2016). Por ejemplo, lodos activados con actividad nitrificante han sido reportados como capaces de degradar diferentes estrógenos naturales y sintéticos (estrón, 17β-estradiol, estriol y 17α-etinilestradiol, 1 mg/L) teniendo eficiencias de eliminación de más del 95% (Shi *et al.*, 2004). A partir de ello, otros autores han puesto a prueba la capacidad de las bacterias nitrificantes para degradar una variedad de microcontaminantes emergentes (Tabla 3) (De Gussemme *et al.*, 2009; Tran *et al.*, 2009; McAdam *et al.*, 2010). Recientemente, numerosos estudios han puesto énfasis en la asociación significativa entre la actividad nitrificante de lodos activados y la biodegradación de EOCs en tratamientos biológicos (Men *et al.*, 2017). Los estudios mostrados en la Tabla 3 nos

## Biotransformación del benzotriazol bajo condiciones nitrificantes

---

dan información acerca de los diferentes tratamientos llevados a cabo (cultivos en lote, reactores, etc.), los inóculos utilizados para la degradación (lodos activados convencionales, lodos nitrificantes, etc.), las concentraciones tan variadas de los contaminantes que van desde  $6.5E^{-5}$  a 34 mg/L y las eficiencias de biodegradación de estos contaminantes orgánicos emergentes con un intervalo del 18% hasta el 100% de su eliminación.

## Biotransformación del benzotriazol bajo condiciones nitrificantes

Tabla 3. Estudios acerca de la eliminación de compuestos orgánicos emergentes por lodos activados y lodos nitrificantes.

Tratamiento	Inóculo	Compuesto a tratar	Principales resultados	Referencia
Cultivos en lote	Lodo activado nitrificante (2700 mg MLSS/L)	Estrone 17 β-Estradiol Estriol 17α-Etinilestriol [1 mg/L]	El lodo degradó en 98% el 17 β-estradiol en 2 h y entre 72 y 96 h para los demás compuestos.	Shi <i>et al.</i> , 2004
Cultivo en lote	Cultivo nitrificante enriquecido (123-144 mg SSV/L)	Tricloroetileno [0.05-4.5 mg/L]	Se obtuvieron eficiencias menores al 45% en un periodo de 4 h.	Kocamemi <i>et al.</i> , 2005.
Reactor mezclado y agitado	Comunidad microbiana nitrificante	17α-Etinilestriol [0.30 mg/L]	Se observó una eficiencia de biotransformación del 70% del contaminante, además, la tasa de biotransformación aumentó de 1.1 a 4.1 μmol EE <sub>2</sub> /g SSV h, cuando la tasa de biotransformación de NH <sub>3</sub> aumentó de 0.3 a 3.1 mmol NH <sub>3</sub> /g SSV.h.	Yi <i>et al.</i> , 2007
Cultivo enriquecido en Membrana	Cultivo nitrificante enriquecido (0.75 g SSV/L)	17α-Etinilestradiol [0.75 mg/L]	Se obtuvo una eliminación del 97 ± 2% con una completa nitrificación después de 240 horas.	De Gusseme <i>et al.</i> , 2009

## Biotransformación del benzotriazol bajo condiciones nitrificantes

Cultivos en lote	Cultivo nitrificante enriquecido (30 mg N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /g MLVSS h) 1000 mg/L de biomasa en cada cultivo en lote.	Ácido clofibrico (CA) Gemfibrozil (GFZ) Ibuprofeno (IBP) Fenoprofeno (FEP) Ketoprofeno (KEP) Naproxeno (NPX) Diclofenaco Indometacin Propifenazone Carbamazepina [0.10 mg/L]	La eficiencia de eliminación de los contaminantes incrementó conforme se incrementó la concentración de amonio de 20 a 200 mg N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /L para GFZ, IBP, FEP, KEP, NPX de un 25% a más de 75%.	Tran <i>et al.</i> , 2009
Planta de tratamiento de aguas residuales a escala y planta piloto con proceso de lodos activados nitrificantes, desnitrificante/nitrificante y lodo activado heterotrófico	MLSS: 4.5, 2.4 y 4.3 Kg/m <sup>3</sup> para lodos nitrificantes, nitrificante/destrificante y heterotrófico, respectivamente	Estrógenos [0.700-2091 mg/d]	Las eficiencias de eliminación fueron del 80 y 91% para los lodos nitrificante/desnitrificante y nitrificante, respectivamente. Y solo del 51% en el lodo heterotrófico.	McAdam <i>et al.</i> , 2010
En plantas de tratamiento de aguas	Lodos activados convencionales	BT 5-Metilbenzotriazol [0.003–0.012 mg/L]	Eliminación del 20-70% para el BT y del 30-55% para el 5-metilbenzotriazol.	Reemtsma <i>et al.</i> , 2010
Cultivos en lote	Lodos activados de tres plantas diferentes: (MBR-MH, CAS-E, CAS-M)	BT 4- y 5-Toliltriazol [20–34 mg/L]	Eliminación total del BT (21 a 49 d) y del 5-toliltriazol (7 d) por los tres inóculos. No hubo eliminación de 4-toliltriazol aun después de 49 días de tratamiento.	Herzog <i>et al.</i> , 2013

## Biotransformación del benzotriazol bajo condiciones nitrificantes

Microcosmos	Flora autóctona de acuíferos	de BT 5-Metilbenzotriazol 5-Clorobenzotriazol [1 mg/L]	Eliminación del 72, 84 y 55% después de 77 d de incubación en condiciones aerobias y con tiempos de vida media de $43 \pm 4.8$ , $31 \pm 3.4$ y $47 \pm 3.1$ d respectivamente.	Liu <i>et al.</i> , 2013
Cultivos en lote	Lodo de una planta nitrificante (3000±200 MLSS/L).	de BT 5-Clorobenzotriazol Xilitriazol 2-Hidroxibenzotriazol 4 y 5- Metilbenzotriazol [0.030 mg/L]	Los contaminantes fueron eliminados cerca de las 72 h del experimento, excepto para el 4-metilbenzotriazol que no fue eliminado y el 5-metilbenzotriazol parcialmente biotransformado.	Mazioti <i>et al.</i> , 2015a
Reactor de lecho móvil (MBBR)	Lodo granular nitrificante	58 contaminantes: 36 fármacos, 13 biocidas y pesticidas, 7 compuestos endocrinos BT Metilbenzotriazol [6.5E <sup>-5</sup> -0.05 mg/L]	Se observó una eliminación promedio del 50% con parcial a completa nitrificación (efluente < 1 mg N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /L).	Margot <i>et al.</i> , 2013.
MBBR	Lodo activado proveniente de una planta de tratamiento de aguas residuales nitrificante [3000±200 mg/L]	de BT Hidroxibenzotriazol [0.030 mg/L]	43-76% y 80-97% de eliminación, respectivamente en presencia de compuestos fácilmente biodegradables	Mazioti <i>et al.</i> , 2015b

## Biotransformación del benzotriazol bajo condiciones nitrificantes

Biofiltro nitrificante	Lodo nitrificante	activado	BT	Eliminación:	Mai <i>et al.</i> , 2016.
			[1 mg/L]		
			Cafeina	BT	42.8%
			Bisfenol A	Trimetoprim	98.0%
			Acetaminofen	Bisfenol A	26.2%
			Atrazina	Trimetoprim	17.9%
			17 $\alpha$ -Ethinilestradiol	Acetaminofen	58.6%
			N,N-dietil- <i>m</i> -toluamide	Atrazina	48.7%
			[1-10 mg/L]	17 $\alpha$ -Ethinilestradiol	48.3%
				N,N-dietil- <i>m</i> -toluamide	58.6%
Reactor de lotes secuenciados con lodo granular aerobio, AGS-SBR	Lodo activado 2.4 y 4.7 g SST/L para un primer y segundo ciclo de operación del reactor, respectivamente		BT Bisfenol A Naproxeno Iohexol Irgarol Terbutina Metilbenzotriazol 29 contaminantes más [0.001 mg/L]	Eliminación menor al 40% en el caso del BT. La eliminación de los contaminantes en el reactor con completa nitrificación fue del 80% para nueve contaminantes y del 20% para los 17 restantes.	Margot <i>et al.</i> , 2016

En el caso particular de los BTs, éstos pueden ser parcialmente eliminados por degradación biológica en las plantas de tratamiento de aguas residuales (Loss *et al.*, 2013; Herzog *et al.*, 2013, 2014; Yuan *et al.*, 2014). Como se puede observar en la Tabla 3, la eliminación reportada de BTs en procesos como lodos activados ha sido muy variada, lo cual depende de la estructura química del compuesto y sus propiedades fisicoquímicas, el tipo de cultivo, el reactor o planta de tratamiento de agua residual y las condiciones de operación, el origen y la alimentación del lodo, la ausencia o presencia de un periodo de aclimatación y la adición de nutrientes (Stasinakis *et al.*, 2013; Herzog *et al.*, 2013, 2014; Reemtsma *et al.*, 2010; Yuan *et al.*, 2014). Herzog *et al.* (2013) estudiaron la capacidad de biodegradación del BT (34 mg/L) y del 4- y 5-toliltriazol (20.8 y 31.2 mg/L, respectivamente) utilizando lodos activados provenientes de diferentes plantas de tratamiento de aguas: un biorreactor de membrana (MBR-MH), una planta de lodos activados convencional con nitrificación/desnitrificación intermitente (CAS-E) y una planta con un tratamiento de lodos activados de dos etapas (CAS-M). Se obtuvo una total eliminación del BT a los 21 días para MBR-MH, 42 y 49 días para CAS-E y CAS-M, respectivamente. El 5-toliltriazol fue biodegradado en los tres tratamientos alrededor de los 7 días y el 4-toliltriazol independientemente de la concentración inicial y del inóculo, su concentración permaneció constante, aun después de 49 días de tratamiento. Esto muestra que la persistencia del BT y sus derivados depende del inóculo, así como de la estructura química del compuesto. En sus resultados reportaron velocidades de biodegradación para el BT y 5-toliltriazol de 0.52 a 1.00 mg/L d y de 1.9 a 4.5 mg/L d, respectivamente, dependiendo del lodo utilizado y mostraron un efecto de aclimatación del lodo al BT, permitiendo una rápida eliminación del compuesto después de 49 días de aclimatación en los 7 días siguientes. Sin embargo, los autores no reportaron datos de los productos finales obtenidos, ni de las rutas respiratorias y/o cepas involucradas en la transformación de estos contaminantes. En el estudio de Liu *et al.* (2011) bajo condiciones aerobias, se reportó que el BT fue el más recalcitrante comparado con el 5-metilbenzotriazol y el 5-clorobenzotriazol, obteniendo la constante cinética más baja de 0.0061 mg/L d. Utilizando lodos activados en experimentos en lote cuando se investigó el BT, clorobenzotriazol y xilitriazol, se reportó que el BT tuvo la constante cinética de biodegradación más baja ( $K = 0.38 \text{ d}^{-1}$ ) y el valor más alto de vida media (44 h) (Mazioti *et al.*, 2015a). De acuerdo con diferentes

estudios, el BT parece ser uno de los compuestos más recalcitrantes de los BTs en cuerpos acuáticos y en los procesos de tratamiento de aguas residuales (Reemtsma *et al.*, 2010; Loi *et al.*, 2013; Matamoros *et al.*, 2017; Chung *et al.*, 2018).

Aunque se han reportado eficiencias y velocidades de eliminación del BT obtenidas en plantas de tratamiento de aguas residuales o experimentos de laboratorio, se sabe poco sobre las vías metabólicas implicadas en la biodegradación de BT. Además, se sabe que su biotransformación puede generar una amplia variedad de intermediarios que pueden ser más tóxicos y recalcitrantes (Liu *et al.*, 2011; Huntscha *et al.*, 2014; Mazioti *et al.*, 2017; Kowalska *et al.*, 2019) por lo cual está claro que se requieren más estudios e investigaciones para una mejor comprensión de los procesos biológicos de degradación en los sistemas acuáticos, el rol de los microorganismos y la contribución de las bacterias nitrificantes en la biotransformación de los EOCs como el BT.

### 1.2.3 Efecto del benzotriazol en la nitrificación

Se ha reportado que compuestos nitrogenados heterocíclicos, como el BT inhiben la nitrificación en suelos. Dependiendo de la concentración de BT (0.01 a 0.5  $\mu\text{mol/g}$  de suelo) y del tipo de suelo, la inhibición sobre el proceso nitrificante varió desde un 12 a un 90% en términos de disminución en la formación de nitrito + nitrato (McCarty y Bremner, 1989). En el tratamiento de aguas residuales, a nivel de laboratorio, se ha reportado que la adición de BT (1 mg/L) tuvo efectos sobre el proceso nitrificante (sistema de un filtro de goteo nitrificante), provocando una disminución en la eficiencia de consumo de amonio cerca del 82% sin acumulación de nitrito, siendo el nitrato el producto final (Mai *et al.*, 2016). También se ha reportado el efecto inhibitorio del BT (5 mg/L) sobre la actividad de un lodo con respiración nitrificante fisiológicamente estable en un reactor SBR, evidenciando durante el primer ciclo de exposición al BT, una disminución del 58 y 62% en la velocidad específica de consumo de amonio y de formación de nitrato respectivamente (Aceves Zamora, 2017). Por otro lado, en cultivos nitrificantes en lote, la presencia de BT (2.5 a 10 mg BT/L) afectó el proceso amonio oxidante, disminuyendo la eficiencia de consumo de amonio de 12 a 24% y mostrando una



inhibición en la velocidad específica de consumo de amonio del 45% con 10 mg BT/L (Maturano Carrera, 2018). Los estudios sobre el BT en el tratamiento de aguas son recientes, por lo cual las investigaciones que hay acerca de su efecto sobre el proceso nitrificante o el proceso respiratorio de las bacterias nitrificantes son todavía escasas. Por lo tanto, es necesario ampliar la investigación en ese tema para entender mejor cómo el BT puede afectar el proceso biológico de nitrificación tanto en su eficiencia de eliminación de amonio, en sus rendimientos de nitrito y nitrato, así como en las velocidades específicas de los procesos amonio y nitrito oxidantes.

### 1.3 Transformación de EOCs por cometabolismo

Como se mencionó anteriormente, los EOCs son compuestos recalcitrantes que están presentes en concentraciones traza, por lo cual es posible que no puedan ser usados como única fuente de carbono y energía para el metabolismo y crecimiento microbiano, así como la inducción de enzimas responsables para su transformación. Debido a esto, el cometabolismo ha sido reportado como el proceso para la biodegradación de los EOCs (Nzila, 2013; Tran *et al.*, 2013; Mazioti *et al.*, 2015b). El cometabolismo es definido como la transformación de un sustrato de no crecimiento en la presencia obligatoria de un sustrato de crecimiento u otra fuente de energía (Dalton y Stirling, 1982; Nzila, *et al.*, 2013). Así la capacidad cometabólica de los microorganismos puede ayudar a la biotransformación de contaminantes recalcitrantes que no pueden ser usados como sustratos de crecimiento. En años recientes, la contribución del cometabolismo a la biotransformación de los EOCs ha sido ampliamente investigada y representa una oportunidad para estrategias de biorremediación (Tran *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2019). Por ejemplo, Yuan *et al.* (2014) estudiaron la biodegradación aerobia del 5-metilbenzotriazol (20 mg/L) usando lodos activados de plantas de tratamiento y observaron que la eliminación del EOC aumentó del 60 al 100% en solo 10 días al utilizar un medio mineral adicionado con nutrientes (carbono y nitrógeno) a diferencia del medio que no tenía los nutrientes. Esto indica que el suministro de nutrientes aumentó la eficiencia en un 40% de la biodegradación cometabólica del 5-metilbenzotriazol por los lodos. Herzog *et al.* (2014) reportaron que el BT (5 mg/L) utilizado como única fuente de energía con tres diferentes lodos activados presentó eficiencias de eliminación menores del 30% en 50 d y que la adición de un

sustrato fácilmente degradable usado como fuente de nitrógeno ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) y/o carbono (acetato de sodio) al medio de cultivo resultó en el incremento de la eficiencia de biodegradación del BT a 100%. De igual forma, Mazioti *et al.* (2015a) reportaron que la adición de un sustrato orgánico fácilmente degradable resultó en el incremento de la biodegradación cometabólica de BT por un lodo activado. Sin embargo, en estos estudios previos, el proceso respiratorio de los microorganismos involucrados no fue aclarado.

En la mayoría de los estudios donde se investigó acerca del rol del proceso de nitrificación en la biodegradación de EOCs, se utilizaron lodos activados provenientes de plantas de tratamiento de aguas residuales, mostrando que estaba involucrado el metabolismo y cometabolismo de los contaminantes por los microorganismos heterótrofos, dificultando la evaluación de la participación de las bacterias nitrificantes en la biotransformación de los EOCs (Tran *et al.*, 2013; Men *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2019). Hoy en día, se sabe poco sobre la biotransformación del BT por lodos nitrificantes estabilizados y se necesita más investigaciones e información para comprender mejor la contribución de las diversas rutas cometabólicas autótrofas y heterótrofas en lodos nitrificantes en la biotransformación del BT.

### **1.3.1 Papel de las AOB en la transformación cometabólica de contaminantes recalcitrantes**

En varios estudios, se propuso que la biotransformación cometabólica de los microcontaminantes estuvo asociada a la actividad nitrificante, siendo el amonio la fuente principal de energía para las bacterias amonio oxidantes pero la información al respecto es aún limitada (Arp *et al.*, 2001; Yi *et al.*, 2007; Roh *et al.*, 2009; Khunjar *et al.*, 2011; Helbling *et al.*, 2012; Tran *et al.*, 2013). Las AOB han sido estudiadas por sus capacidades cometabólicas para biotransformar varios contaminantes incluyendo a los EOCs (Roh *et al.*, 2009; Margot *et al.*, 2016). Esto puede ser explotado para aumentar la biodegradación de EOCs en el tratamiento de aguas residuales usando lodos nitrificantes enriquecidos y/o incrementando la disponibilidad de amonio como fuente de energía (Tran *et al.*, 2009; Fernandez-Fontaina *et al.*, 2012; Mai *et al.*, 2016). Una correlación positiva ha sido reportada entre la velocidad de

oxidación de amonio y la velocidad de eliminación de diferentes EOCs (Fernandez-Fontaina *et al.*, 2012; Tran *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2019). En algunos casos, el cometabolismo de los contaminantes por las AOB fue asociado con la capacidad de la enzima AMO, primera enzima involucrada en el proceso de la nitrificación, para biotransformar los contaminantes (Tran *et al.*, 2009; Dorival-García *et al.*, 2013; Martínez-Jardinez *et al.*, 2018). Fernandez-Fontaina *et al.* (2012) han reportado altas eficiencias de biodegradación de diferentes productos farmacéuticos y de cuidado personal con lodos activados nitrificantes y trabajando con altas tasas de carga de nitrógeno ( $> 1 \text{ g N-NH}_4^+/\text{g SSV d}$ ), propiciando así la actividad nitrificante de la biomasa. Según los mismos autores, la biodegradación por cometabolismo de estos contaminantes puede ser la responsable de la eliminación de la mayoría de los compuestos debido a la acción de la enzima amonio monooxigenasa.

Actualmente, el interés en usar consorcios microbianos con actividad nitrificante para la eliminación simultánea de amonio y compuestos recalcitrantes, incluyendo a los EOCs, es creciente (Tran *et al.*, 2013; Margot *et al.*, 2016; Salas *et al.*, 2017). Dos enfoques de estudios a nivel de laboratorio han sido principalmente utilizados para corroborar la importancia de microorganismos amonio oxidantes para la biotransformación/biodegradación de EOCs:

- i. estudios sobre la capacidad de biotransformación de cultivos puros amonio oxidantes (Shi *et al.*, 2004).
- ii. estudios de la biotransformación de EOCs en lodos activados nitrificantes provenientes de plantas de tratamiento de aguas y tratados con inhibidores de la amonio oxidación (Men *et al.*, 2017).

Por lo anterior, en varios estudios con lodos activados enriquecidos con bacterias amonio oxidantes, se ha investigado el papel que juegan en la eliminación de microcontaminantes inhibiendo selectivamente la enzima AMO con alitiourea (ATU). Se ha informado que una amplia gama de microcontaminantes se elimina mejor con la enzima AMO activa (usualmente  $> 70\%$  de eliminación) que con la AMO inhibida ( $< 40\%$  de eliminación) (Margot *et al.*, 2016). Algunos de los EOCs eliminados son productos farmacéuticos y estrógenos sintéticos como el

bisfenol A, nonilfenol, triclosan y edulcorantes artificiales, sugiriendo así que la AMO está involucrada en la degradación de estos compuestos (Tran *et al.*, 2013; Margot *et al.*, 2016).

Sin embargo, la información es escasa sobre la capacidad de lodos con una respiración nitrificante estable para biotransformar EOCs. Además, los trabajos son todavía limitados al estudio de productos farmacéuticos y de cuidado personal y muy poco se sabe acerca de EOCs como el BT y sus derivados. Hace falta investigación de tipo fisiológica y cinética del metabolismo y cometabolismo de EOCs como el BT por lodos nitrificantes para tener mayor conocimiento básico y propuestas de tratamiento para efluentes contaminados con amonio y EOCs como el benzotriazol.

### **1.4 Reactor de lotes secuenciados (SBR)**

Los reactores de lotes secuenciados (SBR) se han utilizado ampliamente como una tecnología eficiente para el tratamiento de aguas residuales municipales e industriales (Soliman y Eldyasti, 2018). Se define como un sistema discontinuo en el cual el proceso biológico y la fase de sedimentación ocurren en un tanque único. El SBR es operado mediante ciclos consecutivos, cada ciclo consta de las siguientes etapas:

1) Llenado del tanque: en un tanque con biomasa se añade el agua a tratar, la biomasa se queda en el tanque desde el primer ciclo la cual sirve como inóculo para el posterior ciclo. El modo de llenado se puede mantener aireado o no aireado dependiendo de las características del agua residual. La longitud del período de llenado depende del número de tanques, el volumen de los SBR y el caudal del efluente. Por lo general, el periodo tiene una duración de 25% del tiempo del ciclo completo.

2) Reacción biológica: durante esta fase de reacción, el flujo de las aguas residuales en el tanque se restringe, hay aireación y mezclado continuo. Los procesos biológicos de eliminación de sustratos inician durante el llenado y se terminan durante la fase de reacción. El tiempo de reacción puede superar el 50% del tiempo total del ciclo. El tratamiento puede ser aerobio,

anaerobio o con fases alternadas de condiciones anóxicas y aerobias. Altas concentraciones de microorganismos pueden reducir significativamente el tiempo de esta fase.

3) Sedimentación: durante esta fase, se detienen la agitación y la aireación sin ninguna entrada o salida de líquido. Estas condiciones dan lugar a la separación sólido-líquido por sedimentación. Este período tiene una duración del 15% del tiempo del ciclo.

4) Drenado: después de la fase de sedimentación, el sobrenadante clarificado se descarga del reactor como efluente. El drenado debe ser diseñado y operado de manera que se limite la pérdida de biomasa del tanque. El tiempo dedicado al drenado puede variar desde 5 a 30% del tiempo total del ciclo (Coelho *et al.*, 2000; Dutta y Sudipta, 2015; Jaramillo *et al.*, 2018).

La utilización del SBR se debe al bajo costo de operación, fácil automatización, la gran flexibilidad de operación, ahorro en espacio y mantenimiento, además, se pueden operar a tiempos largos de retención celular (Silva Luna, 2011). Dependiendo de las necesidades del tipo de agua residual, la duración de la fase aerobia o anóxica en cada ciclo puede variar (Soliman y Eldyasti, 2018).

Por otra parte, en la literatura, se pueden encontrar estudios que involucran la eliminación de amonio y compuestos orgánicos recalcitrantes en sistemas SBR (Texier y Gomez, 2007; Collado *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2014; Martínez-Jardines *et al.*, 2018). Por ejemplo, Texier y Gomez (2007) observaron la oxidación de *p*-cresol (25-150 mg/L) en un reactor SBR nitrificante después de cinco ciclos de operación, obteniendo una completa oxidación del amonio hasta nitrato y el consumo del *p*-cresol. En el trabajo de Collado *et al.* (2013), se utilizó un lodo activado proveniente de una planta de tratamiento de aguas residuales en un reactor SBR con una alimentación de un agua residual sintética para la eliminación de 50 µg/L de sulfametoxazol. Los autores no observaron cambios en la eliminación de COD y N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> cuando se agregó sulfametoxazol (65 días de tratamiento) manteniéndose por arriba del 95%, la acumulación de nitrito fue despreciable (< 0.28 mg N-NO<sub>2</sub>/L durante todo el tratamiento) y la concentración de nitrato en el efluente antes y después de agregar el sulfametoxazol fue de

9.1 y 3.7%, respectivamente. La eficiencia de eliminación promedio de sulfametoxazol durante todo el tratamiento fue del  $36.5 \pm 11.5\%$ . Silva *et al.* (2014) en un sistema SBR observaron que un consorcio nitrificante fue capaz de oxidar amonio a nitrato y *p*-cresol (25-200 mg C/L) simultáneamente, obteniendo eficiencias de consumo de  $99.0\% \pm 0.5$  y rendimientos de  $0.98 \pm 0.07$  g N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/g N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> consumido. Además, los autores observaron un incremento en las velocidades de los procesos biológicos de nitrificación y oxidación del *p*-cresol a lo largo de los ciclos de operación, evidenciando la adaptación metabólica del lodo en el sistema SBR. Li *et al.* (2020) usando un lodo nitrificante en un biorreactor (con fases anaerobia y aerobia) al tratar simultáneamente amonio y *p*-nitrofenol (200 mg N/L y 10 mg/L, respectivamente) en 80 días de tratamiento, reportaron la eliminación cometabólica del *p*-nitrofenol (eficiencia de eliminación del 99.9%). Además, la presencia del *p*-nitrofenol no afectó la eficiencia de eliminación de amonio la cual se mantuvo por arriba del 99%. Sin embargo, al tratarse de un sistema anaerobio-aerobio el destino final del N no se informa y los datos de nitrito y nitrato fluctuaron durante todo el tratamiento.

Así el uso del reactor SBR a nivel del laboratorio permite desarrollar estudios cinéticos de los procesos biológicos y de inhibición a través de los ciclos de operación y bajo condiciones controladas, permitiéndonos la comprensión del comportamiento fisiológico y cinético de lodos nitrificantes en la oxidación del amonio y compuestos orgánicos recalcitrantes. Sin embargo, en muchos trabajos solo se reportan eficiencias de eliminación de los contaminantes, no siempre se reportan rendimientos de producción de nitrito y nitrato, por lo cual no se puede conocer si el proceso nitrificante se llevó a cabo de manera completa. Pocas veces se reportan las velocidades específicas de consumo de amonio (sustrato principal) y de los EOCs, ni las velocidades específicas de producción de nitrato.

### 2 Justificación

La presencia de compuestos orgánicos emergentes como el benzotriazol en los efluentes de las plantas de tratamiento de agua residual es alarmante. Los procesos biológicos involucrados no tienen siempre la capacidad de biotransformar estos contaminantes recalcitrantes. Los estudios que actualmente se realizan son acerca de la eficiencia de biodegradación de los compuestos orgánicos emergentes, pero hay poca información acerca de datos fisiológicos y cinéticos sobre su transformación. Por otra parte, la capacidad cometabólica de las bacterias amonio oxidantes para biotransformar compuestos recalcitrantes ha sido evaluada para proponer alternativas de tratamiento biológico de efluentes contaminados con amonio y EOCs. Sin embargo, la información sobre la biotransformación cometabólica del benzotriazol es todavía muy escasa. Debido a esto se ve la necesidad de realizar estudios sobre la cinética y fisiología de biotransformación de benzotriazol por consorcios nitrificantes, así como evaluar su desempeño en reactores biológicos. La información obtenida sería de gran utilidad para entender mejor cómo se degrada el benzotriazol bajo condiciones nitrificantes.

### 3 Hipótesis

Bajo condiciones nitrificantes, se podrá biotransformar el benzotriazol, favoreciendo su eliminación por cometabolismo en un reactor de lotes secuenciados.

### 4 Objetivos

#### 4.1 Objetivo general

Evaluar la biotransformación del benzotriazol bajo condiciones nitrificantes a través de información fisiológica y cinética en cultivos en lote secuenciado.

