



**Casa abierta al tiempo**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD IZTAPALAPA**

**EFFECTO DE BENCENO, TOLUENO Y *m*-XILENO SOBRE UN  
CULTIVO NITRIFICANTE.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA**

**P R E S E N T A**

**ALEJANDRO ZEPEDA PEDREGUERA**

**DIRECTOR DE TESIS**

**DR. JORGE GÓMEZ HERNÁNDEZ**

MÉXICO,D.F.

JUNIO 2005.

**Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Fisiología Microbiana del Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.**

*El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Padrón de Postgrados de Excelencia del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo consejo, con el convenio PFP-20-93.*

## INDICE

<b>Resumen</b>	<b>1</b>
<b>Abstract</b>	<b>2</b>
<b>Prólogo</b>	<b>3</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>7</b>
<b>1.1 Eliminación biológica de compuestos nitrogenados</b>	<b>7</b>
1.1.1 Desnitrificación	7
1.1.2 Nitrificación	8
1.1.2.1 Bioquímica y fisiología	9
1.1.2.1.1 <b>Oxidación de amoníaco</b>	9
1.1.2.1.2 <b>Oxidación de nitrito</b>	10
1.1.2.2 Variables de respuesta de un cultivo nitrificante en lote	12
1.1.2.2.1 <b>Velocidades de crecimiento microbiano</b>	12
1.1.2.2.2 <b>Rendimiento del crecimiento celular y del producto</b>	13
1.1.2.2.3 <b>Cinéticas de utilización de nutrientes y formación de producto</b>	13
1.1.2.3 Efecto de factores ambientales sobre el proceso respiratorio nitrificante	16
1.1.2.3.1 Foto sensibilidad	16
1.1.2.3.2 <b>Efecto del oxígeno</b>	16
1.1.2.3.3 <b>Efecto del amonio, nitrito y pH sobre el proceso nitrificante</b>	17
1.1.2.3.4 <b>Efecto de la materia orgánica</b>	18
1.1.2.4 Modos de acción de los inhibidores en la nitrificación biológica	22
1.1.2.4.1 <b>Efecto quelante del inhibidor</b>	22
1.1.2.4.2 <b>Limitación del poder reductor</b>	24
1.1.2.4.3 <b>Formación de enlace covalente con la enzima AMO</b>	25
1.1.2.4.4 <b>Inhibición competitiva y no competitiva</b>	25
1.1.2.4.5 <b>Hidrofobicidad del compuesto inhibitorio</b>	26
<b>1.2 Oxidación de benceno, tolueno y xilenos (BTX)</b>	<b>27</b>
1.2.1 Fuentes de contaminación por BTX	27
1.2.2 Biodegradación heterotrófica de benceno, tolueno y xilenos	28
1.2.2.1 Biodegradación aerobia de benceno, tolueno y xilenos	28
1.2.2.1.1 <b>Biodegradación aerobia asimilativa de benceno, tolueno y xilenos</b>	29
1.2.2.1.2 <b>Biodegradación aerobia desasimilativa de benceno, tolueno y xilenos</b>	34
1.2.2.2 Biodegradación anaerobia de benceno, tolueno y xilenos	35
1.2.3 Biotransformación de compuestos orgánicos en cultivos nitrificantes	38

<b>2.</b>	<b><i>Justificación y objetivos</i></b>	<b>40</b>
2.1	<b>Justificación</b>	<b>40</b>
2.2	<b>Objetivo general</b>	<b>40</b>
2.3	<b>Objetivos particulares</b>	<b>40</b>
<b>3.</b>	<b><i>Material y métodos</i></b>	<b>41</b>
3.1	<b>Métodos analíticos</b>	<b>41</b>
3.1.1	Cuantificación de amonio	41
3.1.2	Cuantificación de nitrito y nitrato	41
3.1.3	Medición de proteína	41
3.1.4	Cuantificación de carbono orgánico e inorgánico	42
3.1.5	Medición de benceno, tolueno y <i>m</i> -xileno	42
3.1.6	Medición de intermediarios aromáticos	42
3.1.7	Medición de ácidos grasos volátiles	43
3.1.8	Medición del oxígeno disuelto	43
3.2	<b>Materiales</b>	<b>44</b>
3.2.1	Reactor continuo nitrificante de tanque agitado	44
3.2.2	Cultivo nitrificante en lote	44
3.2.2.1	Inóculo y medio de cultivo de los ensayos en lote	44
3.2.2.2	Cultivos nitrificantes en lote con benceno, tolueno y <i>m</i> -xileno	45
3.2.2.3	Ensayos de toxicidad	45
3.2.2.4	Estudio cinético del proceso nitrificante en presencia de benceno, tolueno y <i>m</i> -xileno	45
3.2.2.5	Controles	45
3.2.2.5.1	<b>Ensayos abióticos</b>	45
3.2.2.5.2	<b>Ensayos con lodo nitrificante estéril</b>	46
<b>4.</b>	<b><i>Resultados y Discusión</i></b>	<b>47</b>
4.1	<b>Reactor continuo: fuente de inóculo</b>	<b>47</b>
4.2	<b>Efecto del benceno sobre el cultivo nitrificante</b>	<b>48</b>
4.3	Comparación del efecto del benceno, tolueno y <i>m</i> -xileno en forma individual sobre el cultivo nitrificante	50