#### 4.2 Objetivos específicos

- ➡ Estudiar fisiológica y cinéticamente la oxidación del benzotriazol y amonio en cultivos nitrificantes en lote.
- ➡ Evaluar la capacidad cometabólica de las bacterias amonio oxidantes en la biotransformación del benzotriazol.
- ➡ Evaluar la biotransformación del benzotriazol en un reactor SBR operando bajo condiciones nitrificantes con concentraciones crecientes de amonio.



### 5 Materiales y métodos

#### 5.1 Obtención del consorcio nitrificante en estado fisiológico estacionario

Se utilizó un lodo nitrificante metabólicamente estable como inóculo para los cultivos en lote y el reactor de lotes secuenciados. De acuerdo con la metodología propuesta por Silva Luna (2011), se operó un reactor nitrificante en continuo de tanque agitado (Microferm Fermentor, New Brunswick Scientific, mod. MF-114) con un volumen nominal de 10 L y un volumen de operación de 6 L (Figura 1). El reactor se operó a temperatura ambiente bajo las siguientes condiciones: una agitación de 200 rpm, una aireación constante, una concentración de oxígeno disuelto (OD) promedio de  $4.0 \pm 0.5$  mg/L, un tiempo de residencia hidráulico (TRH) de 3.3 d y un valor de pH de  $7.5 \pm 0.5$  (ajustado con soluciones diluidas de HCl o NaOH). El efluente del reactor se bombeó (Master-Flex, Cole Palmer) a un sedimentador acoplado al reactor. De la parte inferior del sedimentador la biomasa fue recirculada hacia el tanque agitado mediante una bomba (Master-Flex, Cole Palmer), mientras que el efluente clarificado se recolectó de la parte superior. La concentración de biomasa fue mantenida en  $491 \pm 35$  mg de proteína microbiana/L (equivalente a  $2.0 \pm 0.1$  g sólidos suspendidos volátiles (SSV/L)).

La alimentación del reactor en continuo se hizo mediante dos medios de cultivo utilizados como fuentes de nitrógeno y carbono (Tabla 4), suministrados por separado mediante una bomba peristáltica (Master-Flex, Cole-Parmer) para evitar la posible cristalización de sales. Los flujos de alimentación para la fuente de nitrógeno y carbono fueron 0.93 y 0.93 L/d, respectivamente. Las bombas peristálticas fueron controladas por un temporizador, permitiendo su encendido durante 30 s cada 15 min. De acuerdo con la composición de los medios de cultivo, la relación másica C/N fue de 2 y la velocidad de carga de  $166.9 \pm 6.1$  mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L d.

Con el fin de evaluar el desempeño del reactor nitrificante continuo, se determinó regularmente la velocidad volumétrica de carga de amonio y la velocidad volumétrica de descarga de amonio, nitrito y nitrato del efluente, así como la concentración en proteína microbiana en el tanque. A partir de los valores promedio de las velocidades de carga ( $Q_E$  N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> alimentado/volumen tiempo) y descarga ( $Q_S$  N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>,  $Q_S$  N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>,  $Q_S$  N-BM, mg N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, N-BM formada/volumen tiempo), se estableció el balance de nitrógeno. Las variables de

## Biotransformación del benzotriazol bajo condiciones nitrificantes

respuesta usadas para evaluar el proceso respiratorio nitrificante del lodo fueron: eficiencias de consumo de amonio ( $E_{NH_4^+}$ , %,  $(mg\ N-NH_4^+ \text{ consumido}/mg\ N-NH_4^+ \text{ inicial}) \times 100$ ), rendimientos de nitrito, nitrato y biomasa ( $Y_{NO_2^-}$ ,  $Y_{NO_3^-}$ ,  $Y_{BM}$ ,  $mg\ N-NO_2^-$ ,  $N-NO_3^-$  o N-biomasa formada/ $mg\ N-NH_4^+$  consumido).

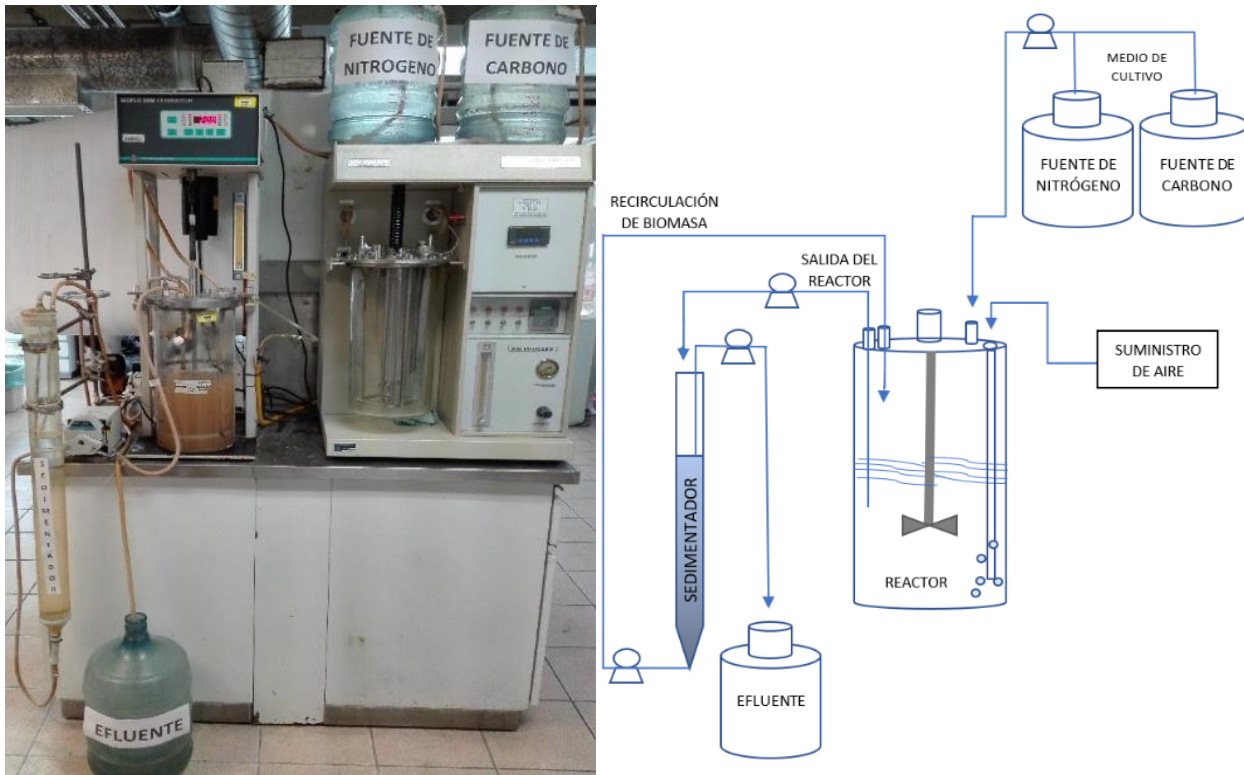


Figura 1. Reactor nitrificante continuo usado como fuente de inóculo.

Tabla 4. Composición del medio de cultivo del reactor nitrificante continuo.

Fuente de nitrógeno	Concentración (g/L)	Fuente de carbono	Concentración (g/L)
$(NH_4)_2SO_4$	2.4	$NaHCO_3$	14.0
$NH_4Cl$	1.9	$CaCl_2$	0.05
$KH_2PO_4$	2.45		
$MgSO_4$	0.54		
$NaCl$	0.87		

## 5.2 Cultivos nitrificantes en lote

Se utilizó un sistema de cultivo en lote en botellas serológicas, con un volumen nominal de 500 mL y un volumen de trabajo de 100 mL, para realizar las cinéticas correspondientes. Se utilizó un medio de cultivo con una fuente de carbono y de nitrógeno (Tabla 5), manteniendo una C/N de 2.5 y una concentración inicial de 100 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L. Se realizaron también ensayos con concentraciones iniciales de amonio de 200 y 300 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L.

Tabla 5. Composición del medio de cultivo nitrificante en lote.

Fuente de nitrógeno	Concentración (g/L)	Fuente de carbono	Concentración (g/L)
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.95	NaHCO <sub>3</sub>	7.00
NH <sub>4</sub> Cl	0.77	CaCl <sub>2</sub>	0.04
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.12		
MgSO <sub>4</sub>	0.80		
NaCl	0.80		

La fase líquida de las botellas serológicas se burbujeó durante 3 minutos con oxígeno puro (99.9%, Praxair, México). Se inocularon con 259 ± 16 mg proteína microbiana/L (1.1 ± 0.1 g SSV/L) de lodo proveniente del reactor nitrificante continuo en estado estacionario. Posteriormente, fueron selladas con tapones de goma y anillos de aluminio. Nuevamente se inyectó oxígeno en el espacio de cabeza de 400 mL (3 min). El benzotriazol (Sigma-Aldrich, CAS. 95-14-7) fue agregado al medio de cultivo a una concentración inicial de 5.09 ± 0.04 mg/L. Cada cultivo en lote se llevó a cabo por duplicado bajo las siguientes condiciones: incubación a 200 rpm y 30 °C de temperatura con un valor inicial de pH de 8.0 ± 0.1. Cada botella serológica fue sacrificada a un determinado tiempo de incubación para establecer las cinéticas del proceso de nitrificación y de biotransformación del BT. Los diferentes tiempos de cultivo fueron los siguientes: 0, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 16, 24 h, y 2, 3, 4, 5, 6, 14, 21, 28, 35, 42, 49 días. Las muestras de la suspensión microbiana fueron centrifugadas (9500 g, 3 min), filtradas (0.2 µm) y analizadas para cuantificar amonio, nitrito, nitrato y BT. Los perfiles cinéticos de consumo/producción de amonio, nitrito, nitrato y BT fueron obtenidos.

## Biotransformación del benzotriazol bajo condiciones nitrificantes

---

Las variables de respuesta usadas para evaluar el proceso respiratorio nitrificante del lodo y su capacidad de biotransformación de BT fueron: eficiencias de consumo de amonio y BT ( $E_{NH_4^+}$ ,  $E_{BT}$ , %, (mg sustrato consumido/mg sustrato inicial) x 100), rendimientos de nitrógeno y biomasa ( $Y_{NO_2^-}$ ,  $Y_{NO_3^-}$ ,  $Y_{BM}$ , mg N- $NO_2^-$ , N- $NO_3^-$  o N-biomasa formada/mg N- $NH_4^+$  consumido), velocidad específica de consumo de amonio ( $q_{NH_4^+}$ , mg N- $NH_4^+$  consumido/mg proteína microbiana d), velocidad específica de producción de nitrato ( $q_{NO_3^-}$ , mg N- $NO_3^-$  producido/mg proteína microbiana d) y fases lag y velocidad específica de consumo de BT ( $\lambda_{BT}$ , d;  $q_{BT}$ , mg BT consumido/g proteína microbiana d). La variable de respuesta cinética para el proceso respiratorio amonio oxidante de las AOB fue la  $q_{NH_4^+}$ , mientras que  $q_{NO_3^-}$  fue la variable de respuesta cinética del proceso respiratorio nitrito oxidante de las NOB.

Se realizaron los siguientes ensayos control:

- ☉ Cultivos abióticos control con biomasa esterilizada (120 °C por 15 min) con  $268 \pm 20$  mg de proteína microbiana/L, medio mineral ( $86.0 \pm 2.4$  mg N- $NH_4^+$ /L) y BT ( $4.94 \pm 0.12$  mg/L), para descartar la posible adsorción del amonio y benzotriazol sobre la biomasa microbiana o en alguna parte del sistema experimental.
- ☉ Cultivos abióticos sin biomasa, medio mineral ( $73.2 \pm 1.5$  mg N- $NH_4^+$ /L) y BT ( $5.24 \pm 0.05$  mg/L), para descartar la posible pérdida de amonio y BT del sistema experimental por reacción química con los componentes del medio de cultivo o volatilización.
- ☉ Cultivos nitrificantes de referencia con lodo a  $257 \pm 7$  mg de proteína microbiana/L, medio mineral a diferentes concentraciones iniciales de amonio ( $104.0 \pm 2.1$ ,  $201.0 \pm 4.7$  y  $328.2 \pm 0.1$  mg N- $NH_4^+$ /L) sin benzotriazol, para evaluar el proceso respiratorio nitrificante del lodo en ausencia del BT bajo las condiciones experimentales establecidas. Durante todo el período de experimentación, los cultivos nitrificantes de referencia se realizaron de forma concomitante con los ensayos realizados bajo diferentes condiciones experimentales.

### 5.2.1 Evaluación de la biotransformación del BT en cultivos nitrificantes en lote

Cinco series de experimentos fueron llevados a cabo en presencia o ausencia de 5 mg/L de BT (Tabla 6):

- 1) Cultivo con lodo nitrificante, medio mineral sin N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y con BT.
- 2) Cultivo con lodo nitrificante, medio mineral con concentraciones crecientes de amonio (100 a 300 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L) y benzotriazol.
- 3) Cultivo con lodo nitrificante, medio mineral con amonio (300 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L) en presencia de 50 mg/L de aliltiourea (ATU, Sigma-Aldrich CAS. 109-57-9) utilizado como inhibidor selectivo de la enzima AMO (Silva *et al.*, 2009).
- 4) Cultivo con lodo nitrificante, medio mineral con amonio (300 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L) y BT en presencia de aliltiourea.
- 5) Cultivo con lodo nitrificante, medio mineral con amonio (300 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L), BT y 200 mg C-acetato/L.

Tabla 6. Condiciones experimentales usadas para la evaluación de la biotransformación del BT en cultivos nitrificantes en lote.

Ensayos en lote	Cnc. inicial NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg N/L)	Cnc. inicial BT (mg/L)	Aliltiourea (mg/L)	Acetato (mg C/L)
1) Sin amonio	-	5.14 ± 0.05	-	-
2) Con amonio	104.0 ± 2.1	5.11 ± 0.02	-	-
	201.0 ± 4.7	5.09 ± 0.05		
	328.2 ± 0.1	5.04 ± 0.01		
3) Con inhibidor de la AMO	322.2 ± 5.3	-	50	-
4) Con inhibidor de la AMO y BT	304.0 ± 3.8	5.07 ± 0.01	50	-
5) Con acetato	304.0 ± 3.8	5.07 ± 0.14	-	213.8 ± 2.5

### 5.2.2 Análisis estadístico

En todos los casos, las concentraciones iniciales de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, BT, acetato y proteína microbiana se reportaron como valores promedios ± desviación estándar de tres muestras independientes. Los ensayos por lotes se llevaron a cabo por duplicado. Se realizaron análisis ANOVA de una vía o de dos vías para obtener datos estadísticos de las eficiencias de consumo (E<sub>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></sub>, E<sub>BT</sub>) y rendimientos (Y<sub>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></sub> y Y<sub>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></sub>) de los diferentes ensayos experimentales. En todos los casos, los valores de E y Y obtenidos representan valores promedios ± desviación estándar, en donde la desviación estándar se calculó dividiendo el cuadrado medio de los residuos obtenido en el análisis ANOVA respectivo por las réplicas de cada media. Se calcularon las fases lag y las velocidades específicas de consumo/producción y sus errores estándar (que oscilan entre 0.01 y 1.14) con base en la media de concentración normalizada en cada tiempo de muestra mediante el uso del modelo de Gompertz ajustado (Martínez-Jardines *et al.*, 2018). Los coeficientes de determinación (r<sup>2</sup>) fueron superiores a 0.94. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software NCSS 2020 (Versión 20.0.3).

### 5.3 Reactor de lotes secuenciados (SBR)

Una vez realizados los ensayos en botellas serológicas, se utilizó un reactor de lotes secuenciados con el fin de evaluar la capacidad del lodo nitrificante para oxidar simultáneamente amonio y benzotriazol en un sistema dinámico. Las concentraciones para la eliminación simultánea de amonio y BT en el reactor se seleccionaron en función de los resultados obtenidos en los ensayos previos realizados en botellas serológicas y de la relación amonio/BT idónea (300 mg N/5 mg BT) para el consumo cometabólico del BT. Posteriormente, se aumentó la concentración inicial de amonio a 400 y 500 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L para propiciar la biotransformación del BT por cometabolismo de las bacterias amonio oxidantes en el sistema SBR.

El reactor SBR de volumen nominal de 3 L y con un volumen de trabajo de 2 L (Figura 2) se alimentó con un medio de cultivo con fuente de nitrógeno y fuente de carbono inorgánico como se muestra en la Tabla 7.

## Biotransformación del benzotriazol bajo condiciones nitrificantes

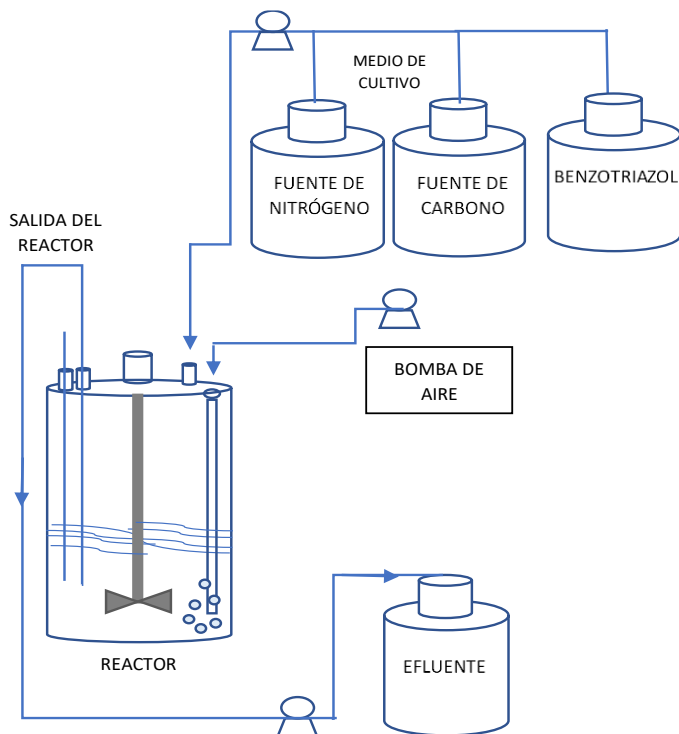


Figura 2. Reactor de lotes secuenciados (SBR) para cultivo nitrificante alimentado con amonio y benzotriazol.

Tabla 7. Composición del medio de cultivo en el reactor de lotes secuenciados (SBR).

Fuente de nitrógeno	Concentración (g/L)	Fuente de carbono	Concentración (g/L)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.21	$\text{NaHCO}_3$	16.6
$\text{NH}_4\text{Cl}$	1.84	$\text{CaCl}_2$	0.094
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1.99		
$\text{MgSO}_4$	1.41		
$\text{NaCl}$	1.41		

La operación del reactor se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones experimentales: el medio de cultivo se alimentó mediante una bomba peristáltica (Master-Flex, Cole-Palmer), la agitación se mantuvo a 200 rpm, la aireación fue constante suministrada por bombas de aire ( $3.7 \pm 0.4$  mg OD/L), la concentración inicial de biomasa nitrificante proveniente del reactor continuo fue de  $498 \pm 10$  mg proteína microbiana/L ( $2.0 \pm 0.1$  g SSV/L), el valor inicial de pH



## Biotransformación del benzotriazol bajo condiciones nitrificantes

de  $7.1 \pm 0.2$  y la temperatura ambiente. El porcentaje de recambio del medio de cultivo en cada ciclo en el SBR fue del 85%. El sobrenadante/efluente del reactor se bombeó por medio de una bomba peristáltica (Master-Flex, Cole Palmer). El ciclo de operación estuvo dividido en cuatro etapas: llenado (10 min), reacción aerobia (47 h o 35 d), sedimentación (40 min) y drenado (10 min). En una primera etapa, cada ciclo de operación duró 48 h (Tabla 8), se alimentó el reactor con amonio ( $300 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{L}$ ) para obtener un proceso nitrificante con alta eficiencia de consumo de amonio, alto rendimiento de conversión a nitrato y con estabilidad fisiológica. Se determinaron las velocidades de la nitrificación en el SBR en ausencia de BT como datos de referencia. Posteriormente en una segunda etapa, cada ciclo de operación duró 35 d y el reactor SBR se alimentó con benzotriazol ( $5.39 \pm 0.14 \text{ mg/L}$ ) y concentraciones crecientes de amonio (300 a  $500 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{L}$ ) (Tabla 8).

Se tomaron muestras a diferentes tiempos dentro de un mismo ciclo de operación para establecer las cinéticas del proceso nitrificante correspondiente y del consumo de BT. Se calcularon las mismas variables de respuesta usadas en los cultivos en botellas serológicas (sección 6.2) como eficiencias de consumo, rendimientos de productos, velocidades específicas de consumo y de producción. En todos los casos, se determinaron estas variables para los compuestos nitrogenados (amonio, nitrito, nitrato) y carbonados (benzotriazol, biomasa microbiana).

Tabla 8. Condiciones experimentales usadas para la evaluación de la biotransformación del BT en el reactor SBR.

Cnc. inicial de amonio (mg N/L)	Cnc. inicial de BT (mg/L)	Número de ciclos	Duración de ciclo (d)
$301.0 \pm 7.2$	-	1-14	2
$300.8 \pm 5.7$	$5.39 \pm 0.14$	15-20	35
$425.0 \pm 0$	$5.39 \pm 0.14$	21	35
$495.0 \pm 0$	$5.39 \pm 0.14$	22-25	35



## 5.4 Métodos analíticos

### 5.4.1 Proteína microbiana (método de Lowry modificado)

La concentración de proteína fue determinada por el método colorimétrico de Lowry modificado (Lowry *et al.*, 1951; Martínez *et al.*, 2000). Para determinar el rendimiento de la biomasa fue considerado que el 16% de la proteína microbiana es nitrógeno (Bailey y Ollis, 1986). En cada serie de muestras analizadas, se preparó una curva de calibración de albúmina (Sigma, 96-99%) de 0, 100, 200, 300, 400, 500 y 600 mg/L (Figura 3). Las muestras y los estándares recibieron el mismo tratamiento. Se tomó 1 mL de muestra y se colocó en tubos de ensaye con tapa de rosca de 10 mL. Se adicionó 0.1 mL de NaOH (10 N). Posterior a la agitación mediante un vórtex, se calentaron los tubos por 20 min a 90 °C en un baño seco. Se prepararon tres soluciones: (a) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.19 M en NaOH 0.1 N, (b) CuSO<sub>4</sub> al 1% y (c) tartrato de sodio y potasio al 2%. Se preparó una solución de trabajo (1 mL solución (b) + 1 mL de solución (c) + 48 mL de solución (a)) que fue posteriormente adicionada a cada tubo (5 mL). Se dejaron reposar los tubos por 30 min en la oscuridad. Posteriormente, se agregó 1 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu, dejando reposar nuevamente en la oscuridad por 1 h, para finalmente medir la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro UV/VIS (Shimadzu, modelo UV-1601). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

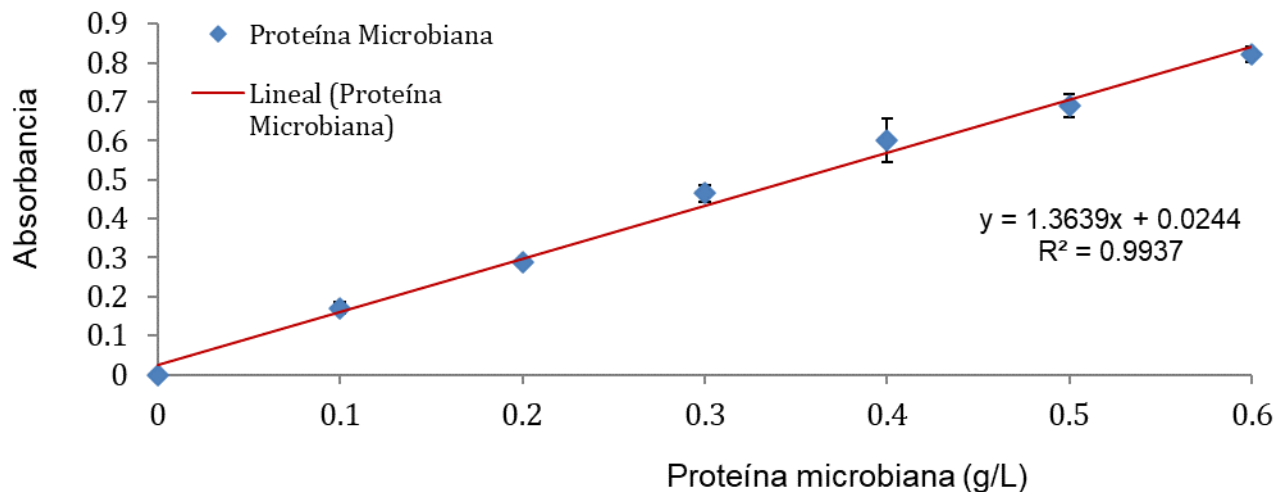


Figura 3. Ejemplo de una curva de calibración para la cuantificación de proteína microbiana.

### 5.4.2 Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV)

Para cuantificar los SSV se utilizó el método 2540 E de la APHA (1998). Los SSV son aquellos que se volatilizan a una temperatura de 520 °C. Si los sólidos totales o se someten a combustión bajo una temperatura de 520 °C durante un tiempo determinado, la materia orgánica se convierte a CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O. Esta pérdida de peso se interpreta en términos de materia orgánica o volátil. Se coloca una cápsula de porcelana por duplicado limpia en una mufla a ignición a 520 °C por 1 hora. Se enfría y guarda la cápsula en un desecador hasta ser utilizada. La cápsula se pesa inmediatamente antes de usar; se agregan 10 mL de la muestra y se deja a 103 – 105 °C en una mufla durante 1 día (sólidos suspendidos fijos, SSF). Se deja enfriar la cápsula en el desecador y se pesa nuevamente; después se somete a ignición el residuo obtenido hasta obtener peso constante en una mufla a 520 °C durante 60 min. Se deja enfriar la cápsula parcialmente en el aire hasta que la mayor parte del calor se haya disipado y se deja en el desecador para enfriamiento total. El contenido de sólidos suspendidos volátiles se calcula de la siguiente ecuación:

$$mg \text{ SSV/L} = \frac{(A-B)*1000}{V} \quad \text{Ec. 5}$$

$$mg \text{ SSF/L} = \frac{(B-C)*1000}{V} \quad \text{Ec. 6}$$

Donde:

A = Peso del residuo + cápsula antes de la ignición (mg)

B = Peso del residuo + cápsula de evaporación después de la ignición (mg)

C = Peso de la capsula (mg)

V = Volumen tomado de la muestra (mL)

### 5.4.3 Amonio (electrodo selectivo)

Para cuantificar el amonio, se utilizó un electrodo selectivo de amoniaco (Phoenix Electrode Company, USA). Se construyó una curva de calibración con NH<sub>4</sub>Cl a concentraciones conocidas: 30, 60, 125, 250, 300 y 500 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L, a partir de la cual se determinó la

concentración de amonio en las muestras problema (Figura 4). La lectura del potencial generado por el electrodo se registró con un potenciómetro (Cole-Parmer). Se tomó un volumen de muestra de 50 mL y se alcalinizó con 0.5 mL de solución de NaOH (10N) para desprotonar el ion amonio formándose el amoniaco. Bajo agitación constante y temperatura ambiente, se tomó la lectura del potencial cuando fue estable (aproximadamente 3 min después de agregar la solución de NaOH).

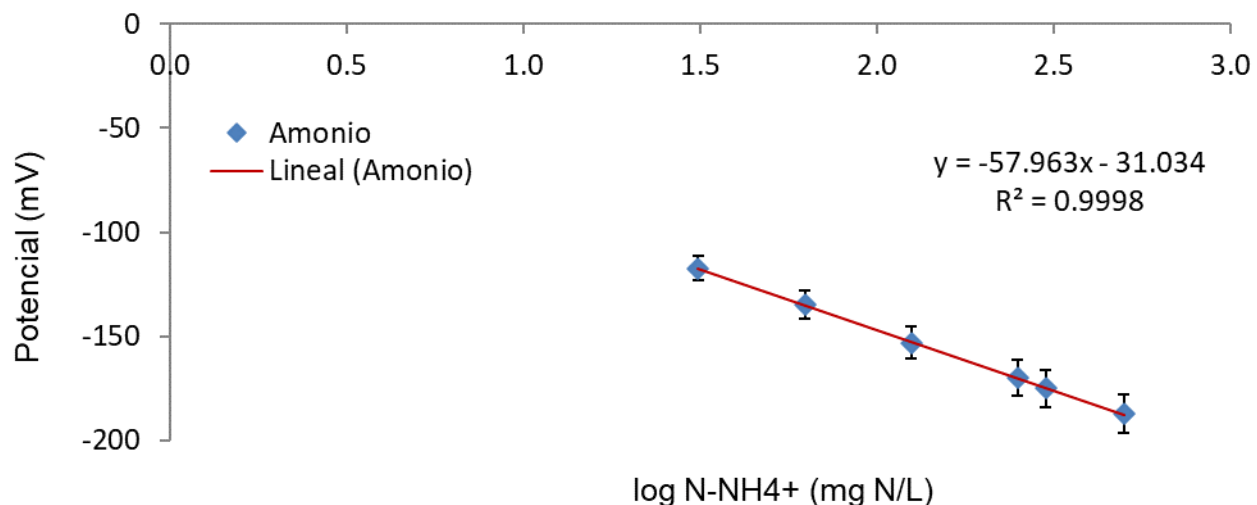


Figura 4. Ejemplo de una curva de calibración para la cuantificación de amonio.

### 5.4.4 Nitrito y nitrato (HPLC y CIA)

La cuantificación de nitrito y nitrato se realizó mediante dos métodos: por cromatografía de líquidos (HPLC) y electroforesis capilar. Para el primer caso, se utilizó un cromatógrafo de líquidos (HPLC, Perkin Elmer Series 200, USA) con una columna de intercambio iónico (Waters IC-Pak Anion HC, 4.6 x 150 mm, Waters, USA) y un detector UV-visible. La longitud de onda fue de 214 nm y el flujo de 2 mL/min. La fase móvil consistió en una mezcla de butanol, acetonitrilo y una solución concentrada de gluconato (20:120:20, v:v:v) diluidos con agua desionizada a un volumen de 1 L. La solución borato-gluconato fue preparada con 16 g de gluconato de sodio, 18 g de ácido bórico, 25 g de tetraborato decahidratado de sodio, 250 mL de glicerol y llevados a 1 L con agua desionizada. Se construyó una curva de calibración con soluciones estándares de N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> y N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> a las concentraciones de: 0, 10, 25, 50, 75 y 100 mg N/L (Figura 5).

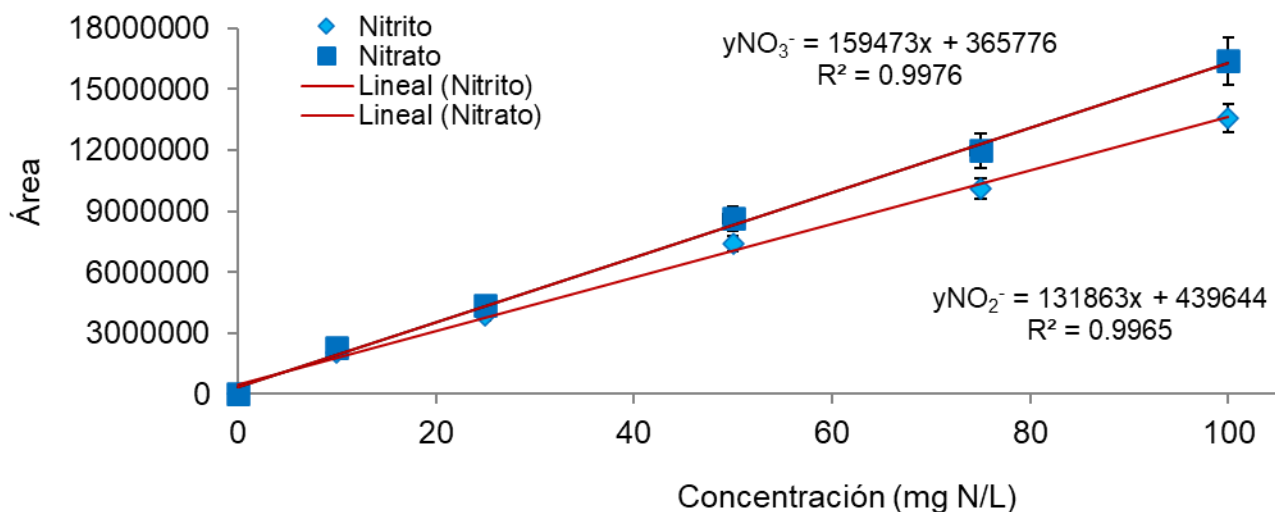


Figura 5. Ejemplo de una curva de calibración para la cuantificación de nitrito y nitrato (HPLC).

La electroforesis capilar se basa en la migración de los iones en solución bajo la influencia de un campo eléctrico, hacia el electrodo con la carga opuesta a ellos. La fuerza conductora de una partícula está relacionada con su carga y la intensidad del campo eléctrico aplicado, así como la composición del electrolito, el cual funciona como el medio de separación que proporciona una resistencia (Weinberger, 1993). Se utilizó un analizador capilar de iones (CIA) con un detector UV (arreglo de yoduros) y se trabajó a una longitud de onda de 240 nm. Las condiciones de operación fueron: voltaje de 25 KV, tiempo de corrida de 5 min y temperatura de 25 °C. El capilar utilizado tiene un recubrimiento de sílica fundida de 60 cm de largo y 75 µm de diámetro interno. El electrolito se preparó tomando 5 mL de las siguientes soluciones: sulfato de sodio anhidro (0.1 M), cloruro de sodio (10 mM) y CIA Pak OFM anion-BT (Waters), finalmente se llevó a un volumen de 50 mL con agua desionizada. Las muestras fueron filtradas por una membrana de nylon (0.2 µm) y se realizaron diluciones para que las muestras no superaran los 50 mg N/L al momento de ser analizadas. Para comprobar la linealidad del método, se construyeron curvas de calibración. Se construyó una curva de calibración con soluciones estándares de N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> y N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> a las concentraciones de: 5, 10, 20, 25, 30 y 50 mg N/L (Figura 6).

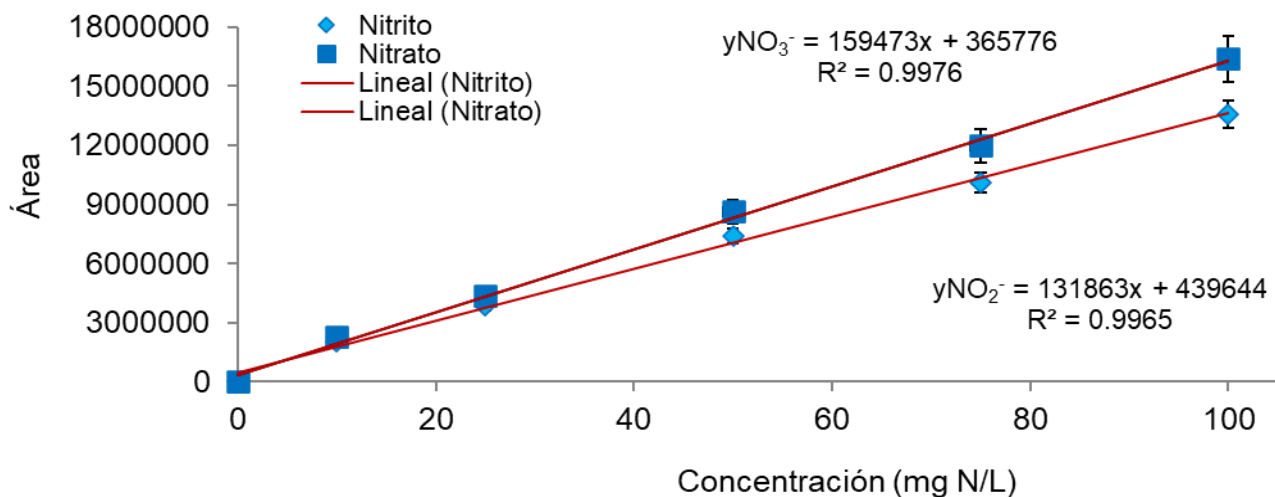


Figura 6. Ejemplo de una curva de calibración para la cuantificación de nitrito y nitrato (CIA).

#### 5.4.5 Benzotriazol (HPLC)

Para la determinación de la concentración de benzotriazol, se utilizó un cromatógrafo de líquidos (HPLC, Perkin Elmer Series 200, USA) usando una columna C18 (Bond-clone, 3.9 x 300 mm, Phenomenex, USA) y un detector UV-visible. La longitud de onda fue de 274 nm y el flujo de 1 mL/min. La fase móvil consistió en una mezcla de metanol y agua desionizada (70:30, v:v). Se construyó una curva de calibración con soluciones estándares de benzotriazol a las concentraciones de: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 mg/L (Figura 7).

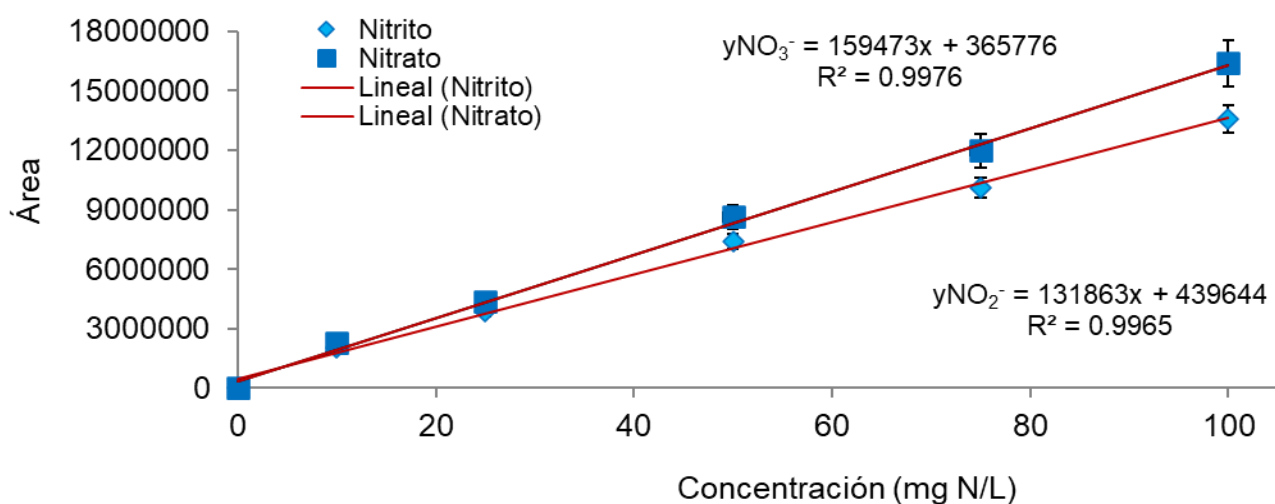


Figura 7. Ejemplo de una curva de calibración para la cuantificación de benzotriazol.

### 5.4.6 Acetato (cromatógrafo de gases)

Para la cuantificación de acetato, se utilizó un cromatógrafo de gases (Varian Star model 3400, USA), con detector de ionización de flama (FID). Se utilizó una columna de acero inoxidable de 1.2 m de longitud y 1/8" de diámetro interno, empacada con Porapaq Q malla 80-100. Las temperaturas de la columna, inyector y detector fueron 180, 230 y 250 °C, respectivamente. El gas acarreador fue nitrógeno con un flujo de 30 mL/min. Para la medición de acetato, se utilizó 1 mL de muestra previamente filtrada a la cual se le adicionó 0.1 mL de una solución de HCl 3N con el fin de acidificarla y tener el ácido acético sin disociar. Se inyectó al cromatógrafo una muestra de 3 µL con una jeringa de 10 µL. Se construyó una curva de calibración de C-acetato a las concentraciones de: 0, 50, 100, 150, 200 y 250 mg C/L (Figura 8).

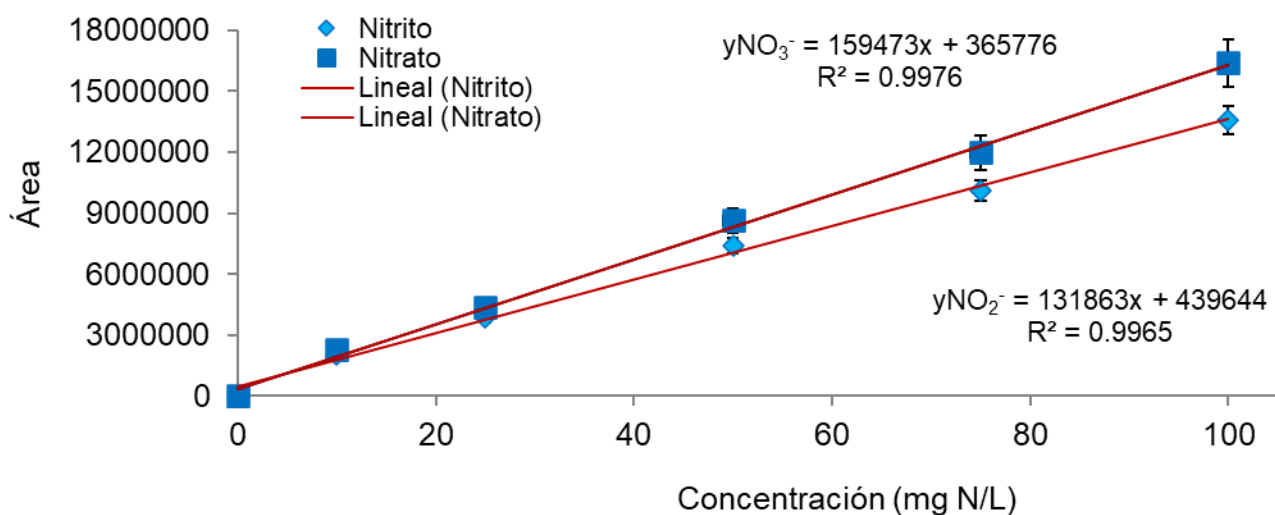


Figura 8. Ejemplo de una curva de calibración para la cuantificación de acetato.

Se utilizó un electrodo para medir la concentración de oxígeno disuelto (OD) (HI8043 Hanna, Romania) y el valor de pH (Digi-Sense digital pH, USA).

Para verificar la reproducibilidad y linealidad de los métodos analíticos, se realizaron al menos cinco curvas de calibración para cada técnica utilizada. En la siguiente Tabla 9, se presentan los coeficientes de variación (CV) de la pendiente obtenida y los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) de cada método analítico. Los métodos analíticos presentaron un CV en el valor de la

## Biotransformación del benzotriazol bajo condiciones nitrificantes

---

pendiente menor al 1.42%, lo que indicó una alta reproducibilidad y valores de  $R^2$  mayores que 0.990, mostrando una respuesta lineal.

Tabla 9. Valores promedio de los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) y coeficientes de variación (CV) de las pendientes (m) de las curvas de calibración de los métodos analíticos.

<b>Compuesto / Análisis</b>	<b><math>R^2</math></b>	<b>CV (%)</b>
Amonio (electrodo selectivo).	$0.998 \pm 0.006$	1.42
Nitrito (HPLC o Electroforesis capilar).	$0.996 \pm 0.002$ $0.998 \pm 0.004$	0.05 0.41
Nitrato (HPLC o Electroforesis capilar).	$0.998 \pm 0.002$ $0.990 \pm 0.008$	0.05 0.82
Benzotriazol (HPLC).	$0.998 \pm 0.002$	0.12
Proteína microbiana (Lowry modificado).	$0.990 \pm 0.007$	0.62
Acetato (Cromatógrafo de gases).	$0.995 \pm 0.001$	0.02

## 6 Resultados y discusión

### 6.1 Reactor nitrificante continuo (fuente de inóculo)

En la Figura 9 y Tabla 10, se presentan las velocidades volumétricas de carga y descarga de los compuestos nitrogenados del reactor nitrificante continuo utilizado como fuente de inóculo para los cultivos en lote.

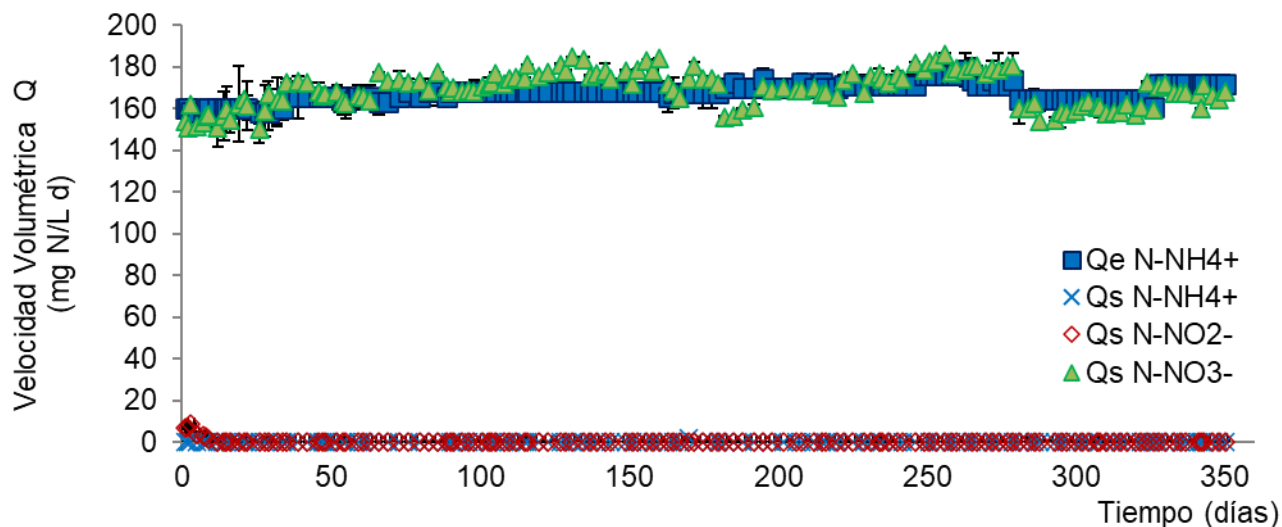


Figura 9. Velocidades volumétricas de carga ( $Q_e$ ) y descarga ( $Q_s$ ) del reactor nitrificante de tanque agitado: amonio de entrada ( $\blacksquare$ ), amonio residual ( $\times$ ), acumulación de nitrito ( $\diamond$ ) y producción de nitrato ( $\blacktriangle$ ).

De acuerdo con el perfil nitrificante del reactor continuo de la Figura 9, se observó que no hubo amonio residual, no se presentó acumulación de nitrito en el efluente y se obtuvo la conversión casi total de amonio a nitrato. La velocidad de carga de amonio y de descarga de nitrato permanecieron constantes durante todo el periodo registrado con un coeficiente de variación del 5% y un porcentaje de recuperación del 100% en el balance de materia (Tabla 10), indicando que el proceso respiratorio nitrificante se encontraba fisiológicamente estable.



## Biotransformación del benzotriazol bajo condiciones nitrificantes

Tabla 10. Balance de nitrógeno en el reactor continuo.

<b>Qe N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (mg/L d)</b>	<b>Qs N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (mg/L d)</b>	<b>Qs N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (mg/L d)</b>	<b>Qs N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (mg/L d)</b>	<b>Qs N-BM (mg/L d)</b>
166.9 ± 6.1	0.02 ± 0.001	0.20 ± 0.01	168.9 ± 8.5	1.0 ± 0.1
C.V.= 3.6%	C.V.= 4.6%	C.V.= 5.1%	C.V.= 5.0%	C.V.= 10%

BM: biomasa formada

Se obtuvo un proceso nitrificante con una eficiencia de consumo de amonio cercana al 100% y un rendimiento de nitrato cercano a uno como se muestra en la Tabla 11. En cuanto a la producción de biomasa, ésta fue baja con un rendimiento de 0.01 ± 0.001 mg N-biomasa producida/mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> consumido, la cual sumado al alto rendimiento de producción de nitrato alcanzado indicó un proceso desasimilativo.

Tabla 11. Valores promedio de las variables de respuesta del proceso nitrificante en el reactor continuo.

<b>E<sub>NH4+</sub> (%)</b>	<b>Y<sub>NO2-</sub></b>	<b>Y<sub>NO3-</sub></b>	<b>Y<sub>BM</sub></b>
99.3 ± 2.2	0.01 ± 0.001	0.99 ± 0.05	0.01 ± 0.001
C.V.= 2.2%	C.V.= 10%	C.V.= 5.2%	C.V.= 10%

Y<sub>NO2-</sub>, Y<sub>NO3-</sub>, Y<sub>BM</sub>: mg N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, N-biomasa formada/mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> consumido

Con los resultados antes mencionados del consorcio nitrificante del reactor continuo, se concluyó que la biomasa podía ser utilizada para inocular los cultivos en lote (botellas serológicas), ya que se encontraba en estado estacionario con altos valores de eficiencia de consumo de amonio y altos rendimientos de formación de nitrato. Estos resultados mostraron la actividad respiratoria simultánea de las AOB y NOB del consorcio, realizándose los procesos respiratorios amonio y nitrito oxidantes.

## 6.2 Cultivos en lote nitrificantes para la biodegradación de benzotriazol

### 6.2.1 Ensayo control abiótico sin biomasa

Se realizó un ensayo control con amonio y benzotriazol pero sin inocular durante un periodo de incubación de 49 días (Figura 10).

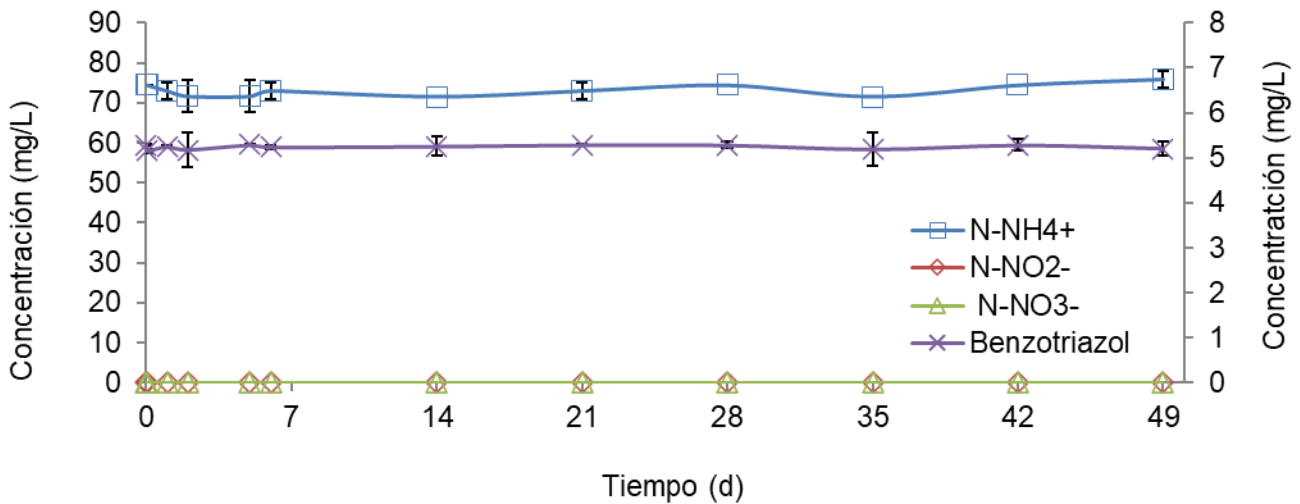


Figura 10. Perfil de las concentraciones en compuestos nitrogenados y benzotriazol en un cultivo abiótico sin biomasa: consumo de amonio ( $\square$ ), acumulación de nitrito ( $\diamond$ ), producción de nitrato ( $\triangle$ ) y consumo de BT ( $\times$ ).

Como se puede observar en la gráfica anterior, la concentración de amonio se mantuvo constante a un valor promedio de  $73.8 \pm 2.7$  mg N/L y la del BT en un promedio de  $5.2 \pm 0.1$  mg/L con valores de C.V. menores que 3.6% (Tabla 12), mostrando que la pérdida de estos compuestos por reactividad química del medio de cultivo, adsorción por el sistema experimental (botellas serológicas y tapón de goma) o por volatilización no fue significativa. El pH durante el tiempo de evaluación se mantuvo en un promedio de  $8.0 \pm 0.1$  con un C.V. de 1%.

## Biotransformación del benzotriazol bajo condiciones nitrificantes

Tabla 12. Promedio de las concentraciones en compuestos nitrogenados y benzotriazol en el cultivo abiótico sin biomasa.

<b>[N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>] (mg N/L)</b>	<b>[N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>] (mg N/L)</b>	<b>[N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] (mg N/L)</b>	<b>[Benzotriazol] (mg/L)</b>
$73.8 \pm 2.7$	0	0	$5.2 \pm 0.1$
C.V. = 3.6%			C.V. = 2%

### 6.2.2 Ensayo control con biomasa esterilizada

Para determinar la posible adsorción de amonio o benzotriazol sobre la biomasa, se realizó un ensayo control con biomasa esterilizada (120 °C, 15 min, 15 psi) con una concentración de biomasa de  $268 \pm 20$  mg proteína microbiana/L ( $1.1 \pm 0.1$  g SSV/L) durante un periodo de 24 horas.

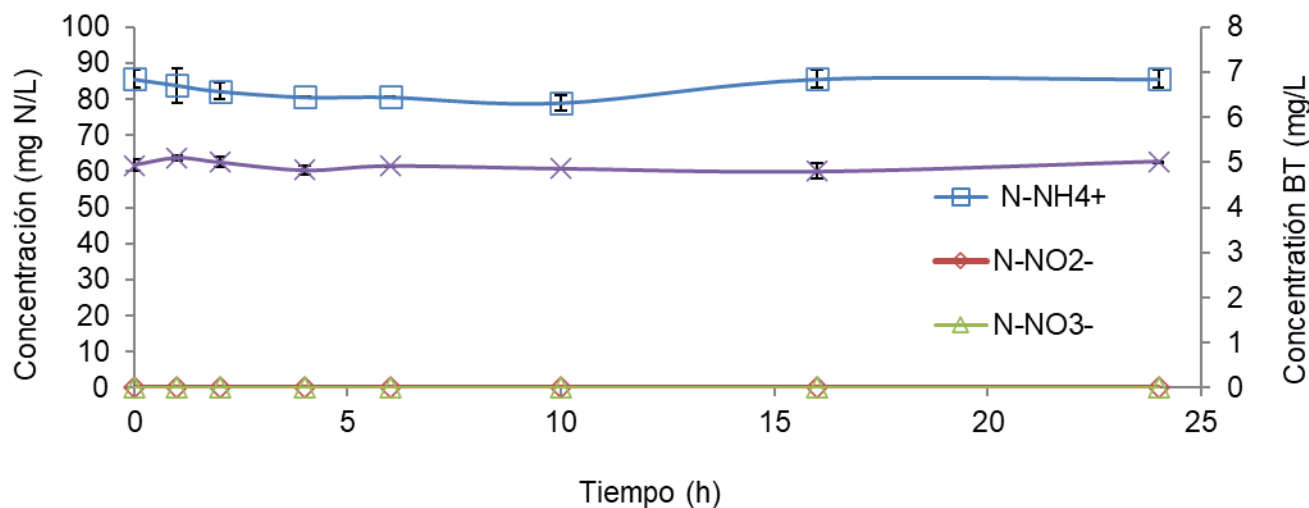


Figura 11. Perfil de las concentraciones en compuestos nitrogenados y benzotriazol en un cultivo con biomasa esterilizada: consumo de amonio ( $\square$ ), acumulación de nitrito ( $\diamond$ ), producción de nitrato ( $\triangle$ ) y consumo de BT ( $\times$ ).

Como se puede observar en la Figura 11, los perfiles de las concentraciones de amonio y benzotriazol se mantuvieron constantes a un valor promedio de  $82.9 \pm 2.7$  mg N/L para el amonio y de  $4.9 \pm 0.1$  mg/L para el BT con valores de C.V. menores que 3.2% (Tabla 13). No

## Biotransformación del benzotriazol bajo condiciones nitrificantes

se presentó formación de ningún producto nitrogenado. Estos resultados muestran que no hubo pérdida de amonio y BT por adsorción sobre la biomasa bajo estas condiciones experimentales. Se ha reportado que la adsorción de BTs en lodos primarios y secundarios en plantas de tratamiento de aguas residuales solo contribuye en un porcentaje menor al 4% en su eliminación debido a las características polares de los compuestos (Stasinakis *et al.*, 2013). Se monitoreó el pH durante las 24 h, manteniéndose en un valor promedio de  $8.0 \pm 0.1$  con un C.V. de 1%.

Tabla 13. Promedio de las concentraciones en compuestos nitrogenados y benzotriazol en el cultivo con biomasa esterilizada.