4.4	Efecto del benceno, tolueno y <i>m</i> -xileno en mezclas binarias y ternarias sobre el cultivo nitrificante.	52
5.	<i>Conclusiones generales</i>	54
6.	<i>Perspectivas</i>	56
7.	<i>Referencias</i>	57
	<i>Anexo I</i>	76
	<i>Anexo II</i>	81
	<i>Anexo III</i>	104

## INDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Ecuaciones estequiométricas relacionadas al modelo de energía de amonio-oxidantes y nitrito-oxidantes (Poughon y col. 2001).</i>	11
<i>Tabla 2 Efecto de compuestos orgánicos sobre la actividad amonio y nitrito-oxidante en un consorcio nitrificante.</i>	19
<i>Tabla 3. Efecto de compuestos orgánicos sobre la oxidación de amoniaco por Nitrosomonas europaea.</i>	20
<i>Tabla 4. Efecto de compuestos orgánicos sobre la oxidación de amoniaco en consorcios nitrificantes.</i>	21
<i>Tabla 5. Características físico-químicas de los BTX (Smallwood 1996; Tiehm y Schulze 2003).</i>	28
<i>Tabla 6. Biodegradación aerobia de benceno, tolueno y xilenos en cultivos en lote y reactores.</i>	31
<i>Tabla 7. Biodegradación asimilativa del benceno, del tolueno y del p-xileno como fuente de carbono por cultivos axénicos.</i>	33
<i>Tabla 8. Velocidades específicas de mineralización de los BTX.</i>	34
<i>Tabla 9. Biodegradación anaerobia de BTX por diferentes fuentes de inóculo con diferentes aceptores de electrones.</i>	36
<i>Tabla 10. Comparación de las velocidades volumétricas de eliminación aerobia y anaerobia de los compuestos BTX.</i>	38
<i>Tabla 11. Oxidación de compuestos orgánicos a través de la AMO, en condiciones nitrificantes, utilizando a Nitrosomonas europaea como fuente de inóculo.</i>	39

## INDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Transferencia de electrones propuesta para la enzima AMO en Nitrosomonas europaea (Shiemke y col. 2004).</i>	25
<i>Figura 2. Perfil de las velocidades de carga y descarga de amonio y nitrato en el reactor continuo.</i>	47

## RESUMEN

La eliminación biológica de los compuestos nitrogenados de las aguas residuales se lleva a cabo a través de la nitrificación y desnitrificación. La nitrificación es un proceso respiratorio aerobio litoautotrófico, en donde se presenta la oxidación sucesiva del amonio a nitrito y luego a nitrato. Se ha observado que algunos compuestos orgánicos, entre ellos los aromáticos, pueden inhibir la nitrificación. Al respecto, poco se sabe del efecto del benceno, del tolueno y del *m*-xileno (BTX) sobre el proceso nitrificante. Por tal motivo, fue evaluado en cultivos en lote, el efecto del benceno, del tolueno y del *m*-xileno en forma individual y en mezcla sobre la actividad de un lodo nitrificante. En los resultados obtenidos en este trabajo se observó que a 5 mg C/l de cada compuesto aromático (individual y en mezcla), la eficiencia de consumo de amonio fue cercana al 100% con un rendimiento de nitrato cercano a 1. Sin embargo, 10 mg C/l de benceno, *m*-xileno y tolueno provocaron una disminución en la eficiencia de consumo de amonio de 57%, 26%, y 0%, respectivamente. Los estudios cinéticos mostraron que los BTX (5-20 mg C/l) provocaron una inhibición, disminuyendo las velocidades específicas de consumo de  $\text{N-NH}_4^+$  (76-99%) y las de producción de  $\text{N-NO}_3^-$  (45-98%). A 10 mg C/l de BTX, el orden de inhibición en la producción del nitrato fue: benceno > *m*-xileno > tolueno, mientras que a 20 mg C/l, el orden cambió a *m*-xileno > tolueno > benceno. Los resultados con mezclas mostraron que el efecto inhibitorio de los BTX sobre el proceso nitrificante tiende a ser superior, que de manera individual, con una mayor disminución en las velocidades específicas. En las pruebas de toxicidad se observó que a 5 mg C/l de BTX, no hubo efecto tóxico sobre el lodo, mientras que de 10 a 50 mg C/l, los microorganismos no recuperaron totalmente su actividad nitrificante. En lo que respecta a la biotransformación de BTX en forma individual, se observó que a una concentración de 5 mg C/l, el benceno se oxidó primero a fenol y luego a acetato. El tolueno fue primeramente oxidado en alcohol bencílico y luego a butirato, mientras que el *m*-xileno fue oxidado en acetato y butirato. En los estudios de BTX en mezclas, después de 24 h, el 50% de los compuestos fueron convertidos en acetato. El orden de biotransformación fue: *m*-xileno > tolueno > benceno. La velocidad de transformación de *m*-xileno fue  $0.051 \pm 0.005$  g C/g N-proteína.h en solución individual y en mezcla. Cuando el *m*-xileno fue agregado, el benceno se oxidó a mayor velocidad ( $0.051 \pm 0.005$  g C/g N-proteína.h) y el tolueno a menor velocidad ( $0.012 \pm 0.002$  g C/g N-proteína.h).



## ABSTRACT

Biological elimination of nitrogenous compounds from wastewaters is generally carried out through the nitrification and denitrification processes. Nitrification is a lithoautotrophic aerobic process where the successive oxidation of ammonium to nitrite and nitrate is carried out. The organic matter, like the aromatic compounds, is inhibitory for nitrification. Little is known about the effect of benzene, toluene and *m*-xylene (BTX) on the nitrifying process. The BTX compounds have been classified as priority pollutants by the Environmental Protection Agency. The effect of benzene, toluene, and *m*-xylene in individual and mixed solutions on the activity of a nitrifying sludge was evaluated in batch cultures. Results showed that at 5 mg C/l of each aromatic compound in individual and mixed solutions the ammonium consumption efficiency was close to 100% with a nitrifying yield for nitrate close to 1. However, benzene, *m*-xylene and toluene at 10 mg C/l decreased ammonium consumption efficiency by 57%, 26%, and 0%, respectively. Kinetic studies showed that BTX (5-20 mg C/l) inhibited the nitrifying process by decreasing the specific rates of  $\text{NH}_4^+$ -N consumption (76-99%) and  $\text{NO}_3^-$ -N production (45-98%). At 10 mg C/l of BTX, the inhibition order on nitrate production was: benzene > *m*-xylene > toluene, while at 20 mg C/l, the order changed to *m*-xylene > toluene > benzene. Results suggested that the inhibitory effect of BTX compounds on the nitrifying process was higher when they were present in mixtures than in individual solutions, with a higher decrease in the specific rates of  $\text{NH}_4^+$ -N consumption and  $\text{NO}_3^-$ -N production. Toxicity tests showed that at 5 mg C/l of BTX, there was no toxic effect on the sludge whereas from 10 to 50 mg C/l, microorganisms did not totally recover their nitrifying activity. At 5 mg C/l, benzene was first oxidized to phenol, which was later completely oxidized to acetate. Toluene was first oxidized to benzyl alcohol, which was later oxidized to butyrate while *m*-xylene was oxidized to both acetate and butyrate. In BTX mixtures, after 24 h, 50% of the compounds was transformed to acetate. The order of biotransformation was: *m*-xylene > toluene > benzene. Transformation rate of *m*-xylene was  $0.051 \pm 0.005$  g C/g protein-N.h in individual and mixed solutions. When *m*-xylene was present, benzene was oxidized at a faster rate than in individual solution ( $0.051 \pm 0.005$  g C/g protein-N.h) while toluene was oxidized at a slower rate ( $0.012 \pm 0.002$  g C/g protein-N.h).

## PROLOGO

Actualmente en México, se tiene un promedio nacional de consumo de agua de 0.25 m<sup>3</sup>/d por habitante, siendo tratada únicamente el 20% del agua residual urbana producida y 12% de la industrial (Monroy y *col.* 2000). Dentro de los contaminantes más importantes en las aguas residuales urbanas e industriales, se encuentran los compuestos nitrogenados y carbonados. Los compuestos nitrogenados existen en muchas formas, debido al número de estados de oxidación que puede presentar el nitrógeno, siendo el amoníaco (NH<sub>3</sub>) la forma más reducida, y el nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) la más oxidada. El nitrógeno amoniacal es la forma nitrogenada que se encuentra principalmente en el ambiente y estrechamente asociado con las plantas, los animales, y el agua residual urbana. El nitrato y el nitrito se encuentran generalmente en concentraciones muy bajas en aguas residuales (Barnes y Bliss 1983; Metcalf y Eddy 1991a). El nitrógeno total (suma de todas las formas nitrogenadas) se ha detectado por encima de los límites máximos permisibles en cuerpos receptores de agua de acuerdo con la Agencia de Protección del Ambiente de los Estados Unidos [US Environmental Protection Agency (U.S. EPA 2001) 10 mg N<sub>total</sub>/l] y la Norma Oficial Mexicana (NOM ECOL 1996) (10-14 mg N<sub>total</sub>/l), provocando problemas de eutrofización y toxicidad sobre los organismos acuáticos (Churchwell y *col.* 1980; Barnes y Bliss 1983; Moat y Foster 1988; Prosser 1989; Metcalf y Eddy 1991b; Sedlak 1991). También se ha observado que el consumo de agua, con una elevada concentración en nitrato o nitrito, puede causar riesgos en la salud, debido a la conversión de estos compuestos a nitrosaminas, las cuales tienen propiedades carcinogénicas (Barnes y Bliss 1983; Moat y Foster 1988). Para evitar estos problemas, la eliminación de los compuestos nitrogenados de las aguas residuales puede llevarse a cabo a través de procesos de tratamiento de tipo fisicoquímico o biológico. Los procesos fisicoquímicos emplean las características propias de los compuestos a tratar, modificando en algunos casos su estado físico, empleando coagulantes, alterando el pH, temperatura, entre otras variables. Dentro de los procesos fisicoquímicos utilizados para eliminar los compuestos nitrogenados se pueden mencionar al arrastre del amoníaco a pH básico y el empleo de resinas de intercambio iónico (Gauntlet 1991). Los procesos fisicoquímicos presentan una alta eficiencia de eliminación de nitrógeno cercana al 100%, sin embargo son costosos debido al elevado consumo de energía y

los gastos de operación. Otra desventaja de los procesos fisicoquímicos es que el problema de contaminación no se resuelve realmente, ya que en algunos casos el contaminante únicamente es trasladado de un sitio a otro. Se puede mencionar el ejemplo de la eliminación del amonio por arrastre, el cual es liberado a la atmósfera (Halling-Sorensen y Jorgensen 1983). Los procesos de tratamiento de tipo biológico presentan las ventajas de ser de bajo costo, pueden ser muy eficientes para tratar efluentes con relativa baja concentración de contaminantes y son procesos amigables con el ambiente.