<b>[N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>] (mg N/L)</b>	<b>[N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>] (mg N/L)</b>	<b>[N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] (mg N/L)</b>	<b>[Benzotriazol] (mg/L)</b>
82.9 ± 2.7 C.V. = 3.2%	0	0	4.9 ± 0.1 C.V. = 2%

De acuerdo con los resultados obtenidos en los ensayos abióticos sin biomasa y con biomasa esterilizada, en los cultivos en lote inoculados con biomasa nitrificante activa y bajo las condiciones experimentales usadas, el consumo de amonio y BT podrá ser asociado principalmente con la actividad biológica del lodo.

### 6.2.3 Ensayo control nitrificante

En la Figura 12, se presenta el perfil de un cultivo nitrificante control (100 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L) durante 24 horas de incubación, en donde se observa que la concentración de amonio fue disminuyendo conforme avanzó el tiempo llegando a ser cero hasta la hora 13. Se observa que no hubo acumulación de nitrito y la formación de nitrato aumentó a través del tiempo llegando a ser estable entre 20 y 24 h.

## Biotransformación del benzotriazol bajo condiciones nitrificantes

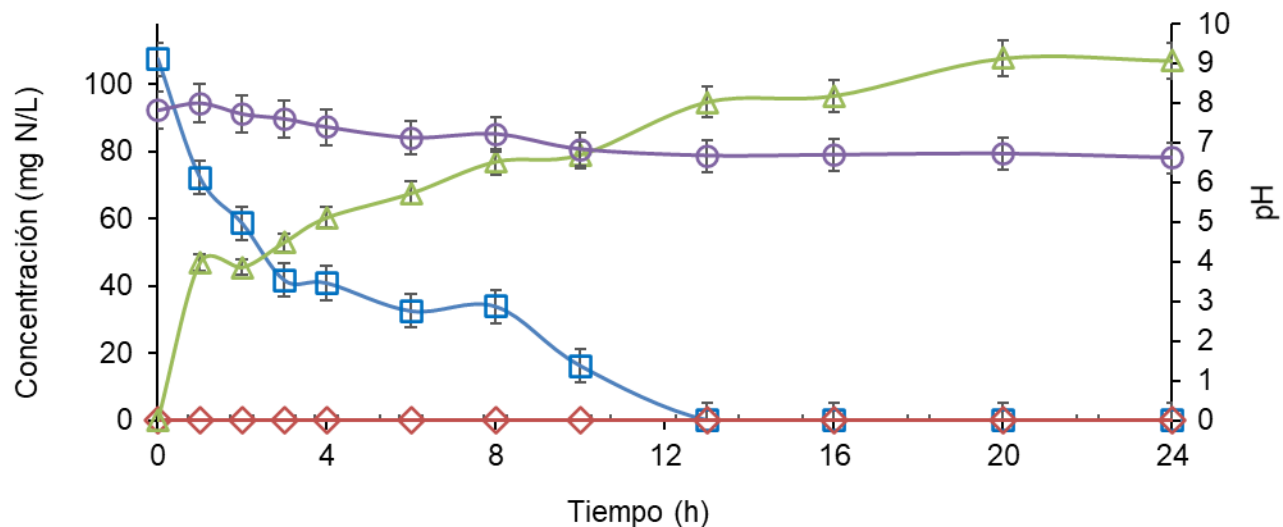


Figura 12. Perfil nitrificante obtenido en un cultivo en lote control con 100 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L: consumo de amonio (□), acumulación de nitrito (◇), producción de nitrato (△) y pH (○).

La eficiencia de consumo de amonio fue alta ( $E_{NH_4^+} = 99.9 \pm 1.5\%$ ), no hubo acumulación de nitrito ( $Y_{NO_2^-} = 0 \pm 0$  mg N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> formado/mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> consumido), mostrando un alto rendimiento de conversión de amonio a nitrato ( $Y_{NO_3^-} = 0.98 \pm 0.02$  mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> formado/mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> consumido) después de 20 h de experimentación (Tabla 14).

Tabla 14. Variables de respuesta del proceso nitrificante control en lote.

Cnc. inicial mg N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /L	$E_{NH_4^+}$ (%)	$Y_{NO_2^-}$	$Y_{NO_3^-}$	$Y_{BM}$	$q_{NH_4^+}$	$q_{NO_3^-}$
107.4 ± 2.9	99.9 ± 1.5	0	0.98 ± 0.02	0.01 ± 0.001	1.1 ± 0.1	0.8 ± 0.1
C.V. = 2.7%	C.V. = 1.5%		C.V. = 2.0%	C.V. = 10%	C.V. = 9.1%	C.V. = 12.5%

$E_{NH_4^+}$ : (mg N consumido/mg N alimentado) x 100;

$Y_{NO_2^-}$ ,  $Y_{NO_3^-}$ ,  $Y_{MB}$ : mg N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, N-biomasa formada/mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> consumido;

$q_{NH_4^+}$  y  $q_{NO_3^-}$ : mg N/mg proteína microbiana d.

El crecimiento microbiano fue bajo con un rendimiento de biomasa ( $Y_{BM}$ ) menor a 0.01 mg N-biomasa formada/mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> consumido. Por lo tanto, el lodo mostró una actividad respiratoria nitrificante a través de un proceso desasimilativo. El valor inicial de pH del cultivo fue de  $7.8 \pm$

0.1 y disminuyó hasta un valor final de  $6.6 \pm 0.1$ . Al final de las 24 h de incubación, la concentración de OD fue mayor a 5 mg/L. De manera similar, en los cultivos de 49 d, la concentración de OD fue mayor a 5 mg/L, indicando que los sistemas fueron aireados eficientemente para suplir el oxígeno necesario para el metabolismo nitrificante. La velocidad específica de consumo de amonio ( $q_{\text{NH}_4^+}$ ) fue de  $1.1 \pm 0.1$  mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> consumido/mg proteína microbiana d y la velocidad específica de producción de nitrato ( $q_{\text{NO}_3^-}$ ) fue de  $0.8 \pm 0.1$  mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> producido/mg proteína microbiana d. Estos resultados indican que las condiciones experimentales usadas fueron adecuadas para llevar a cabo simultáneamente los procesos respiratorios amonio y nitrito oxidantes en el sistema experimental en lote. Bajo estas mismas condiciones, se prosiguió con la evaluación de la biotransformación del BT bajo condiciones nitrificantes.

### 6.2.4 Biotransformación del benzotriazol por el cultivo nitrificante en lote

La Figura 13 muestra los perfiles de biotransformación de BT obtenidos bajo las mismas condiciones de nitrificación, en ausencia y presencia de amonio.

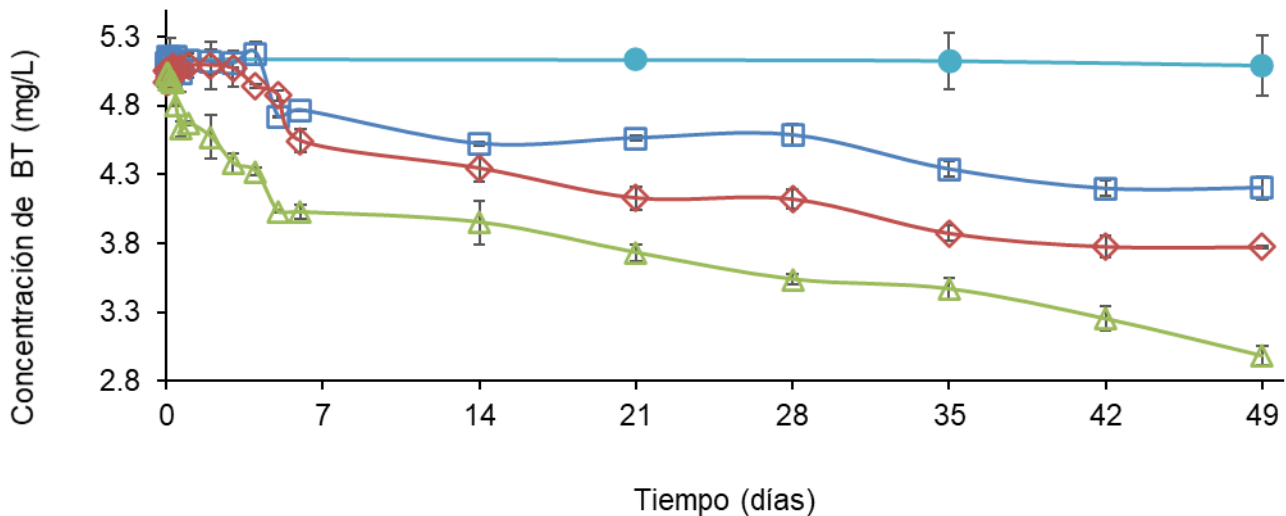


Figura 13. Perfiles de biotransformación de benzotriazol bajo condiciones nitrificantes en ausencia y presencia de amonio a las siguientes concentraciones iniciales (mg N/L): (●) 0, (□) 100, (◇) 200 y (△) 300.

## Biotransformación del benzotriazol bajo condiciones nitrificantes

Tabla 15. Biotransformación de benzotriazol bajo condiciones nitrificantes.

Cnc. inicial NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg N/L)	Cnc. inicial BT (mg/L)	E <sub>BT</sub> (%)	q <sub>BT</sub>	λ <sub>BT</sub> (d)
0	5.14 ± 0.05	0	0	-
100	5.11 ± 0.02	17.9 ± 0.9	0.13	1.1
200	5.09 ± 0.05	25.4 ± 0.9	0.25	2.0
300	5.04 ± 0.01	40.8 ± 0.9	0.75	0
300 + ATU	5.07 ± 0.01	0	0	-
300 + acetato	5.07 ± 0.14	9.4 ± 0.5	0.23*	35

E<sub>BT</sub>: (mg BT consumido/mg BT alimentado) x 100.

q<sub>BT</sub>: mg BT consumido/g proteína microbiana d y λ<sub>BT</sub>: fase lag (d) de la biotransformación de BT estimados por el modelo de Gompertz.

\*En este caso, el modelo de Gompertz no fue aplicado y q<sub>BT</sub> fue estimada calculando la velocidad específica correspondiente a ΔBT/Δt, donde Δt = 7 d de 35 a 42 días de cultivo.

Los resultados mostraron que no hubo consumo de BT en los cultivos de 49 d sin amonio, mientras que en los cultivos donde estaba presente el amonio (100 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L), el lodo mostró la capacidad de biotransformar 17.9 ± 0.9% de BT (Tabla 15). Estos resultados mostraron que el lodo nitrificante solo consumió BT en presencia de amonio, lo que indica que la biotransformación de BT podría deberse a la capacidad cometabólica de las AOB al utilizar amonio como fuente de energía. De hecho, al incrementar la concentración inicial de amonio a 200 y 300 mg N/L, el lodo mostró una mayor capacidad de biotransformar BT con un aumento en la eficiencia y velocidad específica de consumo de BT (Fig. 13 y Tabla 15). Cuando la concentración inicial de amonio fue aumentada de 100 a 300 mg N/L, se alcanzó un incremento de 2.3 y 5.8 veces para E<sub>BT</sub> y q<sub>BT</sub>, respectivamente, mientras que la fase lag para el consumo de BT desapareció. Estos resultados indicaron que la biotransformación de BT se vio favorecida por una mayor capacidad cometabólica de las AOB. A 300 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L, el lodo fue capaz de biotransformar 40.8 ± 0.9% de BT después de 49 d a una q<sub>BT</sub> de 0.75 mg BT consumido/g proteína microbiana d. Se puede observar que la eficiencia y la velocidad de eliminación permanecieron bajas, lo que muestra la recalcitrancia de la molécula en condiciones de nitrificación. En cultivos nitrificantes en lote a concentraciones iniciales de 100 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L y 5 mg C/L de benceno, tolueno y *m*-xileno (BTX) adicionados por separado, Zepeda *et al.* (2007) determinaron las velocidades específicas de biotransformación (mg C/g

N-proteína microbiana h) de  $34 \pm 3$  para el benceno,  $45 \pm 3$  para el tolueno y  $55 \pm 1$  para el *m*-xileno. En reactores de lotes secuenciados bajo condiciones nitrificantes alimentados a concentraciones iniciales de  $100 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{L}$  y  $19.4 \pm 1.1 \text{ mg C/L}$  de 2-clorofenol, Martínez-Jardines *et al.* (2018) obtuvieron velocidades específicas de consumo de 2-clorofenol entre 0.9 y  $9.2 \text{ mg C/g proteína microbiana d}$  a través de los ciclos de operación. Estos resultados mostraron que, bajo condiciones nitrificantes similares, el BT es más persistente que los compuestos BTX y el 2-clorofenol.

En trabajos recientes bajo condiciones aerobias, utilizando principalmente lodos activados como inóculo, el BT ha sido ampliamente reportado como un compuesto recalcitrante en experimentos a escala de laboratorio, así como en plantas de tratamiento de aguas residuales (Liu *et al.*, 2011; Herzog *et al.*, 2013; Molins-Delgado *et al.*, 2017). La eliminación de BT en cuatro plantas de tratamiento de aguas residuales osciló entre el 30 y el 55% con los siguientes intervalos de concentración de BT de  $17\text{-}44 \text{ }\mu\text{g/L}$  para el influente y  $7\text{-}18 \text{ }\mu\text{g/L}$  para el efluente (Reemtsma *et al.*, 2010). En experimentos aerobios en lotes con agua subterránea y sedimentos del acuífero como inóculo, el BT ( $1 \text{ mg/L}$ ) fue biodegradado en un 72% después de 77 días (Liu *et al.*, 2013). Mazioti *et al.* (2015b) reportaron la eliminación de BT ( $30 \text{ }\mu\text{g/L}$ ) por un lodo bajo condiciones aerobias en un reactor de biofilm de lecho móvil con una eficiencia del 76% después de 24 h y una velocidad específica de  $11.3 \pm 1.6 \text{ }\mu\text{g BT consumido/g biomasa adherida d}$ . Sin embargo, se debe tener cuidado al momento de comparar estos resultados reportados previamente en la literatura con los valores de eficiencia y velocidad específica obtenidos en el presente estudio debido a las numerosas diferencias en las condiciones experimentales utilizadas (inóculo, medio de cultivo o composición de las aguas residuales, concentraciones de sustratos y lodos, sistema de tratamiento, etc.). No obstante, parece que los lodos nitrificantes utilizados en el presente trabajo exhibieron una buena capacidad de biotransformación de BT bajo las condiciones utilizadas ya que se usó una concentración inicial de BT de hasta  $5 \text{ mg/L}$ .

Varios estudios han reportado el incremento en la biotransformación de diferentes EOCs al aumentar la concentración inicial de amonio o la velocidad de carga de amonio, mostrando la



eliminación cometabólica de estos contaminantes por las AOB. En cultivos en lotes de 6 d con lodos nitrificantes enriquecidos, Tran *et al.* (2009) obtuvieron un aumento en las eficiencias de eliminación de diversos fármacos persistentes (0.1 mg/L) como el ácido clofíbrico (del 10 al 25%), el diclofenaco (del 40 al 80%), la carbamazepina (del 10 al 40%) y la propifenazona (del 15 al 45%) aumentando la concentración inicial de amonio de 20 a 200 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L. En un reactor con lodos activados nitrificantes, Fernandez-Fontaina *et al.* (2012) aumentaron la velocidad de carga de nitrógeno (0.02 a 0.12 g N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L d) para propiciar el enriquecimiento del lodo en bacterias nitrificantes y observaron una relación lineal entre la velocidad específica de nitrificación y la velocidad específica de biodegradación de productos farmacéuticos y de cuidado personal (2.5-10 µg/L d para productos farmacéuticos y 5-20 µg/L d para fragancias). De acuerdo con Martínez-Jardines *et al.* (2018), el consumo cometabólico de 2-clorofenol en un reactor de lotes secuenciados por un lodo nitrificante se vio favorecido con el aumento de la concentración inicial de amonio de 100 a 500 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L, provocando un incremento en la velocidad específica de consumo de 2-clorofenol de hasta 3.1 veces. Estos estudios sugieren que una mayor disponibilidad de amonio como fuente de energía principal para las AOB resulta en mayores flujos de energía, la cual puede ser utilizada para el crecimiento de AOB y/o su actividad cometabólica al sintetizar las enzimas involucradas en el proceso de biotransformación y/o al aumentar la inducción y/o actividad cinética de la enzima AMO. En el presente estudio, se mantuvo un proceso respiratorio nitrificante desasimilativo ( $Y_{BM} = 0.01 \pm 0.01$  mg N-biomasa formado/mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> consumido), por lo que el aumento en la capacidad cometabólica de las AOB para biotransformar el BT podría ser debido a una mayor capacidad enzimática más que a un mayor crecimiento de AOB.

En el caso del BT, algunos estudios utilizaron lodos activados para evaluar la relación entre la biotransformación de BT y el aporte de amonio al medio o el proceso de nitrificación. Por ejemplo, Herzog *et al.* (2014) informaron que, cuando se añadió nitrógeno (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 9 mg N/L) a un medio mineral, la biodegradación del BT (0.5 mg/L) aumentó de 30 a 100% en 50 días, concluyendo que el BT podría no ser suficiente como única fuente de energía en ausencia de nutrientes fácilmente degradables, especialmente fuentes de nitrógeno. Sin embargo, no se investigó el proceso de nitrificación. Mai *et al.* (2015) obtuvieron un 43% de eficiencia de

eliminación para el BT (1 mg/L) en un filtro percolador nitrificante a escala de laboratorio operando a una velocidad de nitrificación de  $0.52 \pm 0.15$  mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L h. Los autores observaron que, aunque la eficiencia de eliminación de algunos EOCs aumentaba con el aumento de la nitrificación, en el caso del BT, el aumento de la velocidad de consumo de amonio ( $1.2 \pm 0.59$  mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L h) no provocó un aumento en su eficiencia de eliminación, mostrando una disminución del 43 al 11%. Los resultados de Mai *et al.* (2015) contrastan con los resultados obtenidos en el presente estudio donde se demostró que la biotransformación de BT puede estar relacionada con la nitrificación. Esto puede ser debido al uso de un lodo nitrificante enriquecido y fisiológicamente estable en el presente estudio.

En el presente trabajo, un intermediario no identificado de la biotransformación del BT fue detectado por HPLC (tiempo de retención: 2.7 min). Se ha demostrado previamente que el BT presenta un alto grado de biotransformación y se han reportado numerosos productos de transformación (Mazioti *et al.*, 2017). De acuerdo con Huntscha *et al.* (2014), existe una amplia gama de posibles vías de reacción, que incluyen oxidación, alquilación e hidroxilación, lo que sugiere la importancia de los procesos cometabólicos para la biodegradación de BT. Varios informes señalaron que la hidroxilación es el paso predominante durante la biotransformación de BT (Huntscha *et al.*, 2014; Mazioti *et al.*, 2017; Kowalska *et al.*, 2019). En biorreactores de membrana a escala de laboratorio con lodo activado, Kowalska *et al.* (2019) observaron que los productos predominantes de la transformación del BT se formaron por reacciones de hidroxilación (1-hidroxibenzotriazol, 4-hidroxibenzotriazol y dihidroxibenzotriazol), incluso también se observaron reacciones de metilación (1-metilbenzotriazol, 4-metilbenzotriazol y 5-metilbenzotriazol). En experimentos por lotes con lodos activados, Huntscha *et al.* (2014) identificaron 27 productos de biotransformación del BT, siendo el 4- y 5-hidroxibenzotriazol los principales productos de transformación encontrados, sugiriendo la hidroxilación cometabólica del anillo aromático de benceno. La cuantificación de 1-metilbenzotriazol mostró la metilación del anillo de triazol como otra vía de reacción. Se ha informado también de la formación de fenol, 4- y 5-metoxibenzotriazol como intermediarios de la biotransformación de BT en experimentos con sedimentos de acuíferos bajo condiciones aerobias (Liu *et al.*, 2013). Sin

embargo, se necesitaría hacer más experimentación para identificar cuál fue el producto de la biotransformación del BT encontrado bajo las condiciones nitrificantes del presente trabajo.

### 6.2.5 Contribución de la enzima amonio monooxigenasa en la biotransformación del BT

En un cultivo con 300 mg N/L de amonio se añadió alitiourea como inhibidor específico de la enzima AMO para evaluar su participación en la biotransformación de BT. En primer lugar, se verificó la actividad metabólica del lodo nitrificante a 300 mg N/L de amonio en ausencia de ATU (Figura 14a). El proceso de nitrificación se completó a los 2 d, obteniendo una  $E_{\text{NH}_4^+}$  de  $99.9 \pm 0.1\%$  mientras que el  $Y_{\text{NO}_3^-}$  fue de  $0.99 \pm 0.01$  mg N- $\text{NO}_3^-$  formado/mg N- $\text{NH}_4^+$  consumido (Tabla 16).

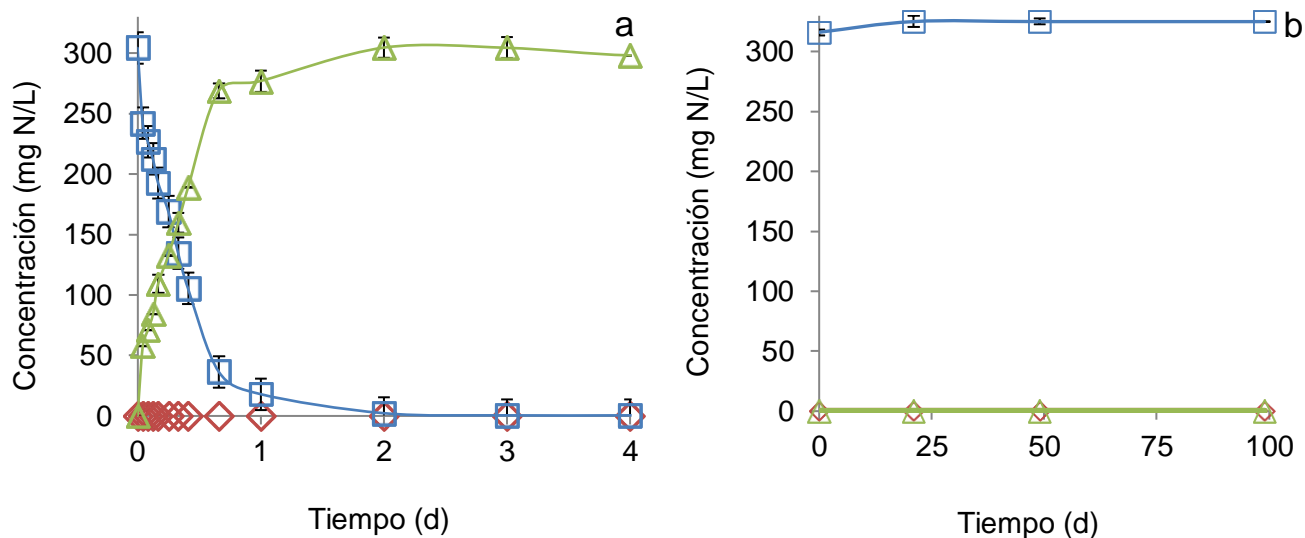


Figura 14. Perfil de cultivos nitrificantes a 300 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L: a) ensayo control nitrificante, b) en presencia de ATU: consumo de amonio (□), producción de nitrito (◇) y producción de nitrato (△).

En el cultivo en presencia de ATU (50 mg/L), no se observó consumo de amonio, obteniendo un valor promedio de  $322.3 \pm 5.3$  mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L sin formación de nitrito o nitrato durante 100

## Biotransformación del benzotriazol bajo condiciones nitrificantes

días de cultivo (Figura 14b, Tabla 16). Estos resultados confirmaron que la enzima AMO fue totalmente inhibida por el inhibidor específico.

Tabla 16. Variables de respuesta del proceso respiratorio nitrificante en cultivos en lote con 300 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L en ausencia (referencia) y presencia de ATU (50 mg/L).

Ensayo	E <sub>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></sub> (%)	Y <sub>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></sub>	Y <sub>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></sub>	q <sub>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></sub>	q <sub>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></sub>
Referencia	99.9 ± 0.1	0	0.99 ± 0.01	1.86	1.79
ATU	0	0	0	-	-

E<sub>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></sub>: (mg N consumido/mg N alimentado) x 100,  
 Y<sub>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></sub> y Y<sub>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></sub>: mg N producido/mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> consumido,  
 q<sub>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></sub> y q<sub>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></sub>: mg N/mg proteína microbiana d.

En presencia de ATU, la concentración de BT permaneció constante durante 49 días a un valor promedio de 5.07 ± 0.01 mg/L (Figura 15, Tabla 17). Esto muestra que cuando se inhibió la AMO, no hubo consumo de BT. Estos resultados mostraron que el 100% del consumo cometabólico de BT obtenido en los cultivos que contenían 300 mg de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L estuvo asociado con la actividad de la AMO.

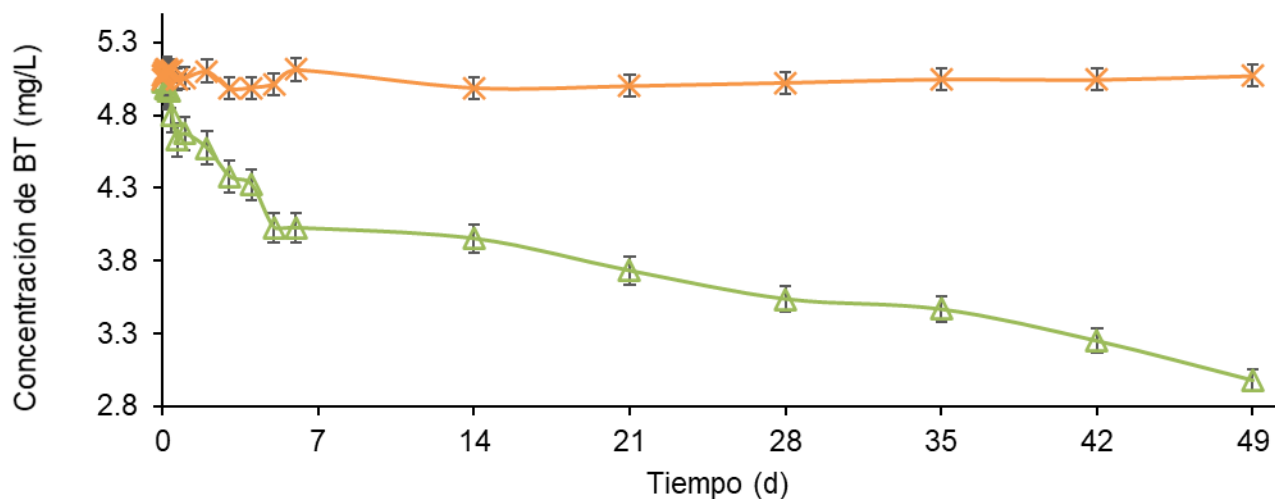


Figura 15. Perfil de biotransformación de benzotriazol en presencia de 300 mg N/L de amonio sin (Δ) y con (X) ATU.

## Biotransformación del benzotriazol bajo condiciones nitrificantes

Tabla 17. Biotransformación de benzotriazol en cultivos en lote con 300 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L sin y con alitiourea (50 mg/L).

<b>Cnc. inicial NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (mg N/L)</b>	<b>Cnc. inicial BT (mg/L)</b>	<b>E<sub>BT</sub> (%)</b>	<b>q<sub>BT</sub></b>	<b>λ<sub>BT</sub> (d)</b>
300	5.04 ± 0.01	40.8 ± 0.9	0.75	0
300 + ATU	5.07 ± 0.01	0	0	-

E<sub>BT</sub>: (mg BT consumido/mg BT alimentado) x 100.

q<sub>BT</sub>: mg BT consumido/g proteína microbiana d y λ<sub>BT</sub>: fase lag (d) de la biotransformación de BT estimados por el modelo de Gompertz.