La eliminación biológica de compuestos nitrogenados de las aguas residuales generalmente se lleva a cabo a través de dos etapas, una aerobia y otra anaerobia, conocidas como la nitrificación y la desnitrificación, respectivamente. La desnitrificación es un proceso respiratorio anóxico llevado a cabo generalmente por microorganismos que emplean al nitrato como aceptor de electrones y a la materia reducida como donador de electrones. El proceso desnitrificante consiste en la reducción de nitrato a nitrógeno molecular ( $N_2$ ) acoplada a la oxidación de la materia orgánica (o inorgánica, como el sulfuro) a  $CO_2$  (o sulfato).

La nitrificación es un proceso respiratorio aerobio litoautotrófico en donde se lleva a cabo la oxidación sucesiva del amonio a nitrito y luego a nitrato. La nitrificación es llevada a cabo por dos grupos de bacterias Gram negativas: las amonio-oxidantes y las nitrito-oxidantes (Prosser 1989; Pantea-Kiser y *col.* 1990; Bock 1991). La nitrificación, debido a su importancia en la eliminación biológica de compuestos nitrogenados del ambiente, ha sido ampliamente estudiada, utilizando tanto consorcios nitrificantes como cultivos axénicos (*Nitrosomonas europaea* y *Nitrobacter Winogradsky*) (Anthonisen y *col.* 1976; Bock 1976; Prosser 1989; Hyman y Arp 1992; Hooper y *col.* 1997).

La naturaleza de los compuestos carbonados presentes en las aguas residuales es muy diversa y depende esencialmente del proceso industrial que los generó. Las industrias químicas y de la refinera del petróleo, son de las principales fuentes de contaminación por hidrocarburos. Dentro de ellos, se encuentran compuestos como el benceno, el tolueno y los xilenos (BTX) (U.S. EPA, 1980). Otra fuente importante de contaminación por BTX, es la causada por derrames accidentales de gasolina y por fugas en los tanques de almacenamiento que se encuentran en el subsuelo, ocasionando contaminación de los suelos y de las aguas subterráneas (Reinhard y *col.* 1997; U.S. EPA 1998b; Hutchins y Miller 1998). La

contaminación de suelo, agua y aire por BTX es un problema serio para la salud de los seres humanos, debido a su carácter tóxico. Existen evidencias, por ejemplo, de que el benceno es inductor de leucemia, de efectos mutagénicos y de anemia aplásica en los seres humanos (IARC 1987; ATSDR 1997; U.S. EPA 1998a). Los BTX debido a sus afecciones sobre la salud humana, han sido clasificados como contaminantes prioritarios por la EPA (U.S. EPA, 1998a) y se establecieron los límites máximos permisibles de estos compuestos en las aguas subterráneas de la siguiente forma (mg/l): benceno, 0.005; tolueno, 1; xileno en todas sus formas isoméricas, 10 y etilbenceno, 0.7. Debido a la importancia de eliminar los compuestos BTX del ambiente, se han desarrollado un gran número de investigaciones sobre su tratamiento biológico. En la mayoría de los estudios, fueron empleadas bacterias heterotróficas para la eliminación biológica aerobia y anaerobia de los BTX, utilizando diferentes aceptores de electrones, tales como el oxígeno, nitrato, sulfato, Fe (III), Mn (II) y Mn (IV), humus, quinonas y CO<sub>2</sub> (Yadav y Reddy 1993; Heider y *col.* 1999; Collins y Daugulis 1999, Cervantes y *col.* 2001). En estos estudios, se pueden encontrar datos de las velocidades de consumo o mineralización de cada uno de los compuestos BTX en forma individual y en mezcla. Se propusieron diferentes rutas metabólicas posibles de eliminación de BTX por procesos heterotróficos aerobios y anaerobios, en donde destacan la participación de las enzimas monooxigenasas y dioxigenasas, las cuales serían responsables de introducir uno o dos átomos de oxígeno en el anillo aromático. En contraste a estas investigaciones, es escaso el conocimiento del efecto toxicológico e inhibitorio de los BTX sobre los microorganismos quimiolitotróficos, como las bacterias nitrificantes. Dado que el tratamiento biológico de aguas por nitrificación es ampliamente utilizado, es necesario tener más información del efecto inhibitorio de los BTX sobre el proceso nitrificante. En los pocos estudios realizados del efecto de los BTX sobre la nitrificación, se emplearon esencialmente cultivos axénicos, particularmente a *Nitrosomonas europaea*, proporcionando información sobre la primera etapa de la nitrificación, es decir, la oxidación de amonio a nitrito. En estos estudios, se evidenció la oxidación del benceno y del tolueno por la enzima amonio monooxigenasa (AMO), provocando la acumulación en el cultivo de intermediarios que conservaron aún el anillo aromático intacto (Stafford 1974; Hyman y *col.* 1985; Keener y Arp 1994). La diversidad de las bacterias que están presentes en consorcios microbianos, utilizados en sistemas de

tratamiento de aguas residuales, ha sido omitida, dejando a un lado las interacciones que podrían existir entre los diferentes microorganismos de un consorcio nitrificante. Conviene añadir que no se ha reportado en la literatura datos cinéticos, como las velocidades específicas de consumo de amonio y producción de nitrito y nitrato, variables de respuesta indispensables para entender mejor los mecanismos de inhibición del proceso nitrificante por la presencia de BTX, lo cual podrá contribuir al diseño de un sistema de tratamiento de aguas residuales contaminados con amonio y BTX.

En base a esta información se propuso en este trabajo contribuir y enriquecer la información sobre este tema, enfocándose principalmente al estudio fisiológico de la nitrificación en presencia de BTX y al estudio metabólico y cinético de estos compuestos en cultivos nitrificantes. La importancia de este estudio recae en el entendimiento del proceso respiratorio de las bacterias amonio y nitrito-oxidantes en presencia de cada uno de los compuestos BTX en forma individual y en mezcla, además de generar información para una mejor comprensión de los mecanismos involucrados en el proceso respiratorio. El propósito general de este estudio es la de evaluar, en cultivos en lote, el efecto inhibitorio, tóxico y la transformación del benceno, tolueno y *m*-xileno en forma individual y en mezcla sobre un consorcio nitrificante producido en un reactor en continuo en estado estacionario.

## 1. INTRODUCCION

### 1.1 *Eliminación biológica de compuestos nitrogenados*

Con el propósito de encontrar un proceso biológico para la eliminación de compuestos nitrogenados, con mayor rendimiento, eficiencia, y menor costo de operación, se han desarrollado nuevas propuestas de tratamiento biológico, tales como la alta conversión de amonio a nitrito en un solo reactor (proceso SHARON: single reactor system for high activity ammonia removal over nitrite), la oxidación anaerobia de amonio (proceso ANAMMOX: anaerobic ammonium oxidation), y la eliminación de amonio completamente autotrófica (proceso CANON: completely autotrophic nitrogen removal over nitrite; OLAND: oxygen-limited autotrophic nitrification/denitrification) (Bock y col. 1995; Mulder y col. 1995; Surmacz-Górska y col. 1997; van Loosdrecht y Jetten 1998; Sliekers y col. 2002; Pollice y col. 2004). Sin embargo, la eliminación biológica de los compuestos nitrogenados de efluentes se lleva a cabo principalmente a través de la desnitrificación y de la nitrificación.

#### 1.1.1 *Desnitrificación*

La desnitrificación es un proceso respiratorio anóxico donde se lleva a cabo la reducción de nitrato hasta nitrógeno molecular ( $N_2$ ). En la ruta metabólica, el nitrato puede ser utilizado por los microorganismos como aceptor de electrones, proceso mediante el cual se obtiene energía al ser reducido hasta  $N_2$  (Shoun y Tanimoto 1991; Zumft 1997). Las bacterias desnitrificantes son de respiración facultativa y en condiciones anóxicas reducen al  $NO_3^-$  a  $N_2$ . El uso del nitrato como aceptor de electrones para formar nitrógeno gaseoso es también conocido como reducción desasimilativa de nitrato. La reducción asimilativa es el proceso en el que nitrato se reduce hasta amoníaco, que puede ser empleado como fuente de nitrógeno para la producción de biomasa microbiana. Dado el carácter respiratorio del proceso desnitrificante, es necesaria la presencia de un sustrato oxidable que suministre energía, y que pueden ser de dos tipos, orgánico e inorgánico, por lo que la desnitrificación puede ser un proceso organotrófico o litoautotrófico. Los géneros desnitrificantes más citados incluyen, *Alcaligenes*, *Aerobacter*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Thiobacillus*, *Thiosphaera* y algunos hongos como *Nuerospora* y *Fusarium*. El primer paso en la ruta metabólica de la desnitrificación es la

reducción de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), catalizado por la enzima nitrato reductasa (Stouthamer 1976; Kroneck y col. 1992). El segundo paso es la reducción de  $\text{NO}_2^-$  a óxido nítrico (NO) por medio de la enzima nitrito reductasa (Jetten y col. 1997). Posteriormente, se lleva a cabo la reducción de NO a óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ), a través de la enzima óxido nítrico reductasa (Goretski y Hollocher, 1990). Por último, se lleva a cabo la reducción de  $\text{N}_2\text{O}$  a  $\text{N}_2$  a través de la enzima óxido nitroso reductasa (Coyle y col. 1985; Andrew y col. 1994). Este último paso es severamente inhibido por la presencia de oxígeno (Ferguson 1994). La desnitrificación es una reacción generadora de iones hidroxilo que tiende a alcalinizar el medio. En la literatura se indica un intervalo de pH muy amplio en el cual se puede llevar a cabo la desnitrificación (valores de pH de 6 a 9) (Christtensen y Harremoes, 1977). El valor de pH idóneo varía dependiendo de la fuente de electrones (Delwiche y Bryan, 1976). Recientemente, en cultivo en continuo con consorcios microbianos y diferentes fuentes de carbono como lactato, acetato y etanol, se observó que en el intervalo de valores de pH de 6 a 9, la desnitrificación se llevó a cabo sin acumulación de intermediarios y con rendimientos (Y) desnitrificantes mayores que 0.95, mientras que a pH de 5, la desnitrificación disminuyó completamente (Pérez 1998). El proceso desnitrificante con fines prácticos es empleado para eliminar materia orgánica y nitrato de aguas residuales, obteniendo como productos finales al  $\text{CO}_2$  y  $\text{N}_2$ . La desnitrificación, tanto con cultivos axénicos, como con consorcios desnitrificantes, se ve fuertemente inhibida en presencia de compuestos aromáticos, tales como benceno, tolueno y xilenos (BTX). El benceno es el compuesto que mayor recalcitrancia presenta bajo condiciones desnitrificantes (Lovley y col. 1996).