Varios estudios han demostrado que la capacidad cometabólica de AOB fue debida a la participación de la enzima AMO en la biotransformación de EOCs como productos farmacéuticos, triclosán y bisfenol A (Roh *et al.*, 2009; Tran *et al.*, 2009). La biotransformación de EOCs podría depender de la cantidad y actividad de AMO inducida (Tran *et al.*, 2009). Según Nzila (2013), las principales reacciones cometabólicas importantes involucran oxigenasas. La AMO tiene una amplia gama de sustratos para su oxidación catalítica, siendo capaz de oxidar numerosos compuestos orgánicos, incluidas moléculas aromáticas (McCarty, 1999). En estudios donde utilizaron lodos activados con actividad nitrificante o lodos nitrificantes estabilizados y ATU como inhibidor de la AMO, la participación de la AMO en la biodegradación de diferentes contaminantes como estrógenos, productos farmacéuticos y 2-clorofenol osciló entre 20 y 100% (Shi *et al.*, 2004; Yi y Harper, 2007; Tran *et al.*, 2009; Martínez-Jardines *et al.*, 2018). En estos estudios, la biodegradación no asociada con la actividad de la AMO se atribuyó a otras enzimas o a la actividad heterotrófica de los lodos (Silva *et al.*, 2009). Margot *et al.* (2016) evaluaron el papel de las AOB en la eliminación de una mezcla de microcontaminantes (1 µg/L), incluido el BT, utilizando un agua residual municipal sintética (515 mg/L de demanda química de oxígeno (DQO) debido a la adición de acetato, propionato y metanol, 50 mg/L de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y 20 mg/L de P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) en reactores de lotes secuenciados con lodos granulares aerobios. Estos autores observaron que, cuando la oxidación del amonio fue inhibida por la ATU, se tuvieron eficiencias similares con o sin inhibición de la nitrificación, indicando al parecer que las AOB no jugaron un papel significativo en la eliminación del BT y que posiblemente estarían involucrados microorganismos

heterótrofos. Es probable que las condiciones utilizadas en su estudio (lodos activados, y un medio con altas concentraciones iniciales de compuestos orgánicos y baja concentración inicial de amonio) fueran más favorables a la actividad heterotrófica de los lodos que a la actividad litoautotrófica amonio oxidante. Por el contrario, el uso de un lodo nitrificante enriquecido en un proceso respiratorio nitrificante eficiente y estable, además del medio litoautotrófico y las condiciones experimentales establecidas en el presente estudio, permitió determinar la contribución de las AOB a través de la actividad de la AMO en la biotransformación del BT.

### **6.2.6 Efecto de la adición de acetato como cosustrato en la biodegradación del BT en cultivos nitrificantes**

En algunos estudios, la biotransformación cometabólica de BT por lodos activados ha sido evaluada mediante la adición de sustratos orgánicos fácilmente degradables. Se ha demostrado que la eliminación de BT podría incrementarse favoreciendo la actividad heterotrófica de lodos aerobios (Herzog *et al.*, 2014; Mazioti *et al.*, 2015a, 2015b). Por otro lado, Sun *et al.* (2019), respaldado por resultados metagenómicos y metatranscriptómicos, enfatizaron en el hecho de que las bacterias heterótrofas de lodos nitrificantes enriquecidos pueden contribuir significativamente a la biotransformación de compuestos aromáticos. Para evaluar la posible participación de heterótrofos del lodo nitrificante utilizado en el presente estudio en la biotransformación de BT, se añadió acetato (200 mg C/L) a los cultivos nitrificantes con una concentración de 300 mg de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L (Figura 16). En los ensayos realizados en presencia de acetato, la concentración de BT se mantuvo constante durante los primeros 35 días (5.09 ± 0.06 mg/L), después de este periodo disminuyó lentamente para alcanzar una E<sub>BT</sub> de 9.4 ± 0.5% después de 49 d (Tabla 18). La adición de acetato no solo no favoreció la biotransformación de BT en comparación con los ensayos sin acetato, sino que además la inhibió ya que no se observó consumo de BT durante los primeros 35 días de cultivo. Esto podría deberse a un efecto inhibitorio del acetato sobre el proceso de oxidación del amonio, conduciendo a una inhibición de la biotransformación cometabólica de BT por la AMO.

## Biotransformación del benzotriazol bajo condiciones nitrificantes

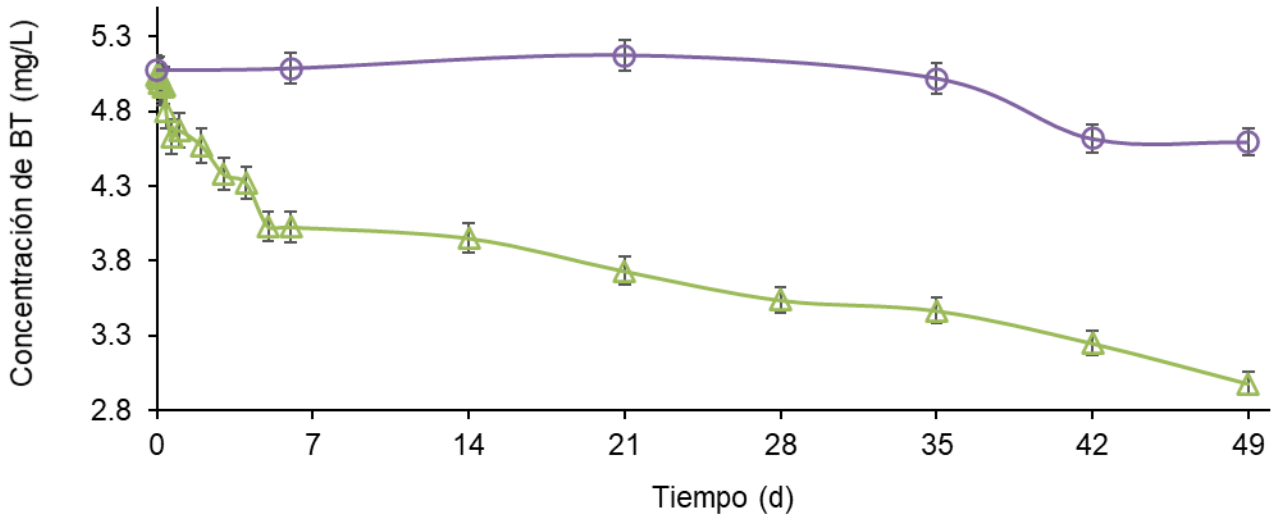


Figura 16. Perfil de biotransformación del benzotriazol en cultivos en lote bajo condiciones nitrificantes en presencia de 300 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L sin (Δ) y con (○) acetato como cosustrato.

Tabla 18. Biotransformación de benzotriazol en cultivos en lote con 300 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L sin y con acetato (200 mg C-acetato/L)

Cnc. inicial NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg N/L)	Cnc. inicial BT (mg/L)	E <sub>BT</sub> (%)	q <sub>BT</sub>	λ <sub>BT</sub> (d)
300	5.04 ± 0.01	40.8 ± 0.9	0.75	0
300 + acetato	5.07 ± 0.14	9.4 ± 0.5	0.23*	35

E<sub>BT</sub>: (mg BT consumido/mg BT alimentado) x 100.

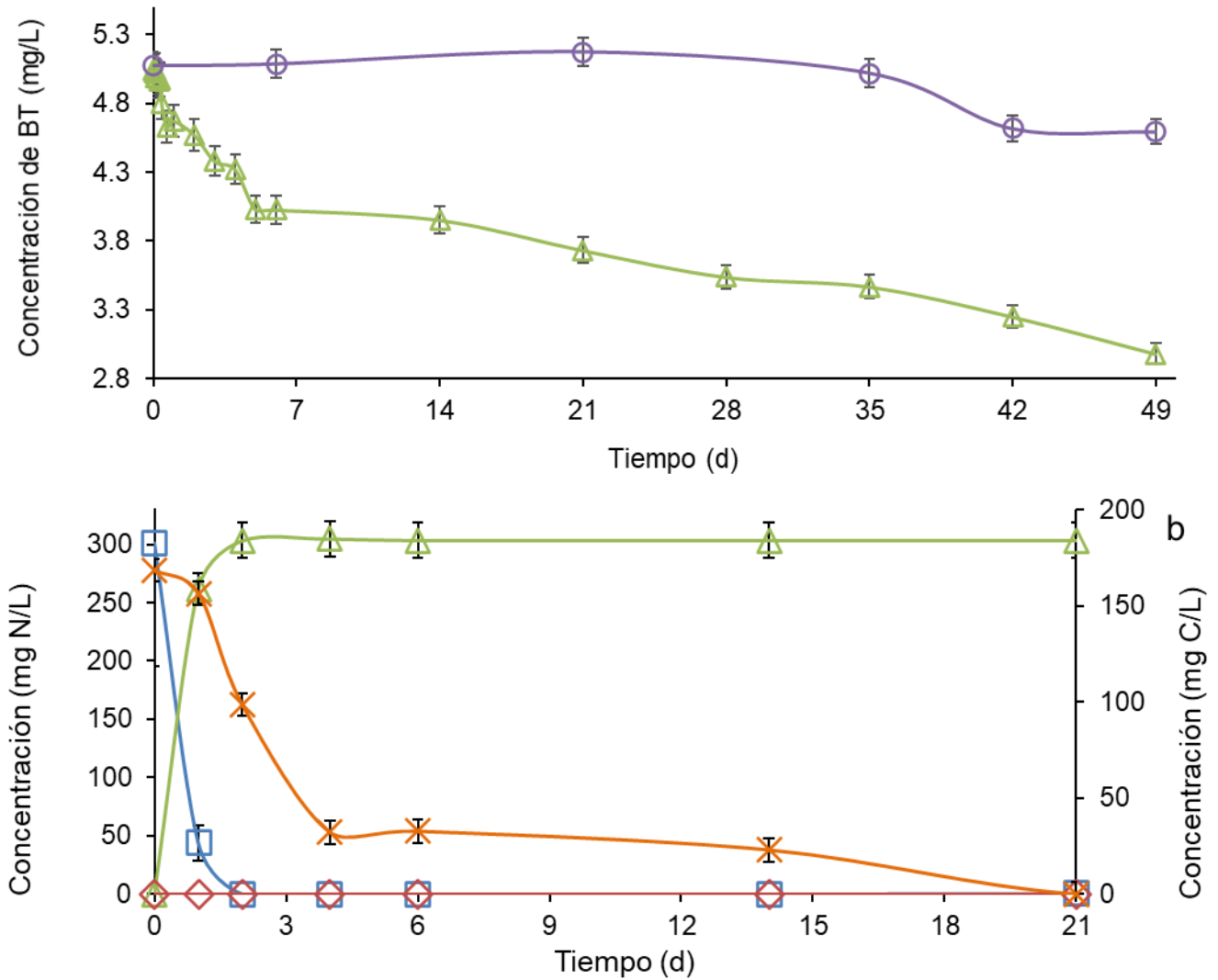
q<sub>BT</sub>: mg BT consumido/g proteína microbiana d y λ<sub>BT</sub>: fase lag (d) de la biotransformación de BT estimados por el modelo de Gompertz.

\*En este caso, el modelo de Gompertz no fue aplicado y q<sub>BT</sub> fue estimada calculando la velocidad específica correspondiente a ΔBT/Δt, donde Δt = 7 d de 35 a 42 días de cultivo.

Numerosos estudios han reportado los efectos inhibitorios causados por compuestos orgánicos como el acetato sobre el proceso de nitrificación (Gomez *et al.*, 2000). Sin embargo, de acuerdo con los resultados obtenidos en los cultivos nitrificantes con 300 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L y acetato, pero sin BT, el compuesto orgánico inhibió poco la nitrificación al disminuir q<sub>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></sub> en solamente 7.0% y q<sub>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></sub> en 0.5% en comparación con el cultivo de referencia sin acetato y sin BT (Figuras 17a y 17b, Tabla 19). La adición de acetato en los cultivos nitrificantes no alteró

## Biotransformación del benzotriazol bajo condiciones nitrificantes

tampoco los valores de eficiencias y rendimientos, obteniéndose valores altos después de 4 d al igual que en los ensayos sin acetato y sin BT (Tabla 19).





## Biotransformación del benzotriazol bajo condiciones nitrificantes

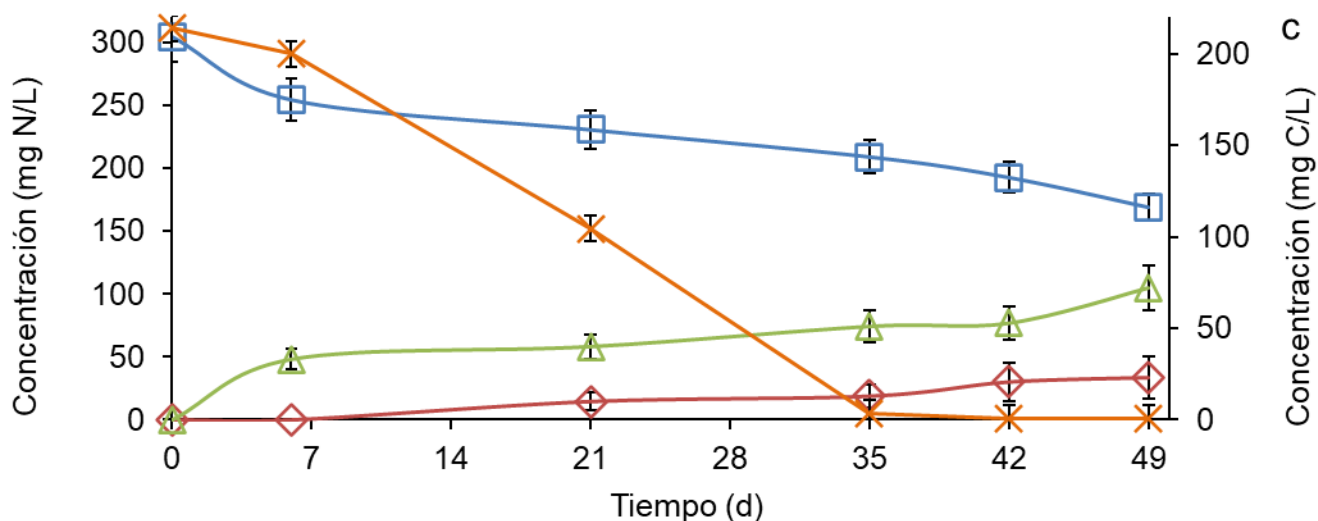


Figura 17. Perfiles del proceso nitrificante obtenidos en cultivos en lote con 300 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L: a) ensayo control sin acetato, b) en presencia de acetato a 200 mg C/L y c) en la presencia de acetato (200 mg C/L) y BT (5 mg/L). Consumo de amonio (□), acumulación de nitrito (◇), producción de nitrato (△) y consumo de acetato (X).

Tabla 19. Variables de respuesta del proceso respiratorio nitrificante en cultivos en lote con 300 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L en ausencia (referencia) y presencia de acetato (200 mg C/L) o acetato (200 mg C/L) + BT (5 mg/L).

Ensayo	E <sub>NH4+</sub> (%)	Y <sub>NO2-</sub>	Y <sub>NO3-</sub>	q <sub>NH4+</sub>	q <sub>NO3-</sub>
Referencia	99.9 ± 1.0	0	0.99 ± 0.03	1.99	1.92
Acetato	99.9 ± 1.0	0	0.99 ± 0.03	1.85	1.91
Acetato + BT (6 d)	16.4 ± 1.9	0	0.96 ± 0.03	-	-
Acetato + BT (49 d)	44.5 ± 1.0	0.25 ± 0.03	0.77 ± 0.03	0.01	0.01

E<sub>NH4+</sub>: (mg N consumido/mg N alimentado) x 100,

Y<sub>NO2-</sub> y Y<sub>NO3-</sub>: mg N producido/mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> consumido,

q<sub>NH4+</sub> y q<sub>NO3-</sub>: mg N/mg proteína microbiana d.

En los cultivos sin y con acetato, los valores de E<sub>NH4+</sub>, Y<sub>NO2-</sub> y Y<sub>NO3-</sub> fueron determinados a los 4 días de cultivo, mientras que en el cultivo con acetato y BT fueron calculados a los 6 y 49 días de experimentación.

Los resultados de la Figura 17b también mostraron que el lodo presentó la capacidad de consumir 99.9% de acetato después de 21 d con una velocidad específica inicial ( $q_{\text{acetato}}$ ) de 0.23 mg C/mg proteína microbiana d, evidenciando la baja actividad heterotrófica del lodo nitrificante. Aparentemente, los heterótrofos del lodo no mostraron la capacidad cometabólica para consumir BT (Figura 16). La Figura 17c muestra los perfiles cinéticos del proceso de nitrificación y de consumo de acetato en presencia de BT. Los resultados mostraron que en presencia de BT, la capacidad del lodo para consumir acetato se inhibió al disminuir la  $q_{\text{acetato}}$  en 87% y obtener  $99.6 \pm 0.5\%$  de consumo de acetato después de 35 d. El efecto inhibitorio ejercido por el BT sobre el consumo de acetato podría explicar en parte por qué la adición de acetato no favoreció la biotransformación de BT. Sin embargo, deben realizarse más estudios para comprender mejor los mecanismos implicados en los efectos inhibitorios del acetato sobre la biotransformación de BT y los efectos inhibitorios del BT sobre el consumo de acetato por el lodo nitrificante. Además, la adición de BT a los cultivos con amonio y acetato provocó una alteración en la actividad nitrificante ya que el amonio no se consumió totalmente, se acumuló nitrito y la formación de nitrato disminuyó después de 49 d (Figura 17c, Tabla 19). Las velocidades específicas de la nitrificación se redujeron drásticamente en un 99.4% para  $q_{\text{NH}_4^+}$  y  $q_{\text{NO}_3^-}$  debido a la adición de BT, lo que muestra el efecto inhibitorio del BT sobre el proceso de nitrificación.

Tran *et al.* (2009) observaron que la adición de 50 y 100 mg acetato/L a cultivos en lotes (de 6 días) con lodos nitrificantes enriquecidos, aumentó la eficiencia de eliminación de varios productos farmacéuticos, demostrando el papel de los heterótrofos en la degradación de estos compuestos, además de la participación de AOB. En el estudio de Mazioti *et al.* (2015a) realizado en experimentos en lotes con lodos activados, se observó que la adición de sustratos orgánicos como peptona, urea, extracto de levadura (correspondiente a una concentración de DQO igual a 200 mg/L) aceleraba la biodegradación de BT con un aumento de la constante de velocidad ( $k$ ) de 0.38 a 0.73 1/d. Los autores concluyeron que el aumento de la biodegradación de los EOCs se debió al cometabolismo heterotrófico, donde la adición de sustratos orgánicos mejoró la inducción de enzimas. En el presente estudio, la adición de acetato no favoreció la biotransformación de BT probablemente por la alta actividad nitrificante y la baja capacidad

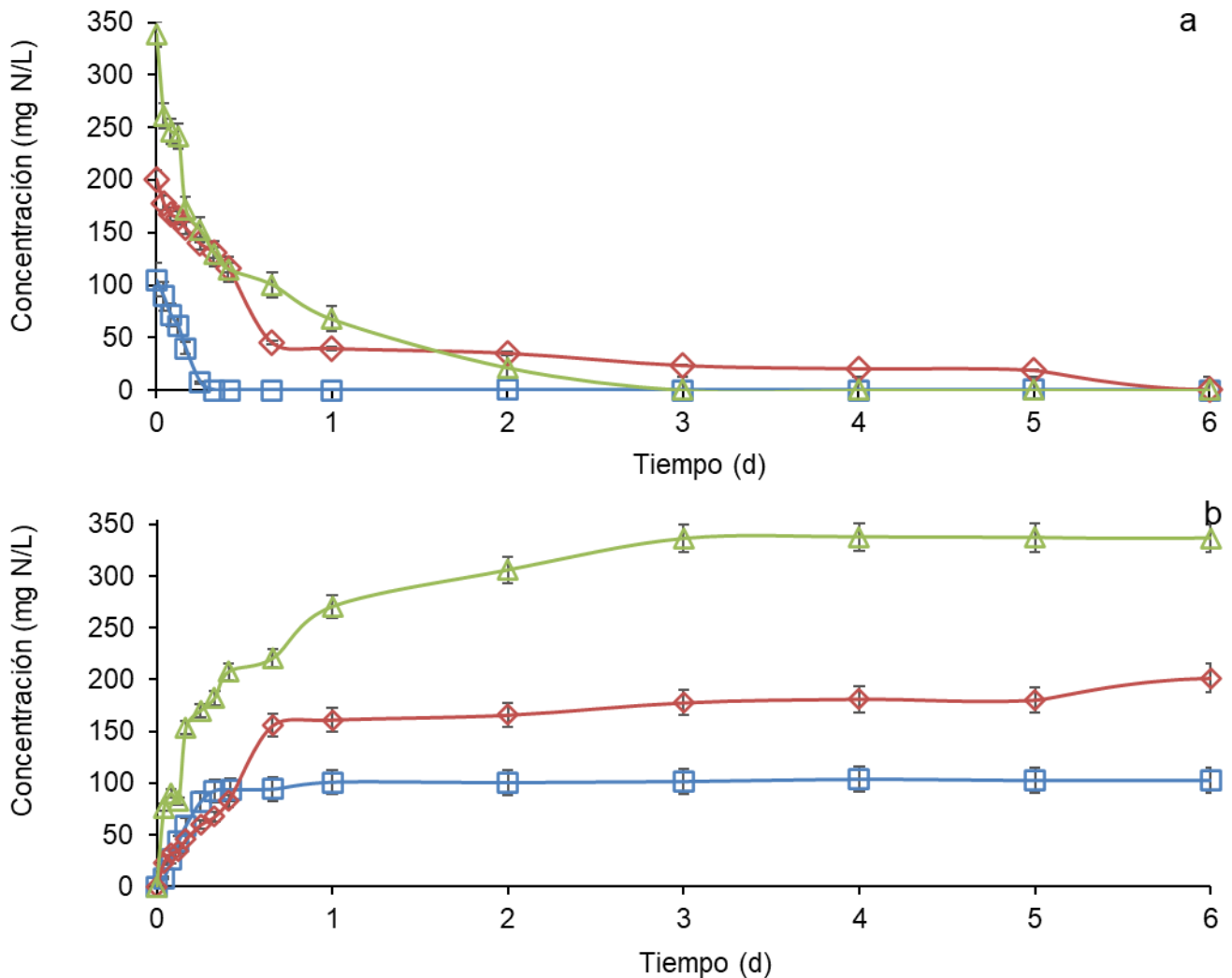
heterotrófica de los lodos utilizados. Esto indica que en función de las actividades respiratorias autotróficas y heterotróficas de los lodos utilizados, se podrían implementar diversas estrategias para incrementar la biotransformación cometabólica de los EOCs. En el presente estudio, utilizando un lodo nitrificante fisiológicamente estable producido en un reactor continuo en estado estacionario, la estrategia adecuada para favorecer la capacidad cometabólica del lodo para biotransformar BT fue aumentar la disponibilidad de amonio como fuente de energía para las AOB.

### 6.2.7 Efecto del benzotriazol sobre el proceso nitrificante en cultivos en lote

La Figura 18 presenta los perfiles del proceso nitrificante obtenidos en cultivos en lote con 100, 200 y 300 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L en ausencia y presencia de BT. En los ensayos control sin BT (Figuras 18a y 18b), el proceso de la nitrificación se completó a los 6 d, alcanzando valores de E<sub>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></sub> superiores al 98.4% junto con una conversión total de amonio a nitrato con valores de Y<sub>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></sub> superiores a 0.98 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> consumido y valores de Y<sub>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></sub> cercanos a cero (Tabla 20). La adición de BT a los cultivos nitrificantes afectó el proceso de nitrificación ya que se requirieron hasta 49 d para obtener el 89.7% de consumo de amonio a 100 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L (Figura 18c y Tabla 20). A 200 y 300 mg N/L de amonio, la E<sub>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></sub> descendió a 63.1 y 77.6%, respectivamente, después de 49 d de cultivo. No hubo acumulación de nitrito en ninguna de las tres concentraciones iniciales de amonio evaluadas en presencia de BT. Después de 49 d los rendimientos de nitrito fueron cercanos a cero y se produjo nitrato como el principal producto final de oxidación con rendimientos de nitrato superiores a 0.94 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> consumido. Por lo tanto, la presencia de BT no favoreció la acumulación de nitrito. Estos resultados mostraron que el proceso respiratorio amonio oxidante fue el más afectado por la presencia de BT. El BT alteró el comportamiento cinético del proceso nitrificante al disminuir las velocidades específicas de la nitrificación (Tabla 20). q<sub>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></sub> y q<sub>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></sub> disminuyeron de 93.4-99.7% y 90.3-99.5%, respectivamente, evidenciando los efectos inhibitorios del BT sobre los procesos oxidantes de la nitrificación. Esto podría probablemente estar relacionado con efectos inhibitorios sobre la AMO, la cual está involucrada en la biotransformación del BT. Se ha informado que la enzima AMO puede oxidar una amplia gama de compuestos orgánicos, los cuales también pueden inhibir la oxidación del amonio (McCarty, 1999; Kocamemi y Çeçen,

## Biotransformación del benzotriazol bajo condiciones nitrificantes

2005). Keener y Arp (1993) encontraron que los sustratos orgánicos alternos de la AMO pueden exhibir diferentes patrones de inhibición, desde inhibición competitiva hasta no competitiva, donde altas concentraciones de amonio disminuyeron las velocidades de oxidación de sustratos alternos con carácter competitivo, pero no disminuyeron las velocidades de consumo de sustratos con carácter no competitivo. En el presente estudio, por primera vez, se demuestra que el BT podría ser un sustrato de la AMO y provocar un efecto inhibitorio sobre el proceso de oxidación del amonio donde el aumento de la concentración de amonio se asoció con un aumento de la biotransformación del BT. Sin embargo, se necesita una mejor comprensión de cómo se lleva a cabo la biotransformación cometabólica de BT por las AOB y de cómo la AMO contribuye a la oxidación de BT.



## Biotransformación del benzotriazol bajo condiciones nitrificantes

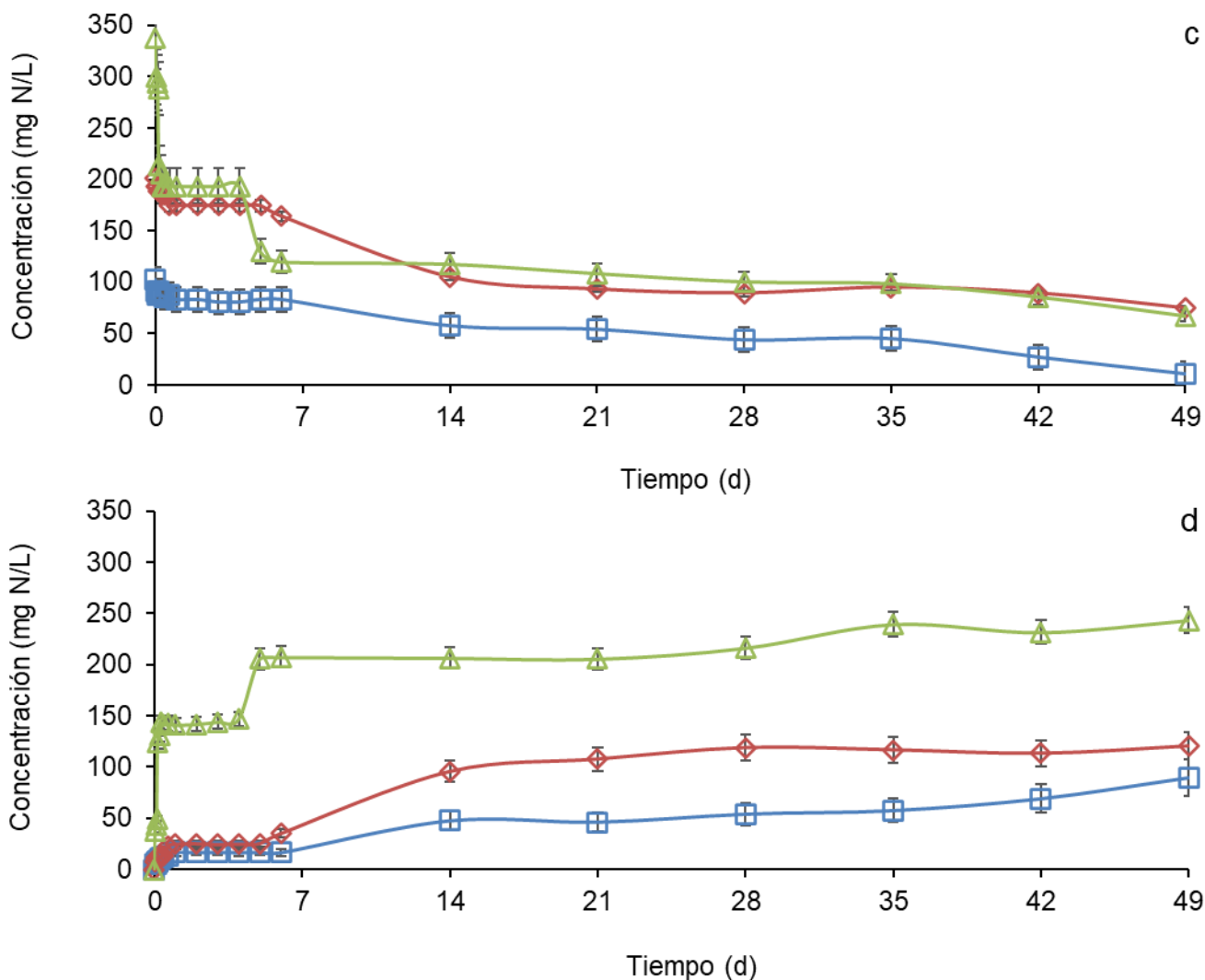


Figura 18. Perfiles cinéticos del proceso nitrificante obtenidos en cultivos en lote con (□) 100, (◇) 200 y (△) 300 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L en ausencia de BT: a) consumo de amonio y b) producción de nitrato. En la presencia de BT (5 mg/L): c) consumo de amonio y d) producción de nitrato.