### ***1.1.2 Nitrificación***

La nitrificación es la oxidación biológica de amonio a nitrato via nitrito, catalizada principalmente por las bacterias de la familia Nitrobacteriaceae. Esta oxidación ha sido representada principalmente por los géneros *Nitrosomonas* (amonio-oxidantes) y *Nitrobacter* (nitrito-oxidantes). Los microorganismos nitrificantes son quimiolitotrofos Gram negativos y frecuentemente tienden a la formación de flóculos (Prosser 1989; Gómez y col. 1995). El proceso respiratorio nitrificante se realiza mediante dos etapas: 1) oxidación de amoníaco a nitrito (bacterias amonio-oxidantes) y 2) oxidación de nitrito a nitrato (bacterias

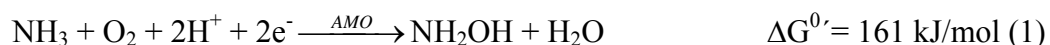
nitrito-oxidantes). Hasta el momento no se han encontrado evidencias de que un único microorganismo sea capaz de oxidar directamente el amonio a nitrato (Prosser 1989; Tijhuis y *col.* 1995). La nitrificación ha sido extensamente investigada debido a su elevada utilidad y aplicación en la eliminación de amonio de aguas residuales. Existe información básica que contribuye a un mejor entendimiento del proceso respiratorio nitrificante (Prosser 1989; Metcalf y Eddy 1991a).

En los siguientes apartados, se describe el proceso nitrificante considerando aspectos tales como: a) la bioquímica y la fisiología de la bacterias nitrificantes, b) el efecto de diferentes factores ambientales sobre el proceso respiratorio nitrificante, c) los modos de acción de los inhibidores en la nitrificación biológica. Asimismo, se proporciona información y evidencias de diferentes autores y se destacan los puntos donde todavía falta información sobre el proceso nitrificante.

### 1.1.2.1 Bioquímica y fisiología

#### 1.1.2.1.1 Oxidación de amoniaco

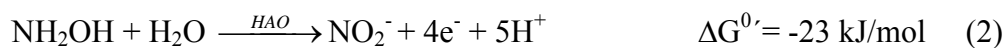
La primera etapa de oxidación del amoniaco, durante la nitrificación, es llevada a cabo por las bacterias amonio-oxidantes, representadas por el género *Nitrosomonas* y en particular por la especie *Nitrosomonas europaea*. En esta etapa, la oxidación del amoniaco a nitrito se realiza a través de dos reacciones. La primera de ellas es la oxidación de amoniaco a hidroxilamina (NH<sub>2</sub>OH), catalizada por una enzima ubicada en el espacio periplásmico, la amonio monooxigenasa (AMO) (Hollecher y *col.* 1981). El mecanismo de reacción de la AMO fue propuesto como un ciclo catalítico similar a la tirosinasa, involucrando al O<sub>2</sub> como fuente de oxígeno (Prosser 1989). Durante esta reacción uno de los dos átomos de oxígeno es transferido al amoniaco, formando hidroxilamina (NH<sub>2</sub>OH), mientras que el otro está involucrado en la formación de agua (ecuación 1) (Hollecher y *col.* 1981).



La segunda reacción es la oxidación de la hidroxilamina a nitrito, catalizada por la hidroxilamina oxidoreductasa (HAO), localizada en la espacio periplásmico (Igarashi y *col.*



1997; Whittaker y *col.* 2000). Esta enzima utiliza a la  $\text{NH}_2\text{OH}$  como donador de electrones al  $\text{O}_2$ , NADH. En esta reacción se producen cuatro electrones (ecuación 2). De estos, únicamente dos electrones son empleados en la hidroxilación inicial del amonio a  $\text{NH}_2\text{OH}$  vía el citocromo-554. Se asume que los dos restantes equivalentes reductores son utilizados en la generación de ATP y NADH. Para ello, la generación de poder reductor implica el funcionamiento de una cadena de transporte inverso de electrones a partir del ATP, derivado de la cadena respiratoria (Yamanaka y Shinra 1974; Hyman y Wood 1985; Arciero y *col.* 1991). El ATP es utilizado para fijar el  $\text{CO}_2$  por el ciclo de Benson-Calvin. Para ilustrar esto es importante considerar que para fijar un mol de  $\text{CO}_2$  es necesaria la oxidación de 2 moles de NADPH y la hidrólisis de 3 moles de ATP (Wood 1986; Moat y Foster 1988; Parés y Juárez 1997). Si se considera que la oxidación del amonio a nitrito y nitrato tiene un cambio de energía libre bajo, es previsible que la producción de ATP, será también baja. Por lo tanto, la producción en biomasa nitrificante será siempre escasa, debido la baja disponibilidad de energía.



Se han determinado valores de rendimiento celular ( $Y_{x/s}$ ) de 0.08 g células/g  $\text{N-NH}_4^+$  para las amonio-oxidantes y 0.05 g células/g  $\text{N-NO}_2^-$  para las nitrito-oxidantes (Wiesmann 1994), valores que pueden variar según las condiciones ambientales imperantes.