## Biotransformación del benzotriazol bajo condiciones nitrificantes

Tabla 20. Variables de respuesta del proceso respiratorio nitrificante en lote en ausencia y presencia de benzotriazol.

<b>Cnc. inicial (mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L)</b>	<b>E<sub>NH4+</sub> (%)</b>	<b>Y<sub>NO2-</sub></b>	<b>Y<sub>NO3-</sub></b>	<b>q<sub>NH4+</sub></b>	<b>q<sub>NO3-</sub></b>
100 sin BT	99.9 ± 1.5	0	0.98 ± 0.02	1.79	1.54
100 con BT	89.7 ± 1.5	0	0.97 ± 0.02	0.006 (- 99.7%)	0.007 (- 99.5%)
200 sin BT	99.9 ± 1.5	0	0.99 ± 0.02	0.93	0.92
200 con BT	63.1 ± 1.5	0	0.94 ± 0.02	0.025 (- 97.3%)	0.026 (- 97.2%)
300 sin BT	98.4 ± 1.5	0	0.99 ± 0.02	1.82	1.42
300 con BT	77.6 ± 1.5	0	0.99 ± 0.02	0.120 (- 93.4%)	0.138 (- 90.3%)

E<sub>NH4+</sub>: (mg N consumido/mg N alimentado) x 100;

Y<sub>NO2-</sub> y Y<sub>NO3-</sub>: mg N producido/mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> consumido;

q<sub>NH4+</sub> y q<sub>NO3-</sub>: mg N/mg proteína microbiana d.

Los valores para E<sub>NH4+</sub>, Y<sub>NO2-</sub> y Y<sub>NO3-</sub> fueron determinados a los 6 días de cultivo en los ensayos sin BT, mientras que en los ensayos con BT fueron calculados a los 49 días de experimentación.

McCarty y Bremner (1989) informaron que los compuestos heterocíclicos inhibían la nitrificación en suelos. Estos autores evaluaron el efecto inhibitorio del BT sobre la nitrificación a través de la disminución de nitrito + nitrato formados en suelos tratados con 0.5 μmol BT/g, obteniendo porcentajes de disminución en el consumo de amonio del 69-90% dependiendo del suelo utilizado. En filtros percoladores nitrificantes inoculados con un lodo activado y alimentados con amonio a 5 mg N/L (6 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L d) y BT a 1 mg/L (1.2 mg BT/L d), Mai *et al.* (2016) observaron que la adición de BT provocó una disminución cercana al 82% en la eficiencia de eliminación de amonio después de 9 h, sin acumulación de nitrito y siendo el nitrato el principal producto final. La velocidad de nitrificación reportada disminuyó de 0.52 a 0.08 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> consumido/L h. Sin embargo, los autores sugirieron que los efectos negativos sobre la nitrificación podrían deberse al metanol utilizado para disolver el BT. Los datos fisiológicos y cinéticos obtenidos en el presente estudio permitieron evidenciar que el BT inhibe

la nitrificación al disminuir las velocidades específicas de oxidación de amonio y formación de nitrato en cultivos nitrificantes en lote. Para aplicar la nitrificación en el tratamiento de aguas residuales con una alta relación amonio/BT, se necesita más información para comprender mejor cómo el BT inhibe el proceso de oxidación del amonio. Por lo cual, es necesario realizar más investigaciones para entender mejor cómo usar lodos nitrificantes.

### 6.3 Reactor SBR

Se evaluó el proceso nitrificante y la posibilidad de favorecer la biotransformación cometabólica del BT al aumentar la concentración inicial de amonio en un reactor de lotes secuenciados. De acuerdo a la metodología planteada, primero, se alimentó el reactor con amonio (300 mg N/L) sin BT, utilizando biomasa (lodo nitrificante metabólicamente estable) proveniente del reactor alimentado en continuo. Esta primera etapa duró 14 ciclos de operación con una duración de 48 h cada uno. Una vez que el lodo en el reactor SBR llevó a cabo un proceso nitrificante eficiente, completo y estable, se adicionó el BT (5 mg/L) manteniendo una concentración inicial de amonio de 300 mg N/L y ajustando la duración de los ciclos a 35 d (ciclos 15-20). Posteriormente, se aumentó la concentración de amonio a 400 y 500 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L en los ciclos 21 y 22, respectivamente.

#### 6.3.1 Ensayo abiótico sin biomasa en el reactor SBR

Para evaluar si había pérdida de amonio y BT bajo las condiciones experimentales utilizadas en el reactor, se realizó un ensayo abiótico sin biomasa durante 24 h (Figura 19). De acuerdo con la Figura 19, la concentración de amonio se mantuvo constante a un valor promedio de  $345.4 \pm 7.6$  mg N/L y la del BT en un promedio de  $4.9 \pm 0.1$  mg/L con valores de C.V. menores que 2.2% (Tabla 21). Los resultados mostraron que no hubo pérdida de estos compuestos por reactividad química del medio de cultivo, adsorción por el sistema experimental o por volatilización. El pH durante el tiempo de evaluación se mantuvo en un promedio de  $7.3 \pm 0.1$  con un C.V. de 0.8%.

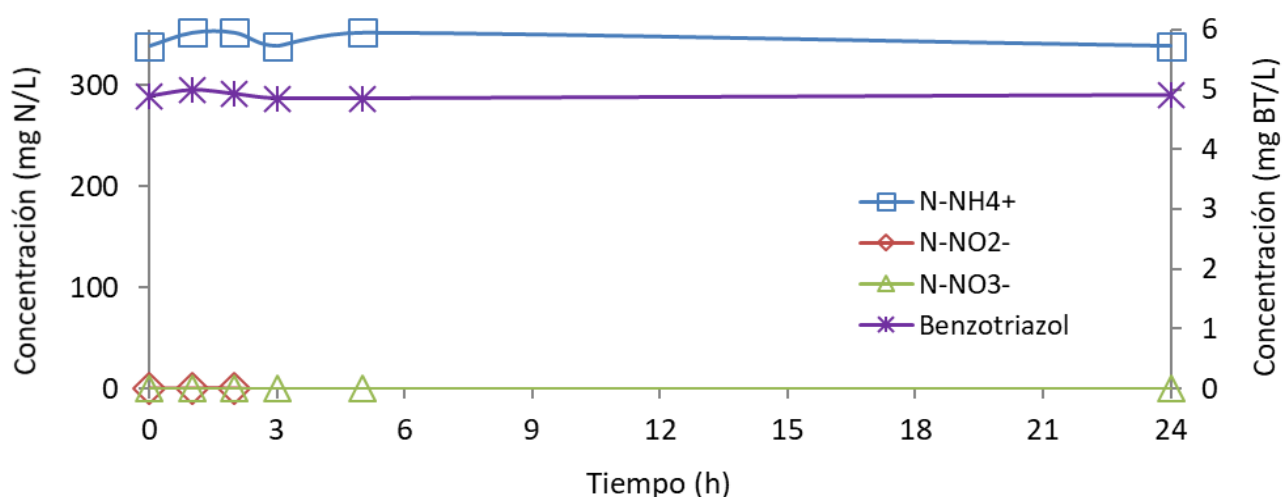


Figura 19. Perfil de las concentraciones en compuestos nitrogenados y benzotriazol en un cultivo abiótico sin biomasa en el reactor SBR: consumo de amonio ( $\square$ ), acumulación de nitrito ( $\diamond$ ), producción de nitrato ( $\Delta$ ) y consumo de BT ( $\times$ ).

Tabla 21. Promedio de las concentraciones en compuestos nitrogenados y benzotriazol en el cultivo abiótico sin biomasa en el reactor SBR.

<b>[N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>] (mg N/L)</b>	<b>[N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>] (mg N/L)</b>	<b>[N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] (mg N/L)</b>	<b>[Benzotriazol] (mg/L)</b>
345.4 ± 7.6	0	0	4.9 ± 0.1
C.V. = 2.2%			C.V. = 1.1%

### 6.3.2 Evaluación de la actividad nitrificante del lodo en el reactor SBR

En ausencia de BT, se evaluó cinéticamente el proceso nitrificante en el ciclo 1 y en el ciclo 14 (Figura 20). En los dos ciclos, el amonio se consumió mayoritariamente durante las primeras 24 h, teniendo al nitrato como producto final. En el ciclo 1, se presentó la acumulación transitoria de nitrito durante las primeras 9 h. De acuerdo con las variables de respuesta calculadas al final de cada ciclo de operación, se obtuvo una eficiencia de consumo de amonio



## Biotransformación del benzotriazol bajo condiciones nitrificantes

de 100%, un rendimiento de conversión a nitrato de uno y no hubo acumulación final de nitrito con rendimientos de cero (Tabla 22).

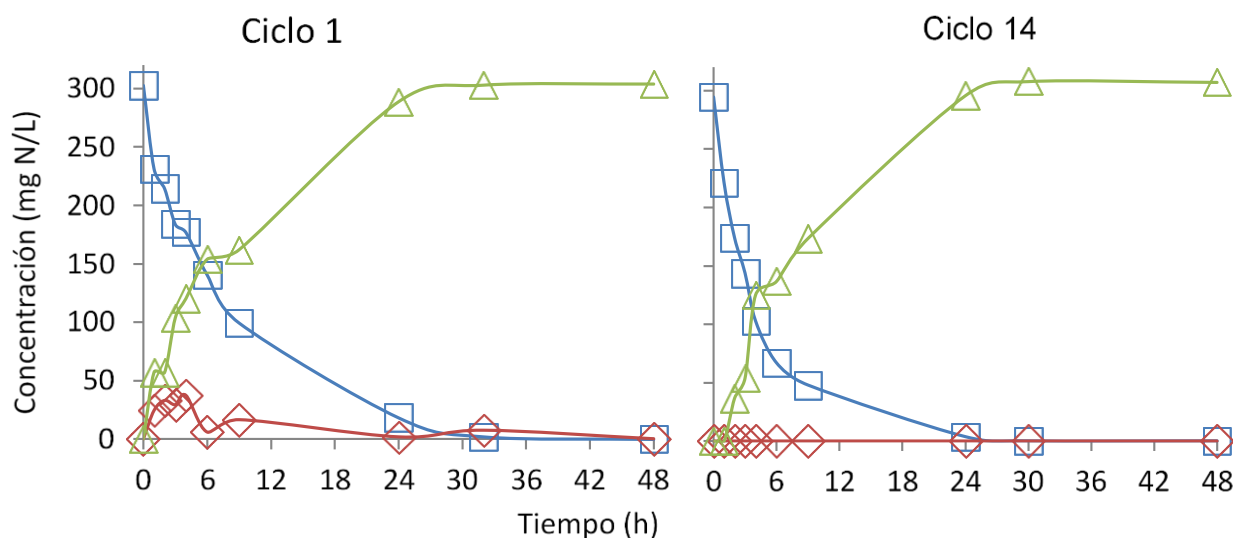


Figura 20. Perfil nitrificante obtenido en un reactor SBR alimentado con 300 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L sin BT a diferentes ciclos de operación: consumo de amonio (□), acumulación de nitrito (◇) y producción de nitrato (△).

Tabla 22. Balance de materia y variables de respuesta del proceso nitrificante en el reactor SBR en ausencia de BT.

Ciclo	Concentración (mg/L)									
	BT	Influyente		Efluente						q <sub>NH4+</sub>
		N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	E <sub>NH4+</sub> (%)	Y <sub>NO2-</sub>	Y <sub>NO3-</sub>		
1	0	302.8	0	0	303.8	100	0	1	1.07	0.90
14	0	294.6	0	0	307.1	100	0	1	2.12	1.17

E<sub>NH4+</sub>: (mg N consumido/mg N alimentado) x 100;

Y<sub>NO2-</sub> y Y<sub>NO3-</sub>: mg N producido/mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> consumido;

q<sub>NH4+</sub> y q<sub>NO3-</sub>: mg N/mg proteína microbiana d (estimada por el modelo ajustado de Gompertz).

## Biotransformación del benzotriazol bajo condiciones nitrificantes

Por otro lado, en la Figura 21 y la Tabla 23, se presentan las concentraciones de alimentación y descarga de los compuestos nitrogenados durante los primeros 14 ciclos de operación previo a la adición de BT. Se puede observar que el amonio se consumió totalmente, obteniendo nitrato como producto final. En cuanto a las variables de respuesta obtenidas durante los primeros 14 ciclos, se determinó una eficiencia de consumo de amonio del  $99.5 \pm 0.6\%$ , un rendimiento de nitrito de cero, un rendimiento de nitrato de  $1 \pm 0.06$  y un rendimiento de biomasa de  $0.03 \pm 0.02$ . La concentración de oxígeno disuelto en el reactor SBR en estos 14 ciclos fue de  $3.7 \pm 0.4$  mg/L. Los valores de pH inicial y final fueron de  $7.1 \pm 0.2$  y  $8.0 \pm 0.2$ , respectivamente. La concentración de biomasa se mantuvo en un valor promedio de  $501 \pm 15$  mg de proteína microbiana/L.

Estos resultados mostraron que las condiciones experimentales utilizadas en el SBR fueron adecuadas para llevar a cabo el proceso nitrificante con  $300$  mg  $\text{N-NH}_4^+$ /L de manera eficiente, completa y estable. El ciclo 14 se tomó como ensayo de referencia para su comparación con los siguientes ciclos con amonio y BT.

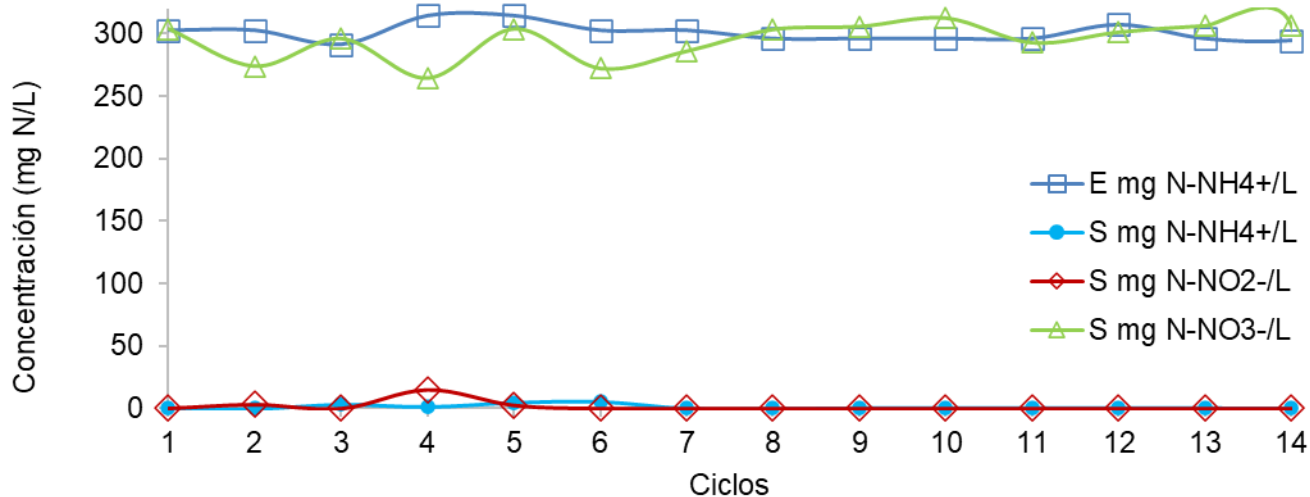


Figura 21. Concentración de alimentación (E) y descarga (S) del reactor de lotes secuenciados (mg N/L): amonio de entrada ( $\square$ ), amonio a la salida ( $\bullet$ ), nitrito a la salida ( $\diamond$ ) y nitrato a la salida ( $\triangle$ ).

## Biotransformación del benzotriazol bajo condiciones nitrificantes

Tabla 23. Concentración promedio de nitrógeno a la entrada (E) y salida (S) del reactor SBR y valores promedio de las variables de respuesta del proceso nitrificante en el reactor.

$[\text{N-NH}_4^+]_E$ (mg/L)	$[\text{N-NH}_4^+]_S$ (mg/L)	$[\text{N-NO}_2^-]_S$ (mg/L)	$[\text{N-NO}_3^-]_S$ (mg/L)
301.0 ± 7.2 C.V. = 2.4%	1.3 ± 1.9	0.7 ± 1.9	298.1 ± 13.3 C.V. = 4.5%
$E_{\text{NH}_4^+}$ (%)	$Y_{\text{NO}_2^-}$	$Y_{\text{NO}_3^-}$	$Y_{\text{BM}}$
99.5% ± 0.6 C.V. = 0.6%	0	1 ± 0.06 C.V. = 6%	0.03 ± 0.02

$E_{\text{NH}_4^+}$ : (mg N consumido/mg N alimentado) x 100;

$Y_{\text{NO}_2^-}$ ,  $Y_{\text{NO}_3^-}$ ,  $Y_{\text{BM}}$ : mg N- $\text{NO}_2^-$ , N- $\text{NO}_3^-$ , N-biomasa formada/mg N- $\text{NH}_4^+$  consumido.

### 6.3.3 Biotransformación del BT en el reactor SBR a 300 mg N- $\text{NH}_4^+$ /L

En la figura 22 se muestra el perfil de la biotransformación del benzotriazol bajo condiciones nitrificantes a 300 mg N- $\text{NH}_4^+$ /L. En el ciclo 15, se puede observar una disminución de la concentración de BT conforme pasa el tiempo (Figura 22), obteniendo una  $E_{\text{BT}}$  del 31.4% después de 35 d y una  $q_{\text{BT}}$  de 0.17 mg BT consumido/g proteína microbiana d (Tabla 24). Con estos resultados se puede observar que el lodo fue capaz de consumir el BT bajo condiciones nitrificantes desde el primer ciclo de adición de BT. En estudios previos, se ha reportado la importancia de la adaptación o aclimatación de los microorganismos a contaminantes tóxicos o recalcitrantes para lograr su biodegradación (Jiang *et al.*, 2016; Martínez-Jardines *et al.*, 2018). En el caso de este estudio, el lodo utilizado no estuvo expuesto al contaminante sino hasta el ciclo 15. Por lo cual, debido a los 14 ciclos de operación bajo condiciones nitrificantes (300 mg N/L) previos a la adición de BT, se favoreció una mayor actividad nitrificante de las AOB y NOB, ya que se duplicó la  $q_{\text{NH}_4^+}$  y aumentó un 30% la  $q_{\text{NO}_3^-}$  del ciclo 1 al ciclo 14 (Tabla 22), lo cual pudiera ser atribuible a la inducción de enzimas, a una mayor actividad enzimática o a un cambio en las poblaciones nitrificantes del lodo microbiano. Esto pudo haber permitido

## Biotransformación del benzotriazol bajo condiciones nitrificantes

que en el ciclo 15 se favoreciera el consumo cometabólico del BT debido a la actividad amonio oxidante de las AOB del lodo.

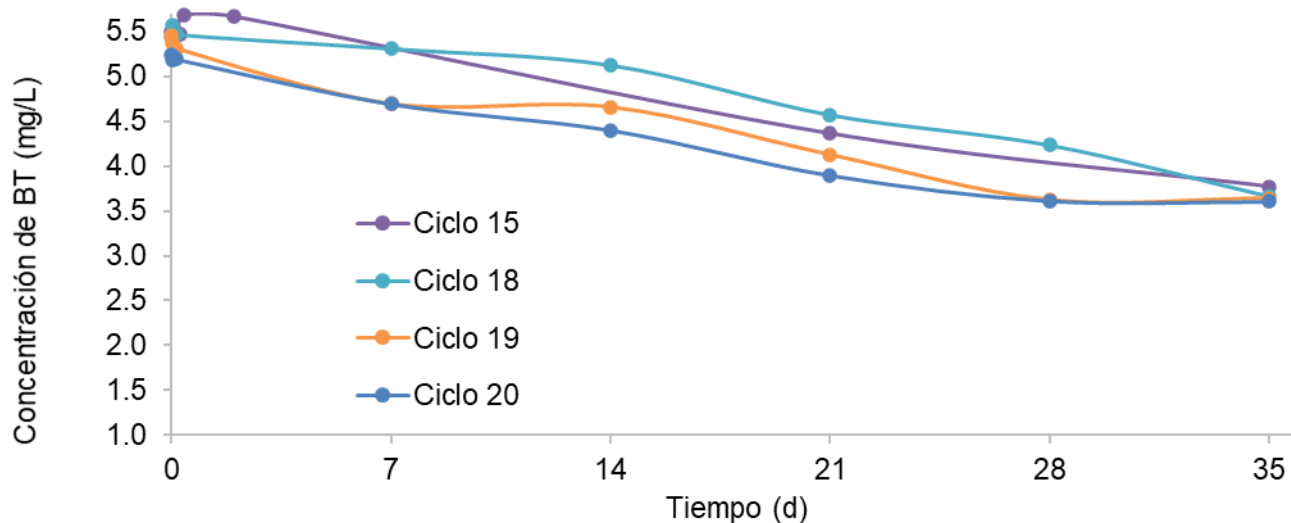


Figura 22. Perfiles de biotransformación del benzotriazol en el reactor SBR a la concentración inicial de amonio (300 mg N/L).

Tabla 24. Biotransformación del benzotriazol en el reactor SBR alimentado con 300 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L.

Ciclo	Concentración (mg/L)		E <sub>BT</sub> (%)	q <sub>BT</sub>	Biomasa
	BT inicial	BT final			
15	5.49	3.77	31.4	0.17	495 (2.0)*
16	5.53	3.85	30.4	-	556 (2.3)*
17	5.62	3.69	34.4	-	588 (2.4)*
18	5.43	3.67	32.6	0.16	599 (2.4)*
19	5.46	3.64	33.4	0.15	441 (1.8)*
20	5.24	3.60	31.3	0.16	317 (1.3)*

E<sub>BT</sub>: (mg BT consumido/mg BT alimentado) x 100;  
q<sub>BT</sub>: mg BT consumido/g proteína microbiana d;  
Biomasa: mg de proteína microbiana/L \*(g SSV/L).

Del mismo modo, en cada uno de los ciclos 18, 19 y 20 se puede observar una disminución de la concentración de BT conforme pasó el tiempo (Figura 22). Con los resultados mostrados en la Tabla 24, a lo largo de los ciclos 15 a 20, la  $E_{BT}$  se mantuvo constante en un promedio de  $32.2 \pm 1.5\%$  con un C.V. del 5%. De manera similar, la  $q_{BT}$  se mantuvo en  $0.16 \pm 0.01$  mg BT consumido/g proteína microbiana d con un C.V. del 4.8%. Algunos autores han reportado un aumento en la eficiencia y en la velocidad específica de consumo de contaminantes orgánicos al paso de los ciclos de operación en reactores nitrificantes SBR, indicando una adaptación metabólica de los lodos (Texier y Gomez, 2007; Silva *et al.*, 2014; Martínez-Jardines *et al.*, 2018). En el presente estudio, no se observó un aumento en la eficiencia y ni en la velocidad específica de consumo de BT por el lodo nitrificante a través de los ciclos de operación del reactor SBR alimentado con 300 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L, posiblemente debido a que no hubo un aumento en el crecimiento de las bacterias AOB o un aumento en la inducción o actividad enzimática de la enzima AMO para biotransformar el BT. Esto confirma la alta recalcitrancia del BT en procesos biológicos, aún en sistemas SBR reportados como favorables a la adaptación metabólica para la biodegradación de contaminantes recalcitrantes.

### **6.3.4 Biotransformación del BT en el reactor SBR al aumentar la concentración inicial de amonio**

Para evaluar el efecto de diferentes concentraciones iniciales de amonio sobre la biotransformación del BT en el reactor SBR, se aumentó la concentración de amonio a 400 y 500 mg N/L en los ciclos 21 y 22, respectivamente, manteniéndose en 500 mg N/L hasta el ciclo 25. En la Figura 23, se pueden observar los perfiles de biotransformación del BT de los ciclos 20, 21 y 22, mostrando una disminución de la concentración del compuesto conforme pasa el tiempo hasta los 35 d de cultivo. La  $E_{BT}$  fue del 31.3% en el ciclo 20, incrementándose a 48.1 y 65.9% en los ciclos 21 y 22, respectivamente, mientras que la  $q_{BT}$  aumentó de 0.16 a 0.25 y 0.39 del ciclo 20 a los ciclos 21 y 22, respectivamente (Tabla 25). Por otro lado, cuando la concentración de amonio se mantuvo en 500 mg N/L (ciclos 22-25), se obtuvo un consumo de BT constante en un valor promedio de  $E_{BT} = 63.0 \pm 4.4\%$  con un C.V. del 7%. Los resultados muestran que al aumentar la concentración de amonio de 300 a 400 y 500 mg N/L, se vio

## Biotransformación del benzotriazol bajo condiciones nitrificantes

favorecido el consumo cometabólico del BT, incrementándose en 2.1 veces la  $E_{BT}$  y 2.4 veces la  $q_{BT}$  del cultivo con 300 mg N/L con respecto al cultivo con 500 mg N/L (Figura 24). Por lo tanto, estos resultados confirman lo propuesto en los resultados de los estudios en lote, donde se mostró que un aumento en la concentración inicial de amonio como principal fuente de energía para las AOB, pudo resultar en un mayor flujo de energía, el cual pudo ser utilizado para el crecimiento celular de las AOB, para aumentar la inducción de enzimas AMO o aumentar la actividad enzimática de la enzima AMO, lo que pudo propiciar el consumo cometabólico del BT por las AOB a través de la enzima AMO. Por otro lado, aunque se observó un aumento de la  $E_{BT}$  y la  $q_{BT}$  en el sistema SBR, se siguió observando la recalcitrancia de la molécula para su biotransformación en condiciones nitrificantes, ya que se requirió un periodo de 35 días, durante la etapa de reacción biológica, para alcanzar las eficiencias y velocidades obtenidas. Cabe mencionar también que un intermediario de la biotransformación del BT siguió siendo detectado por HPLC (tiempo de retención: 2.3 min).

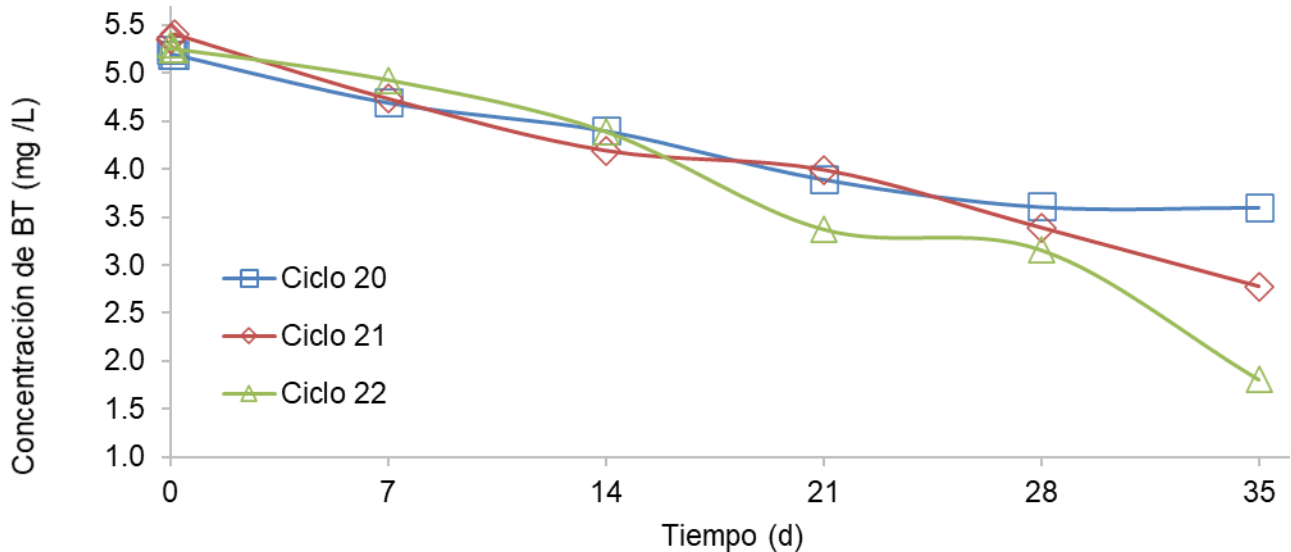


Figura 23. Perfiles de biotransformación del benzotriazol en el reactor SBR al aumentar la concentración inicial de amonio (mg N/L): (□) 300, (◇) 400 y (△) 500.