Por otra parte, durante la oxidación global de amoníaco hasta nitrato se producen iones hidrógeno en el medio de cultivo propiciando una acidificación del ambiente, lo que podría inhibir la oxidación de amoníaco a valores de  $\text{pH} \leq 6$ . A estos valores de pH, el equilibrio  $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$  ( $\text{pK}_a = 9.2$  a  $25^\circ\text{C}$ ) es desplazado hacia la formación de ión amonio, disminuyendo la disponibilidad del amoníaco, que es la especie con menor  $K_s$  (Suzuki y *col.* 1974; Stein y *col.* 1997).

#### **1.1.2.1.2 Oxidación de nitrito**

La segunda etapa de la nitrificación es la oxidación de nitrito a nitrato (ecuación 3) y es realizada por las bacterias nitrito-oxidantes, frecuentemente representadas por el género *Nitrobacter*. El oxígeno utilizado proviene del agua (Aleem y *col.* 1965). Esta oxidación

ocurre sin intermediarios detectables y es llevada a cabo por un complejo enzimático, la nitrito oxidoreductasa (NOR), formado por el citocromo c, una quinona y una deshidrogenasa dependiente de NADH y se encuentra localizado en el lado interno de la membrana citoplasmática (Tsien y *col.* 1968; Sunder y *col.* 1984; Spieck y *col.* 1998).



Durante la oxidación se ha observado que el par  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  genera un potencial de  $E^{\circ'} = +430$  mV, el cual puede ser empleado en la fosforilación oxidativa (Gómez y *col.* 1995). En la Tabla 1, se presentan las reacciones para la producción de energía en *Nitrosomonas* y *Nitrobacter* (Poughon y *col.* 2001).

**Tabla 1.** Ecuaciones estequiométricas relacionadas al modelo de energía de amonio-oxidantes y nitrito-oxidantes (Poughon y *col.* 2001).

Reacciones en <i>Nitrosomonas</i>		$\Delta G$ (kJ/mol)
$\text{NH}_4^+$	$\longrightarrow$	$\text{NH}_3 + \text{H}^+_{\text{sal}}$
$\text{NH}_3^+ + \text{O}_2 + \text{UQH}_2 + 2\text{H}^+_{\text{ent}}$	$\xrightarrow{\text{HAO}}$	$\text{NH}_2\text{OH} + \text{UQ} + \text{H}_2\text{O} + 2\text{H}^+_{\text{sal}}$
$\text{NH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O} + 2\text{Cyt } c_{554}^{2+}$	$\longrightarrow$	$\text{NO}_2^- + 2\text{Cyt } c_{554} + 5\text{H}^+_{\text{sal}}$
$\text{Cyt } c_{554} + \text{UQ} + 2\text{H}^+_{\text{sal}}$	$\longrightarrow$	$\text{Cyt } c_{554} + \text{UQH}_2$
$\text{Cyt } c_{554} + 2\text{Cyt } c_{552}, \text{Fe}^{3+}$	$\longrightarrow$	$2\text{Cyt } c_{554}^{2+} + 2\text{Cyt } c_{552}, \text{Fe}^{2+}$
$\text{UQH}_2 + 2\text{Cyt } c_{552}, \text{Fe}^{3+} + 4\text{H}^+_{\text{ent}}$	$\longrightarrow$	$\text{UQ} + 2\text{Cyt } c_{552}, \text{Fe}^{2+} + 6\text{H}^+_{\text{sal}}$
$\text{UQH}_2 + \text{NAD}^+ + 4\text{H}^+_{\text{sal}}$	$\longrightarrow$	$\text{UQ} + \text{NADH}, \text{H}^+ + 4\text{H}^+_{\text{ent}}$
$2\text{Cyt } c_{552}, \text{Fe}^{2+} + \text{O}_2 + 4\text{H}^+_{\text{ent}}$	$\longrightarrow$	$2\text{Cyt } c_{552}, \text{Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O} + 2\text{H}^+_{\text{sal}}$
Reacciones en <i>Nitrobacter</i>		$\Delta G$ (kJ/mol)
$\text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O} + 2\text{Cyt } c_{550}, \text{Fe}^{3+}$	$\longrightarrow$	$\text{NO}_3^- + 2\text{Cyt } c_{550}, \text{Fe}^{2+} + \text{H}^+_{\text{ent}}$
$\text{Cyt } c_{550}, \text{Fe}^{2+} + \text{NO}_2^- + 2\text{H}^+_{\text{sal}}$	$\longrightarrow$	$\text{NO} + \text{Cyt } c_{550}, \text{Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O}$
$2\text{Cyt } c_{550}, \text{Fe}^{2+} + \text{O}_2 + 4\text{H}^+_{\text{ent}}$	$\longrightarrow$	$2\text{Cyt } c_{550}, \text{Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O} + 2\text{H}^+_{\text{sal}}$
$\text{NO} + \text{H}_2\text{O} + \text{X}$	$\longrightarrow$	$\text{NO}_2^- + \text{X}^- + 2\text{H}^+_{\text{ent}}$
$\text{NO} + \text{H}_2\text{O} + \text{Cyt } c_{550}, \text{Fe}^{3+}$	$\longrightarrow$	$\text{NO}_2^- + \text{Cyt } c_{550}, \text{Fe}^{2+} + 2\text{H}^+_{\text{ent}}$
$2\text{X}^- + \text{UQ} + 6\text{H}^+_{\text{sal}}$	$\longrightarrow$	$2\text{X}^- + \text{UQH}_2 + 4\text{H}^+_{\text{ent}}$
$\text{UQH}_2 + \text{NAD}^+ + 4\text{H}^+_{\text{sal}}$	$\longrightarrow$	$\text{UQ} + \text{NADH}, \text{H}^+ + 4\text{H}^+_{\text{ent}}$