## Biotransformación del benzotriazol bajo condiciones nitrificantes

Tabla 25. Biotransformación del benzotriazol bajo condiciones nitrificantes en el reactor SBR alimentado con diferentes concentraciones iniciales de amonio.

Ciclo	Concentración (mg/L)			$E_{BT}$ (%)	$q_{BT}$	Biomasa
	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> inicial	BT inicial	BT final			
20	301.5	5.24	3.60	31.3	0.16	317 (1.3)*
21	425.6	5.35	2.78	48.1	0.25	333 (1.4)*
22	495.0	5.30	1.81	65.9	0.39	321 (1.3)*
23	495.0	5.21	2.04	60.8	-	296 (1.2)*
24	495.0	5.43	2.29	57.8	-	277 (1.1)*
25	495.0	5.18	1.69	67.3	-	338 (1.4)*

$E_{BT}$ : (mg BT consumido/mg BT alimentado) x 100,

$q_{BT}$ : mg BT consumido/g proteína microbiana d,

Biomasa: mg de proteína microbiana/L \*(g SSV/L).

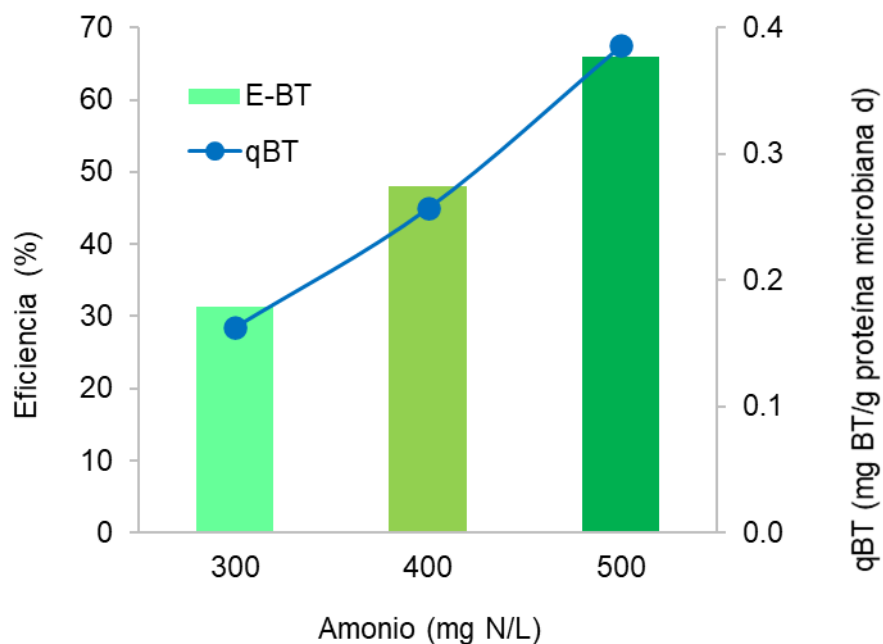


Figura 24. Efecto del aumento de la concentración inicial de amonio sobre la biotransformación de BT en el reactor nitrificante SBR.

### 6.3.5 Efecto del BT sobre el proceso nitrificante en el reactor SBR

En la Figura 25, se muestra el perfil nitrificante durante el ciclo 15, el cual fue el primer ciclo de operación con la adición de BT. El amonio se consumió a las 48 h del cultivo, hubo acumulación transitoria de nitrito durante los primeros días y formación de nitrato durante los primeros 21 d de cultivo, teniendo después de 35 d una  $E_{NH_4^+} = 100\%$  y un  $Y_{NO_3^-}$  cercano a 1 (Tabla 27). Estos resultados muestran que el BT alteró a la nitrificación, ya que, aunque el proceso nitrificante se realizó de manera completa, tardó más días en llevarse a cabo en comparación con el ciclo 14 sin BT (Figura 20, Tabla 22). Sin embargo, aunque se muestra un efecto inhibitorio del BT sobre las velocidades de la nitrificación (40% de disminución en  $q_{NH_4^+}$  y 79.5% de disminución en  $q_{NO_3^-}$ ), el proceso nitrificante se llevó a cabo de manera completa, es decir el amonio consumido fue transformado hasta nitrato como producto final de la nitrificación.

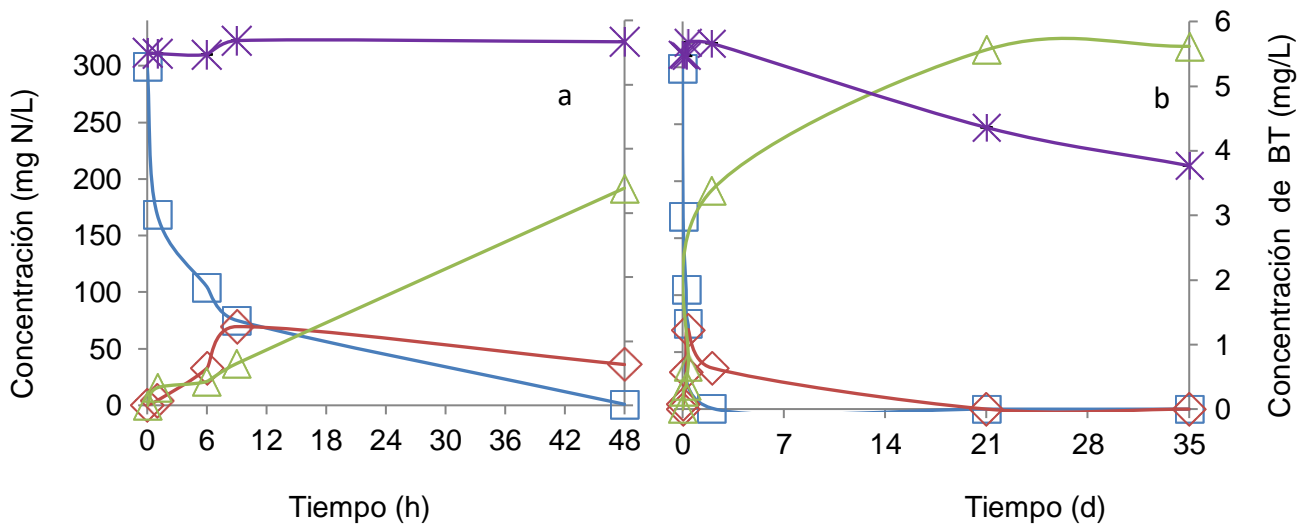


Figura 25. Perfil nitrificante obtenido en un reactor SBR alimentado con 300 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L y 5 mg BT/L en el ciclo 15, a) en las primeras 48 horas del cultivo y b) con escala completa de los 35 días: consumo de amonio (□), acumulación de nitrito (◇), producción de nitrato (△) y consumo de BT (X).



## Biotransformación del benzotriazol bajo condiciones nitrificantes

Tabla 26. Variables de respuesta del proceso nitrificante en el reactor SBR alimentado con 300, 400 y 500 mg N/L de amonio y 5 mg de BT/L.

Ciclo	Concentración inicial (mg/L)		$E_{NH_4^+}$ (%)	$Y_{NO_2^-}$	$Y_{NO_3^-}$	$q_{NH_4^+}$	$q_{NO_3^-}$	Biomasa
	BT	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>						
14	0	294.6	100	0	1	0.10	1.17	498
15	5.49	299.0	100	0	1.06	0.06	0.24	495
18	5.43	302.0	100	0	0.98	0.09	0.08	599
19	5.46	298.6	100	0	1.03	0.11	0.08	441
20	5.24	301.5	100	0	1.07	0.11	0.03	317
21	5.35	425.6	100	0	1.00	0.15	0.04	333
22	5.30	495.0	100	0	0.99	0.16	0.06	321
23	5.21	495.0	100	0	1.03	-	-	296
24	5.43	495.0	100	0	1.05	-	-	277
25	5.18	495.0	100	0	1.03	-	-	338

$E_{NH_4^+}$ : (mg N consumido/mg N alimentado) x 100;

$Y_{NO_2^-}$  y  $Y_{NO_3^-}$ : mg N producido/mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> consumido;

$q_{NH_4^+}$  inicial (estimada por la ecuación de la recta) y  $q_{NO_3^-}$  (estimado por el modelo ajustado de Gompertz): mg N/mg proteína microbiana d;

Biomasa: mg de proteína microbiana/L.

Durante cinco ciclos más en el reactor SBR, se mantuvo una alimentación con 300 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L y 5 mg BT/L. En la Figura 26, se muestra el perfil del proceso nitrificante en el reactor SBR en presencia del BT del ciclo 18, 19 y 20. En estos ciclos, se observó un perfil similar con una disminución de la concentración de amonio durante los primeros 7 d, sin acumulación de nitrito y con la formación mayoritaria de nitrato después de 21 d de cultivo.

## Biotransformación del benzotriazol bajo condiciones nitrificantes

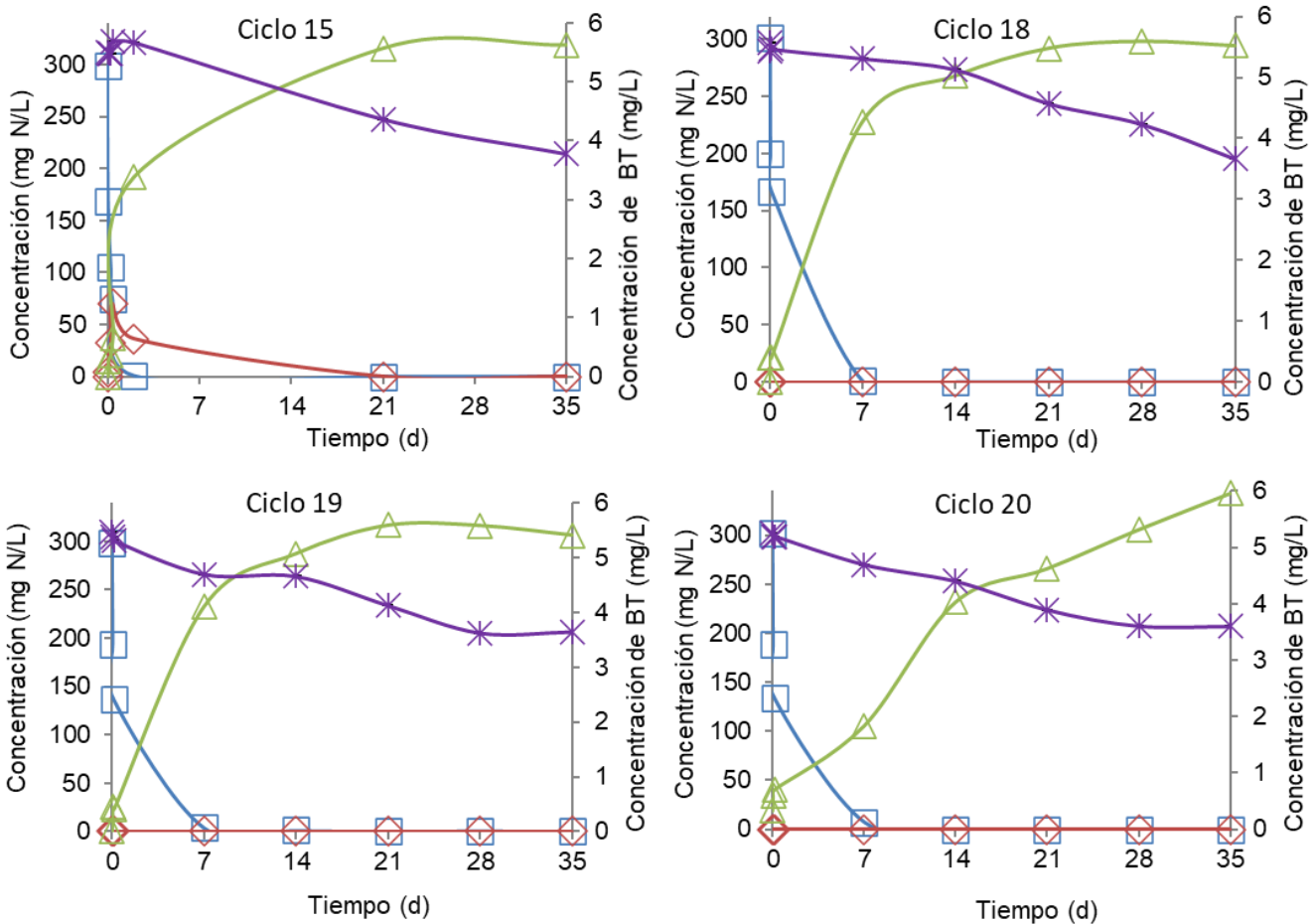


Figura 26. Perfil nitrificante obtenido en un reactor SBR alimentado con 300 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L y 5 mg BT/L a diferentes ciclos de operación: consumo de amonio (□), acumulación de nitrito (◇), producción de nitrato (△) y consumo de BT (X).

En la Tabla 26, se muestra que las variables fisiológicas de la nitrificación se mantuvieron constantes, teniendo  $E_{NH_4^+}$  de 100% y rendimientos de nitrato de uno. Sin embargo, las variables cinéticas sufrieron cambios. Cabe mencionar que para fines de comparación de las velocidades entre los diferentes ciclos (ciclos 14-20) y dada la falta de datos experimentales para el consumo de amonio de los ciclos 18 a 20, se decidió en este caso particular, calcular la velocidad inicial de consumo de amonio, durante las tres primeras horas de cultivo, a través de la pendiente obtenida mediante una regresión lineal. Las velocidades específicas de producción de nitrato, se siguieron determinando usando el modelo ajustado de Gompertz. El efecto del BT sobre el proceso amonio oxidante en el ciclo 18 disminuyó respecto al ciclo 15.

Asimismo, a través de los ciclos de operación, aumentó la  $q_{\text{NH}_4^+}$  y alcanzó valores cercanos al valor del ciclo 14 de referencia, desapareciendo el efecto inhibitorio del BT. Sin embargo, el proceso nitrato oxidante siguió afectado por la presencia de BT, manteniendo valores muy bajos en la  $q_{\text{NO}_3^-}$  a través de los ciclos. Esto confirma el efecto inhibitorio del BT sobre los procesos oxidativos de la nitrificación, tanto en la amonio oxidación como en la nitrito oxidación. Sin embargo, es notorio cómo permanece la inhibición sobre la nitrito oxidación a través de los ciclos de operación del reactor, sugiriendo que este proceso biológico fuera más sensible al efecto inhibitorio del BT en sistemas dinámicos.

En la Figura 27, se pueden observar los perfiles del proceso nitrificante al aumentar la concentración de 300 mg N/L del ciclo 20 a 400 y 500 mg N/L en los ciclos 21 y 22, respectivamente, en presencia del BT. En estos ciclos, el proceso nitrificante se llevó a cabo de manera completa en 35 d en presencia de BT con una disminución mayoritaria de la concentración de amonio en los primeros siete días, una acumulación transitoria de nitrito y la formación de nitrato como producto final de la nitrificación. Sin embargo, los perfiles de la formación de nitrito y nitrato no corresponden al amonio consumido, quedando el balance de nitrógeno incompleto durante la mayoría del tiempo de cultivo. Esto podría ser debido a que el BT en la etapa de conversión de amonio a nitrito por las AOB haya afectado la actividad de la enzima hidroxilamina oxidorreductasa (HAO) y provocado una acumulación de hidroxilamina en el medio y por lo tanto el retardo en la formación de nitrito (Aceves Zamora, 2017; Bejarano-Ortiz *et al.*, 2020). Se necesitan más estudios al respecto para evaluar el efecto inhibitorio del BT en la enzima HAO.

## Biotransformación del benzotriazol bajo condiciones nitrificantes

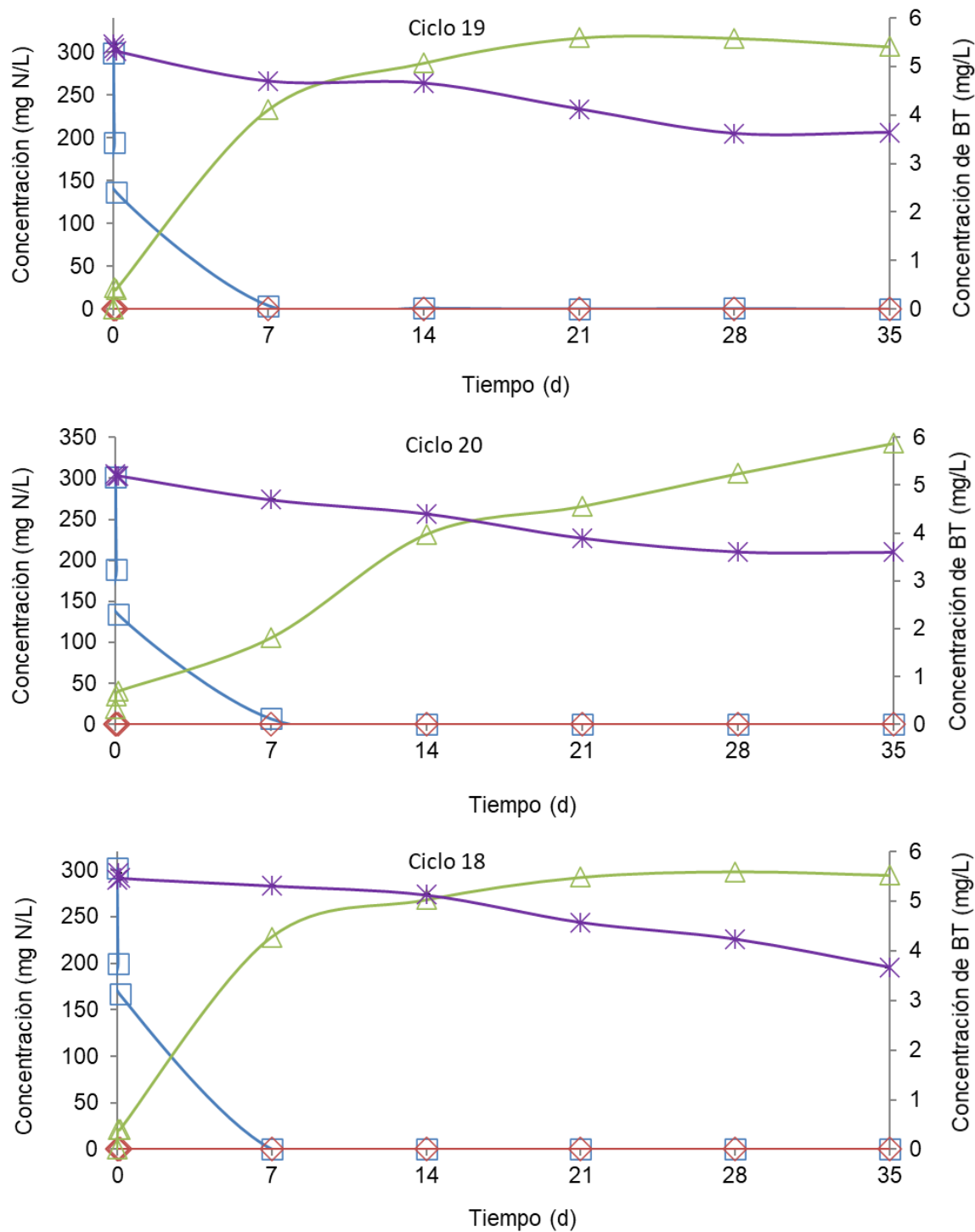


Figura 27. Perfil del proceso nitrificante obtenido en un reactor SBR con 300, 400 y 500 mg N/L de amonio a diferentes ciclos de operación en presencia de BT (5 mg/L): consumo de amonio (□), acumulación de nitrito (◇), producción de nitrato (△) y consumo de BT (X).

En la Tabla 26, se muestran las variables de respuesta del proceso nitrificante del ciclo 20 al ciclo 25, las cuales permanecieron estables y no se vieron más afectadas por la presencia de BT, ni al aumentar la concentración de amonio de 300 a 500 mg N/L, mostrando  $E_{\text{NH}_4^+}$  del 100%, rendimientos de nitrito de cero y rendimientos de nitrato cercanos a uno. Respecto a las velocidades de la nitrificación, se sigue observando que permaneció el efecto inhibitorio del BT sobre la nitrito oxidación, esto comparando los valores de  $q_{\text{NO}_3^-}$  con el valor de 1.17 mg N/mg proteína microbiana  $d$  obtenido en el ciclo 14 de referencia sin BT. Sin embargo, aunque se presentó la inhibición sobre la  $q_{\text{NO}_3^-}$ , se consume todo el amonio y se transforma hasta nitrato como producto final de la nitrificación.

En este trabajo, en los estudios en lote con 300 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L y 5 mg BT/L, se determinó que el BT causó una disminución en el consumo de amonio y después de 49 días de cultivo se obtuvo una  $E_{\text{NH}_4^+}$  de 77.6% y una inhibición mayor al 90% en las velocidades ( $q_{\text{NH}_4^+}$  y  $q_{\text{NO}_3^-}$ ) respecto al cultivo de referencia sin BT. A diferencia de los cultivos en lote con el estudio en el reactor SBR, no fue tan afectado el consumo de amonio (300 mg N/L) teniendo una eliminación del 100% en 7 días con 5 mg BT/L. Estas diferencias podrían en parte explicarse por una mejora en la actividad amonio oxidante del lodo en el reactor a través de los ciclos, aunque los resultados sugirieron también un posible efecto negativo sobre la oxidación de hidroxilamina a nitrito en el sistema dinámico.

### 7 Conclusiones y perspectivas

#### Estudios en los cultivos en lote

Bajo las condiciones nitrificantes usadas en los cultivos en lote, el lodo producido en un reactor continuo con una nitrificación estable presentó la capacidad cometabólica de biotransformar el benzotriazol en la presencia obligatoria de amonio, fuente principal de energía para las bacterias amonio oxidantes.

El consumo de benzotriazol se vio favorecido con el aumento de la concentración inicial de amonio de 100 a 200 y 300 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L, aumentando tanto la eficiencia como la velocidad específica de consumo de benzotriazol.

A una concentración de 300 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L, se obtuvo una eficiencia de biotransformación de benzotriazol del 40.8% en 49 días.

La biotransformación cometabólica del benzotriazol por las bacterias amonio oxidantes estuvo asociada en su totalidad con la participación de la enzima amonio monooxigenasa.

Al agregar acetato como fuente de energía para las bacterias heterótrofas, no se favoreció el consumo de benzotriazol.

En los cultivos nitrificantes (100, 200 y 300 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L), el benzotriazol (5 mg/L) causó una disminución (12-36%) en la eficiencia de consumo de amonio, sin embargo, el rendimiento de nitrato siguió siendo alto y no hubo acumulación de nitrito, por lo tanto todo el amonio consumido fue transformado hasta nitrato sin que se viera afectada la ruta metabólica nitrificante. Y el efecto inhibitorio del benzotriazol sobre los procesos amonio y nitrito oxidantes de la nitrificación fue evidenciado a través de disminuciones en las velocidades específicas de consumo de amonio (entre el 93.4 y 99.7%) y de formación de nitrato (del 90.3 al 99.5%).

### Estudios en el reactor SBR

El lodo con una nitrificación estable fue capaz de consumir el benzotriazol (5 mg/L) bajo condiciones nitrificantes (300 mg N/L) desde el primer ciclo de adición del EOC, presentándose valores promedio de  $E_{BT}$  y  $q_{BT}$  del  $32.2 \pm 1.5\%$  y  $0.16 \pm 0.01$  mg BT consumido/g proteína microbiana d, respectivamente, durante 6 ciclos consecutivos de 35 días de operación (ciclos 15-20).

El aumento en la concentración inicial de amonio favoreció el consumo cometabólico del BT, incrementándose 2.1 veces la  $E_{BT}$  y 2.4 veces la  $q_{BT}$  en el cultivo de 500 mg N/L respecto al cultivo con 300 mg N/L. Con 500 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L, se mantuvo una eficiencia de biotransformación del benzotriazol de  $63 \pm 4.4\%$  durante 4 ciclos consecutivos de 35 días (ciclos 22-25).

Con 300, 400 y 500 mg N/L de amonio y 5 mg BT/L, se obtuvo un proceso nitrificante completo en 35 días, con eficiencias de consumo de amonio del 100% después de 7 días y nitrato como producto final de la nitrificación.

La presencia de BT en el reactor nitrificante SBR tuvo un efecto inhibitorio sobre la amonio y nitrito oxidación en los primeros 4 ciclos (ciclos 15-18). A partir del ciclo 19, no hubo inhibición en la amonio oxidación mientras que la inhibición en la nitrito oxidación siguió aumentando a través de los ciclos.

De manera general, a partir de este estudio se puede sugerir que el BT es un sustrato de la enzima AMO y puede provocar un efecto inhibitorio sobre los procesos amonio oxidante y nitrito oxidante de la nitrificación. El aumento en la concentración de amonio se asocia con un incremento en la biotransformación cometabólica del BT por las AOB y se puede utilizar en reactores como el SBR para favorecer la biotransformación del BT.

Sería conveniente hacer más estudios sobre la contribución de las AOB y de la enzima AMO en la biotransformación de los BTs y otros EOCs y seguir investigando el consumo

## Biotransformación del benzotriazol bajo condiciones nitrificantes

---

cometabólico de estos contaminantes por lodos nitrificantes en reactores biológicos. Además, se pueden profundizar los estudios de los lodos nitrificantes en el reactor SBR, utilizando técnicas de biología molecular como secuenciación masiva para relacionar la respuesta fisiológica y cinética del lodo nitrificante en la biotransformación del BT con los posibles cambios en la población microbiana (AOB, NOB y heterótrofos) o por medio de qPCR para dar seguimiento a los genes de las AOB, como el gen *amoA* de la enzima AMO para relacionar los cambios en el tamaño de la población amonio oxidante del lodo con el proceso de biotransformación del amonio y BT a través de los ciclos de operación.



### 8 Bibliografía

1. Aceves, Z.M.L., 2017. Efecto del benzotriazol sobre la nitrificación en un reactor de lote secuenciado (SBR). Tesis de especialidad en Biotecnología, Laboratorio de Fisiología Microbiana, CBS Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México.
2. Ahmed, M.B., Zhou, J.L., Ngo, H.H., Guo, W., Thomaidis, N.S., Xu, J., 2017. Progress in the biological and chemical treatment technologies for emerging contaminant removal from wastewater: a critical review. *J. Hazard. Mater.* 323, 274-298. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.04.045>.
3. Alotaibi, M.D., Patterson, B.M., McKinley, A.J., Reeder, A.Y., Furness, A.J., Donn, M.J., 2015. Fate of benzotriazole and 5-methylbenzotriazole in recycled water recharged into an anaerobic aquifer: Column studies. *Water Res.* 70, 184-195. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2014.11.040>.
4. Anthonisen, A.C., Loehr, R.C., Prakasam, T.B.S., Srinath, E.G., 1976. Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *J. Water Pollut. Control Fed.* 48, 835–852.
5. APHA, 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed. APHA, American Public Health Association. Washington, DC. USA.
6. Arp, D.J., Yeager, C.M., Hyman, M.R., 2001. Molecular and cellular fundamentals of aerobic cometabolism of trichloroethylene. *Biodegradation* 12, 81-103. <https://doi.org/10.1023/A:1012089908518>.
7. Asimakopoulos, A.G., Wang, L., Thomaidis, N. S., Kannan, K., 2013. Benzotriazoles and benzothiazoles in human urine from several countries: a perspective on occurrence,

- biotransformation, and human exposure. *Environ. Int.* 59, 274-281. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.06.007>.
8. Bahnmüller, S., Loi, C.H., Linge, K.L., Gunten, U., Canonica, S., 2015. Degradation rates of benzotriazoles and benzothiazoles under UV-C irradiation and the advanced oxidation process UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Water Res.* 104, 143-154. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2014.12.039>.
  9. Bailey, J.E., Ollis, D.F., 1986. *Biochemical Engineering Fundamentals*, 2nd ed. McGraw-Hill International Editions, Singapore.
  10. Barbosa, M.O., Moreira, N.F.F., Ribeiro, A.R., Pereira, M.F.R., Silva, A.M.T., 2016. Occurrence and removal of organic micropollutants: an overview of the watch list of EU Decision 2015/495. *Water Res.* 94, 257-279. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.02.047>.
  11. Bejarano, O.D.I., 2015. Efecto inhibitorio del sulfuro sobre los procesos amonio y nitrito oxidantes de la nitrificación. Tesis Doctoral en Biotecnología, Laboratorio de Fisiología Microbiana, CBS Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México.
  12. Bejarano-Ortiz, D.I., Martínez Jardines, M.A., Cuervo-López, F.M., Texier, A-C., 2020. Biological ammonium and sulfide oxidation in nitrifying sequencing batch reactor: Kinetic and microbial population dynamics assessments. *Chemosphere.* 253: 126637. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126637>.
  13. Bock, E., Koops, H.-P., Harms, H., Ahlers, B., 1991. The biochemistry of nitrifying organisms. In: Shively J.M., Barton L.L. (eds) *Variations in Autotrophic Life*, Academic Press, London, pp 171-200.

14. Breedveld, G.D., Roseth, R., Sparrevik, M., Hartnik, T., Hem, L.J., 2003. Persistence of the deicing additive benzotriazole at an abandoned airport. *Water Air Soil Pollut.* 3, 91–101. <https://doi.org/10.1023/A:1023961213839>.
15. Cancilla, D.A., Martínez, J., Van Aggelen, G.C., 1998. Detection of aircraft deicing/antiicing fluid additives in a perched water monitoring well at an international airport. *Environ. Sci. Technol.* 23, 3844-3835.
16. Chen, Y., Lan, S., Wang, L., Dong, S., Zhou, H., Tan, Z., Li, X., 2017. A review: Driving factors and regulation strategies of microbial community structure and dynamics in wastewater treatment systems. *Chemosphere* 174, 173-182. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.01.129>.
17. Chung, K.H.-H., Lin, Y.-C., Lin, A.Y.-C., 2018. The persistence and photostabilizing characteristics of benzotriazole and 5-methyl-1H-benzotriazole reduce the photochemical behavior of common photosensitizers and organic compounds in aqueous environments. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 5911-5920. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0900-7>.
18. Coelho, M.A.Z., Russo, C., Araujo, O.Q.F. 2000. Optimization of a sequencing batch reactor for biological nitrogen removal. *Water Res.* 34, 2809 - 2817. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00010-5](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00010-5).
19. Collado, N., Buttiglieri, G., Marti, E., Ferrando-Climent, L., Rodríguez-Mozaz, S., Barceló, D., Comas, J., Rodríguez-Roda, I., 2013. Effects on activated sludge bacterial community exposed to sulfamethoxazole. *Chemosphere* 93, 99-106. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.04.094>.
20. Dalton, H., Stirling, D.I., 1982. Co-metabolism. *Biol. Sci. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B.* 297, 481-496. <https://doi.org/10.1098/rstb.1982.0056>.

21. De Gusseme, B., Pycke, B., Hennebel, T., Marcoen, A., Vlaeminck, S.E., Noppe, H., Boon, N., Verstraete, W., 2009. Biological removal of 17  $\alpha$ -ethinylestradiol by a nitrifier enrichment culture in a membrane bioreactor. *Water Res.* 43, 2493-2503. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.02.028>
22. Dorival-Garcia, N., Zafra-Gomez, A., Navalon, A., Gonzalez-Lopez, J., Hontoria, E., Vilchez, J.L., 2013. Removal and degradation characteristics of quinolone antibiotics in laboratory-scale activated sludge reactors under aerobic, nitrifying and anoxic conditions. *J. Environ. Manage.* 120, 75-83. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.02.007>.
23. Dutta, A., Sarkar, S., 2015. Sequencing batch reactor for wastewater treatment recent advances. *Curr. Pollution Rep.* 1, 177-190. <https://DOI 10.1007/s40726-015-0016>.
24. Felis, E., Sochacki, A., Magiera, S., 2016. Degradation of benzotriazole and benzothiazole in treatment wetlands and by artificial sunlight. *Water Res.* 104, 441-448. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2016.08.037>.
25. Fernandez-Fontaina, E., Omil, F., Lema, J.M., Carballa, M., 2012. Influence of nitrifying conditions on the biodegradation and sorption of emerging micropollutants. *Water Res.* 46, 5434- 5444. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.07.037>.
26. García, J., García-Galán, M.J., Day, J.W., Boopathy, R., White, J.R., Wallace, S., Hunter, R.G., 2020. A review of emerging organic contaminants (EOCs), antibiotic resistant bacteria (ARB), and antibiotic resistance genes (ARGs) in the environment: Increasing removal with wetlands and reducing environmental impacts. *Bioresour. Technol.* 307, 123228. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123228>.
27. García-Rodríguez, A., Matamoros, V., Fontas, C., Salvado, V., 2014. The ability of biologically based wastewater treatment systems to remove emerging organic

- contaminants – a review. *Environ Sci Pollut Res* 21, 11708-11728. [https://DOI 10.1007/s11356-013-2448-5](https://doi.org/10.1007/s11356-013-2448-5).
28. Ge, S., Wang, S., Yang, X., Qiu S., Li, B., Peng, Y., 2015. Detection of nitrifiers and evaluation of partial nitrification for wastewater treatment: A review. *Chemosphere* 140, 85-98. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.02.004>.
29. Gomez, J., Mendez, R., Lema, J.M., 2000. Kinetic study of addition of volatile organic compounds to a nitrifying sludge. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 87, 189–202. <https://doi.org/10.1385/ABAB:87:3:189>.
30. Hanaki, K., Wantawin, C., Ohgaki, S., 1990. Nitrification at low levels of dissolved oxygen with and without organic loading in a suspended-growth reactor. *Wat. Res.* 24, 297-302.
31. Hart, D.S., Davis, L.C., Erickson, L.E., Callender, T.M., 2004. Sorption and partitioning parameters of benzotriazole compounds. *Microchem. J.* 77, 9-17. <https://doi:10.1016/j.microc.2003.08.005>.
32. Helbling, D.E., Johnson, D.R., Honti, M., Fenner, K., 2012. Micropollutant Biotransformation Kinetics Associate with WWTP Process Parameters and Microbial Community Characteristics. *Environ. Sci. Technol.* 46, 10579-10588. <https://doi.org/10.1021/es3019012>.
33. Herrero, P., Borrull, F., Pocurrull, E., Marcé, R.M., 2014. An overview of analytical methods and occurrence of benzotriazoles, benzothiazoles and benzenesulfonamides in the environment. *Trends Anal. Chem.* 62, 46-55. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2014.06.017>.
34. Herzog, B., Huber, B., Lemmer, H., Horn, H., Müller, E., 2013. Analysis and *in situ* characterization of activated sludge communities capable of benzotriazole biodegradation. *Environ. Sci. Eur.* 25 (31), 1-8. <https://doi.org/10.1186/2190-4715-25-31>.

35. Herzog, B., Lemmer, H., Huber, B., Horn, H., Müller, E., 2014. Xenobiotic benzotriazoles-biodegradation under meso- and oligotrophic conditions as well as denitrifying, sulfate-reducing, and anaerobic conditions. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 2795-2804. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2199-3>.
36. Huntscha, S., Hofstetter, T.B., Schymanski, E.L., Spahr, S., Hollender, J., 2014. Biotransformation of benzotriazoles: Insights from transformation product identification and compound-specific isotope analysis. *Environ. Sci. Technol.* 48, 4435-4443. <https://doi.org/10.1021/es405694z>.
37. Jaramillo, F., Orchard, M., Muñoz, C., Zamorano, M., Antileo, C., 2018. Advanced strategies to improve nitrification process in sequencing batch reactors – A review. 218, 154-164. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.04.019>.
38. Keener, W.K., Arp, D.J., 1993. Transformations of aromatic compounds by *Nitrosomonas europaea*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1914-1920.
39. Khunjar, W.O., Mackintosh, S.A., Skotnicka-Pitak, J., Baik, S., Aga, D.S., Love, N.G., 2011. Elucidating the relative roles of ammonia oxidizing and heterotrophic bacteria during the biotransformation of 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol and Trimethoprim. *Environ. Sci. Technol.* 45, 3605-3612. [dx.doi.org/10.1021/es1037035](https://doi.org/10.1021/es1037035).
40. Kocamemi, B.A., Çeçen F., 2005. Cometabolic degradation of TCE in enriched nitrifying batch systems. *J. Hazard Mater.* B125, 260-265. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2005.06.002>.
41. Kowalska, K., Felis, E., Sochacki, A., Bajkacz, S., 2019. Removal and transformation pathways of benzothiazole and benzotriazole in membrane bioreactors treating synthetic municipal wastewater. *Chemosphere.* 227, 162-171. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.04.037>.

42. Kumwinba, M.N., Meng, F., 2019. Roles of ammonia-oxidizing bacteria in improving metabolism and cometabolism of trace organic chemicals in biological wastewater treatment processes: A review. *Sci. Total Environ.* 659, 419-441. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.236>.
43. Lawson, C.E., Lücker, S., 2018. Complete ammonia oxidation: an important control on nitrification in engineered ecosystems? *Curr. Opin Biotechnol.* 50, 158-165
44. Li, M., Wei, D., Yan, L., Yang, Q., Liu, L., Xu, W., Du, B., Wang, Q., Hou, H. 2020. Aerobic biodegradation of *p*-nitrophenol in a nitrifying sludge bioreactor: System performance, sludge property and microbial community shift. *J. Environ. Manag.* 265, 110542. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110542>
45. Liang, X., Wang, M., Chen, X., Zha, J., Chen, H., Zhu, L., Wang, W., 2014. Endocrine disrupting effects of benzotriazole in rare minnow (*Gabiocypris rarus*) in a sex-dependent manner. *Chemosphere.* 112, 154-162. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.03.106>.
46. Liu, Y.-S., Ying, G.-G., Shareef, A., Kookana, R.S., 2011. Biodegradation of three selected benzotriazoles under aerobic and anaerobic conditions. *Water Res.* 45, 5005-5014. <https://doi:10.1016/j.watres.2011.07.001>.
47. Liu, Y.-S., Ying, G.-G., Shareef, A., Kookana, R.S., 2013. Biodegradation of three selected benzotriazoles in aquifer materials under aerobic and anaerobic conditions. *J. Contam. Hydrol.* 151, 131-139. <https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2013.05.006>.
48. Loi, C.H., Buseti, F., Linge, K.L., Joll, C.A., 2013. Development of a solid-phase extraction liquid chromatography tandem mass spectrometry method for benzotriazoles and benzothiazoles in wastewater and recycled water. *J. Chromatogr. A.* 1299, 48-57. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.04.073>.

49. Loos, R., Carvalho, R., António, D.C., Comero, S., Locoro, G., Tavazza, S., Paracchini, B., Ghiani, M., Lettiere, T., Blaha, L., Jarosova, B., Voospoels, S., Servaes, K., Haglund, P., Fick, J., Lindberg, R.H., Schwesing, D., Gawlik, B.M., 2013. EU-wide monitoring survey on emerging polar organic contaminants in wastewater treatment plant effluents. *Water Res.* 47, 6475-6487. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.08.024>.
50. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
51. Mai, L., Akker, B., Du, J., Kookana, R., Fallowfield, H., 2016. Removal of chemicals of concern by high rate nitrifying trickling filters. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 91, 3070-3078. <https://doi.org/10.1002/jctb.4938>.
52. Margot, J., Kienle, C., Magnet, A., Weil, M., Rossi, L., De Alencastro, L.F., Abegglen, C., Thonney, D., Chèvre, N., Schärer, M., Barry, D.A., 2013. Treatment of micropollutants in municipal wastewater: ozone or powdered activated carbon?. *Science of the Total Environment.* 461-462, 480-498. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.05.034>.
53. Margot, J., Lochmatter, S., Barry, D.A., Hollinger, C., 2016. Role of ammonia-oxidizing in micropollutant removal from wastewater with aerobic granular sludge. *Water Sci. Technol.* 73 (3), 564-575. <https://doi.org/10.2166/wst.2015.514>.
54. Martínez, F., Favela-Torres, E., Gomez, J., 2000. Oscillations of exopolymeric composition and sludge volume index in nitrifying flocs. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 87, 177-188. <https://doi:10.1385/abab:87:3:177>.
55. Martínez-Jardines, M., Martínez-Hernández, S., Texier, A.-C., Cuervo-López, F., 2018. 2-Chlorophenol consumption by cometabolism in nitrifying SBR reactors. *Chemosphere.* 212, 41-49. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.08.064>.



56. Martínez-Hernández, S., Texier, A.-C., Cuervo-López, F.M., Gomez, J., 2011. 2-Chlorophenol consumption and its effect on the nitrifying sludge. *J. Hazard Mater.* 185, 1592-1595. <https://doi:10.1016/j.jhazmat.2010.09.100>.
57. Martínez-Hernández, S., Olgúin, E.J., Gómez, J., Cuervo-López, F.M., 2009. Acetate Enhances the Specific Consumption Rate of Toluene Under Denitrifying Conditions. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 57, 679–687. <https://DOI 10.1007/s00244-009-9321-z>.
58. Matamoros, V., Rodríguez, Y., Bayona, J.M., 2017. Mitigation of emerging contaminants by full-scale horizontal flow constructed wetlands fed with secondary treated wastewater. *Ecol. Eng.* 99, 222-227. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.11.054>.
59. Maturano, C.D., 2018. Efecto del benzotriazol en los procesos amonio y nitrito oxidantes de la nitrificación. Tesis de maestría en Biotecnología, Laboratorio de Fisiología Microbiana, CBS Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México.
60. Mazioti, A.A., Stasinakis, A.S., Gatidou, G., Thomaidis, N.S., Andersen, H.R., 2015a. Sorption and biodegradation of selected benzotriazoles and hydroxybenzotriazole in activated sludge and estimation of their fate during wastewater treatment. *Chemosphere.* 131, 117-123. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.03.029>.
61. Mazioti, A.A., Stasinakis, A.S., Pantazi, Y., Andersen, H.R., 2015b. Biodegradation of benzotriazoles and hydroxy-benzothiazole in wastewater by activated sludge and moving bed biofilm reactor systems. *Bioresour. Technol.* 192, 627-635. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.06.035>.
62. Mazioti, A.A., Stasinakis, A.S., Psoma, A.K., Thomaidis, N.S., Andersen, H.R., 2017. Hybrid moving bed biofilm reactor for the biodegradation of benzotriazoles and hydroxy-

- benzothiazole in wastewater. *J. Hazard. Mater.* 323, 299-310. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.06.035>.
63. McAdam, E.J., Bangall, J.P., Koh, Y.K.K., Chiu, T.Y., Pollard, S., Scrimshaw, M.D., Lester, J.N. Cartmell, E., 2010. Removal of steroid estrogens in carbonaceous and nitrifying activated sludge processes. *Chemosphere.* 81, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.07.057>.
64. McCarty, G.W., 1999. Modes of action of nitrification inhibitors. *Biol. Fertil. Soils.* 29, 1–9. <https://doi.org/10.1007/s003740050518>.
65. McCarty, G.W., Bremner, J.M., 1989. Inhibition of nitrification in soil by heterocyclic nitrogen compounds. *Biol. Fertil. Soils.* 8, 204–211. <https://doi.org/10.1007/BF00266480>.
66. Men, Y., Achermann, S., Helbling, D.E., Johnson, D.R., Fenner, K., 2017. Relative contribution of ammonia oxidizing bacteria and other members of nitrifying activated sludge communities to micropollutant biotransformation. *Water Res.* 109, 217-226. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.11.048>.
67. Molins-Delgado, D., Távora, J., Díaz-Cruz, M.S., Barceló, D., 2017. UV filters and benzotriazoles in urban aquatic ecosystems: the footprint of daily use products. *Sci. Total Environ.* 601-602, 975-986. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.176>.
68. Naidu, R., Arias, España, V.A., Liu, Y., Jit, J., 2016. Emerging contaminants in the environment: Risk-based analysis for better management. *Chemosphere.* 154, 350-357. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.03.068>.
69. Nika, M.C., Bletsou, A.A., Koumaki, E., Noutsopoulos, C., Mamais, D., Stasinakis, S.A., Thomaidis, N., 2017. Chlorination of benzothiazoles and benzotriazoles and transformation

products identification by LC-HR-MS/MS. *J. Hazard. Mater.* 323, 400-413. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.03.035>.

70. Nzila, A., 2013. Update on the cometabolismo of organic pollutants by bacteria. *Environ. Pollut.* 178, 474-482. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.03.042>.

71. Petrie, B., Barden, R., Kasprzyk-Hordern, B., 2015. A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. *Water Res.* 72, 3-27. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.08.053>.

72. Reemtsma, T., Miehe, U., Duennbier, U., Jekel, M., 2010. Polar pollutants in municipal wastewater and the water cycle: Occurrence and removal of benzotriazoles. *Water Res.* 44, 596-604. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.07.016>.

73. Ren, Y., Ngo, H.H., Guo, W., Wang, D., Peng, L. Ni, B.-J., Wei, W., Liu, Y., 2020. New perspectives on microbial communities and biological nitrogen removal processes in wastewater treatment systems. *Bioresour. Technol.* 297, 122491. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122491>.

74. Roh, H., Subramanya, N., Zhao, F., Yu, C.-P., Sandt, J., Chu, K.-H., 2009. Biodegradation potential of wastewater micropollutants by ammonia-oxidizing bacteria. *Chemosphere.* 77, 1084-1089. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.08.049>.

75. Salas-Cortés, J.A., Cuervo-López, F.M., Texier, A.-C. 2017. Simultaneous oxidation of ammonium and cresol isomers in a sequencing batch reactor: physiological and kinetic study. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 25667-25675. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6293-1>.

76. Seeland, A., Oetken, M., Kiss, A., Fries, E., Oechlmann, J., 2012. Acute and chronic toxicity of benzotriazoles to aquatic organisms. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 19, 1781-1790. <https://doi.org/10.1007/s11356-011-0705-z>.
77. Shi, J., Fujisawa, S., Nakai, S., Hosomi, M., 2004. Biodegradation of natural and synthetic estrogens by nitrifying activated sludge and ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Water Res.* 38, 2323-2330. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.02.022>.
78. Shi, Z.-Q., Liu, Y.-S., Xiong, Q., Cai, W.-W., Ying, G.-G., 2019. Occurrence, toxicity and transformation of six typical benzotriazoles in the environment: A review. *Sci. Total Environ.* 661, 407-421. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.138>.
79. Silva, L.C.D. 2011. Estudio fisiológico de la nitrificación y oxidación del *p*-cresol en un consorcio nitrificante. Tesis Doctoral. Laboratorio de Fisiología Microbiana, CBS Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México.
80. Silva, C.D., Beristain, M.L., Cuervo-López, F.M., Texier, A.-C., 2014. *p*-Cresol mineralization and bacterial population dynamics in a nitrifying sequential batch reactor. *J. Environ. Sci.* 26, 1885-1893. <https://doi.org/10.1016/j.jes.201406.033>.
81. Silva, C.D., Gómez, J., Houbbron, E., Cuervo-López, F.M., Texier, A.-C., 2009. *p*-Cresol biotransformation by a nitrifying consortium. *Chemosphere* 75, 1387-1391. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.02.059>.
82. Soliman, M., Eldyasti., 2018. Ammonia-Oxidizing Bacteria (AOB): opportunities and applications-a review. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 17, 285-321. <https://doi.org/10.1007/s11157-018-9463-4>
83. Sorensen, J.P.R., Lapworth, D.J., Nkhuwa, D.C.W., Stuart, M.E., Gooddy, D.C., Bell, R.A., Chirwa, M., Kabika, J., Liemisa, M., Chibesa, M., Pedley, S., 2014. Emerging contaminants

in urban groundwater sources in Africa. *Water Res.* 7, 51-63.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2014.08.002>

84. Stasinakis, A.S., Thomaidis, N.S., Arvaniti, O.S., Asimakopoulos, A.G., Samaras, V.G., Ajibola, A., Mamais, D., Lekkas, T.D., 2013. Contribution of primary and secondary treatment on the removal of benzothiazoles, benzotriazoles, endocrine disruptors, pharmaceuticals and perfluorinated compounds in a sewage treatment plant. *Sci. Total Environ.* 463-464, 1067-1075. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.06.087>.
85. Sun, H., Narihiro, T., Ma, X., Zhang, X.-X., Ren, H., Ye, L., 2019 Diverse aromatic-degrading bacteria present in a highly enriched autotrophic nitrifying sludge. *Sci. Total Environ.* 666, 245–251. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.17>.
86. Texier, A.-C., Gomez, J., 2007. Simultaneous nitrification and *p*-cresol oxidation in a nitrifying sequencing batch reactor. *Water Res.* 41, 315-322. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.10.017>.
87. Tran, N.H., Li, J., Hu, J., Ong, S.L., 2014. Occurrence and suitability of pharmaceuticals and personal care products as molecular markers for raw wastewater contamination in surface water and groundwater. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 4727-4740. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2428-9>.
88. Tran, N.H., Urase, T., Kusakabe, O., 2009. The characteristics of enriched nitrifier culture in the degradation of selected pharmaceutically active compounds. *J. Hazard. Mater.* 171, 1051-1057. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.06.114>.
89. Tran, N.H., Urase, T., Ngo, H.H., Hu, J., Ong, S.L., 2013. Insight into metabolic and cometabolic activities of autotrophic and heterotrophic microorganism in the biodegradation of emerging trace organic contaminants. *Bioresour. Technol.* 146, 721-731. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.07.083>.

90. Van Rijn, J., Tal, Y., Schreier, H.J., 2006. Denitrification in recirculating systems: theory and applications. *Aquacult. Eng.* 34(3), 364-376. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2005.04.004>.
91. Wang, L., Asimakopoulos, A.G., Moon, H.-B., Nakata, H., Kannan, K., 2013. Benzotriazole, benzothiazole, and benzophenone compounds in indoor dust from the United States and East Asian countries. *Environ. Sci. Technol.* 47, 4752-4759. <https://doi.org/10.1021/es305000d>.
92. Wang, Y., Zhao, Y., Ji, M., Zhai, H., 2015. Nitrification recovery behavior by bio-accelerators in copper-inhibited activated sludge system. *Bioresour. Technol.* 192, 748-755. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.06.015>.
93. Wang, Y., Dai, C., Zhou, C., Li, W., Qian, Y., Wen, J., Wang, Y., Han, B., Ma, J., Xu, J., Fu, Z., Ruan, H., Tong, H., Jia, X., 2017. Benzotriazole enhances cell invasive potency in endometrial carcinoma through CTBP1-mediated epithelial- mesenchymal transition. *Cell. Physiol. Biochem.* 44, 2357–2367. <https://doi.org/10.1159/000486123>.
94. Wang, B., Ni, B.-J., Yuan, Z., Guo, J., 2019. Insight into the nitrification kinetics and microbial response of an enriched nitrifying sludge in the biodegradation of sulfadiazine. *Environ. Pollut.* 255, Part 1, 113160. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113160>.
95. Wang, L., Zhang, Z., Sun, H., Zhou, Q., 2016. Widespread occurrence of benzotriazoles and benzothiazoles in tap water: influencing factors and contribution to human exposure. *Environ. Sci. Technol.* 50, 2709–2717. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b06093>.
96. Weinberger, R. (1993). *Practical capillary electrophoresis*. Academic Press, San Diego CA. pp 6-7.

97. Xu, Y., Chen, X., Yuan, Z., Ni, B.J., 2018. Modeling of pharmaceutical biotransformation by enriched nitrifying culture under different metabolic conditions. *Environ. Sci. Technol.* 52, 2835-2843. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b00705>.
98. Yi, T., Willie, F., Harper, JR. 2007. The link between nitrification and biotransformation of 17 $\alpha$ -ethinilestradiol. *Environ. Sci. Technol.* 41, 4311-4316. <https://doi.org/10.1021/es070102q>.
99. Yin, S., Li, J., Dong, H., Qiang, Z., 2019. Enhanced nitrogen removal through marine anammox bacteria (MAB) treating nitrogen-rich saline wastewater with Fe (III) addition: Nitrogen shock loading and community structure. *Bioresour. Technol.* 287, 121405. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121405>
100. Yuan, H., Herzog, B., Helmreich, B., Lemmer, H., Müller, E., 2014. Determination of optimal conditions for 5-methyl-benzotriazole biodegradation with activated sludge communities by dilution of the inoculum. *Sci. Total Environ.* 487, 756-762. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.10.111>.
101. Zepeda, A., Texier, A.-C., Razo-Flores, E., Gomez, J., 2006. Kinetic and metabolic study of benzene, toluene, and *m*-xylene in nitrifying cultures. *Water Res.* 40, 1643-1649. <https://doi:10.1016/j.watres.2006.02.012>.
102. Zepeda, A., Texier, A.-C., Gomez, J., 2003. Benzene transformation in nitrifying batch cultures. *Biotechnol. Prog.* 19, 789-793. <https://doi.org/10.1021/bp0201408>.
103. Zepeda, A., Texier, A.-C., Gomez, J., 2007. Batch nitrifying cultures in presence of mixtures of benzene, toluene, and *m*-xylene. *Environ. Technol.* 28, 355-360. <https://doi.org/10.1080/09593332808618796>.

104. Zepeda, P.A. 2005. Efecto de benceno, tolueno y *m*-xileno sobre un cultivo nitrificante. Tesis Doctoral en Biotecnología, Laboratorio de Fisiología Microbiana, CBS Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México.



### Artículo obtenido de la tesis doctoral

- Trejo-Castillo, R., El Kassis, E.G., Cuervo-López, F., Texier, A.-C., 2021. Cometabolic biotransformation of benzotriazole in nitrifying batch cultures. *Chemosphere*. 270, 129461. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129461>

### Participación en congresos de la tesis doctoral

- Trejo-Castillo, R., El Kassis, E.G., Cuervo-López, F., Texier, A.-C., 2021. Consumo cometabólico del benzotriazol en un reactor SBR. XIX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.
- Trejo-Castillo, R., El Kassis, E.G., Cuervo-López, F., Texier, A.-C., 2020. Biodegradación por cometabolismo del benzotriazol en cultivos nitrificantes en lote. XLI Encuentro Nacional. La Ingeniería Química, el Desarrollo Nacional y la Responsabilidad Social.
- Trejo-Castillo, R., El Kassis, E.G., Cuervo-López, F., Texier, A.-C., 2019. Efecto del amonio sobre la biodegradación del benzotriazol en cultivos nitrificantes en lote. Octavo Simposium: Perspectivas en Biotecnología.
- Trejo-Castillo, R., El Kassis, E.G., Cuervo-López, F., Texier, A.-C., 2019. Biodegradación de benzotriazol bajo condiciones nitrificantes. XVIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.
- Trejo-Castillo, R., Cuervo-López, F., Texier, A.-C., 2018. Biodegradation of benzotriazole under nitrifying conditions. The sixth international Symposium on Environmental Biotechnology and Engineering.

# Biotransformación del benzotriazol bajo condiciones nitrificantes



Casa abierta al tiempo  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

## ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00261  
Matrícula: 2173805753

Biotransformación del  
benzotriazol bajo  
condiciones nitrificantes.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 22 del mes de abril del año 2022 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. FLOR DE MARIA CUERVO LOPEZ  
DR. CARLOS DAVID SILVA LUNA  
DR. JESUS EMMANUEL PEREZ ALFARO  
DRA. MARIA DEL CARMEN FAJARDO ORTIZ



RUBEN TREJO CASTILLO  
ALUMNO

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA  
DE: RUBEN TREJO CASTILLO

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

REVISÓ

*[Signature]*  
MTRA. ROSALBA FERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

*[Signature]*  
DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTA

*[Signature]*  
DRA. FLOR DE MARIA CUERVO LOPEZ

VOCAL

*[Signature]*  
DR. CARLOS DAVID SILVA LUNA

VOCAL

*[Signature]*  
DR. JESUS EMMANUEL PEREZ ALFARO

SECRETARIA

*[Signature]*  
DRA. MARIA DEL CARMEN FAJARDO ORTIZ