La oxidación global de amonio a nitrito y nitrato muestra variaciones significativas en los valores de  $K_s$  en ambas etapas de la nitrificación (Beccari y *col.* 1979). Para la oxidación del amonio a nitrito, los valores de  $K_s$  varían de 0.063 a 4.59 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/l y para la oxidación de nitrito a nitrato varían de 0.34 a 1.9 mg N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/l. Posiblemente, la variable independiente que mayor efecto parece ejercer, son los cambios de pH, pero no la única. Dentro de la diversidad de estudios realizados sobre la nitrificación, se ha observado que la presencia de materia orgánica, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, y la concentración de oxígeno disuelto pueden afectar el proceso respiratorio y el crecimiento microbiano nitrificante. A continuación se describen algunos de ellos.

### 1.1.2.2 Variables de respuesta de un cultivo nitrificante en lote

#### 1.1.2.2.1 Velocidades de crecimiento microbiano

El crecimiento y otras actividades fisiológicas de los microorganismos se producen en respuesta al ambiente físico-químico. El crecimiento microbiano es caracterizado por el tiempo requerido para incrementar la biomasa. De acuerdo a Wang y *col.* (1979) el crecimiento es definido como:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (4)$$

donde X : concentración de células

t : tiempo

$\mu$  : velocidad específica de crecimiento (tiempo<sup>-1</sup>)

donde  $\mu X$  es la velocidad volumétrica de crecimiento.

Por otro lado, las velocidades de crecimiento, como las velocidades de reacción de primer orden, están en función de la concentración de un sustrato. Monod (1949) determinó una relación entre la velocidad de crecimiento y la concentración del sustrato y fue definida a través de su modelo que se presenta en la ecuación 5.

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} \quad (5)$$

En donde  $\mu_{\max}$  es la velocidad específica máxima de crecimiento ( $\text{tiempo}^{-1}$ ), S es la concentración del sustrato (g/l) y  $K_s$  es una constante igual a la concentración del sustrato cuando  $\mu = 0.5\mu_{\max}$ . Aunque otros modelos han sido propuestos para relacionar la velocidad de crecimiento con la concentración del sustrato, el modelo de Monod es el más usado.

#### ***1.1.2.2 Rendimiento del crecimiento celular y del producto***

El crecimiento y la formación de producto son procesos de bioconversión en el cual, los nutrientes químicos alimentados en el medio de cultivo, son convertidos en biomasa y metabolitos. Cada una de estas conversiones puede ser cuantificada por el coeficiente del rendimiento expresado como biomasa producida o producto formado por unidad de nutriente consumido,  $Y_{X/S}$  y  $Y_{P/S}$ , respectivamente. Así el coeficiente del rendimiento representa la eficiencia de conversión (esto es, la efectividad o predominancia de una ruta metabólica). La manera usual de calcular los rendimientos es a través de la medición de la masa celular o producto formado y el sustrato consumido como se muestra a continuación:

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} \quad (6)$$

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S} \quad (7)$$

#### ***1.1.2.3 Cinéticas de utilización de nutrientes y formación de producto***

Como se dijo antes, la velocidad de crecimiento microbiano se representa por una ecuación de primer orden y depende del sustrato. Por consiguiente, la formación de producto puede estar similarmente relacionada al consumo del sustrato. Claro está que la formación del producto no puede llevarse a cabo sin la presencia de biomasa. Tomando en cuenta esta información, Wang y col. (1979) propusieron que el crecimiento microbiano y la formación de producto están estrechamente relacionadas con la utilización del sustrato y, que dependiendo de los controles regulatorios metabólicos, la formación de producto estará, en menor o mayor medida, acoplado al crecimiento microbiano. En consecuencia se proponen las siguientes ecuaciones de balance para el crecimiento, la utilización del sustrato y la formación de producto.

**Crecimiento:**

$$\frac{dX}{dt} = \mu X - \frac{F_0 X}{V} \quad (8)$$

Acumulación de masa celular = Crecimiento – salida de células

en donde  $F_0$  : flujo de salida (l/d)

$V$  : volumen del reactor (l)

**Utilización del sustrato:**

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{F_i S_0}{V} - \frac{\mu X}{Y_{X/S}} - \frac{q_P X}{Y_{P/S}} - mX - \frac{F_0 S}{V} \quad (9)$$

Acumulación sustrato = Sustrato alimentado – Crecimiento – Síntesis de producto – Mantenimiento – Sustrato eliminado

Donde  $F_i$  : flujo de alimentación (l/d)

$S_0$  : concentración del sustrato inicial (mg/l)

$S$  : concentración de sustrato final (mg/l)

$q_P$ : velocidad específica de formación de producto (tiempo<sup>-1</sup>) definido así:

$$q_P = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt}$$

**Formación de producto :**

$$\frac{dP}{dt} = q_P X - \frac{F_0 P}{V} - KP \quad (10)$$

Acumulación de producto = Síntesis de producto – Producto eliminado – Producto destruido

Siendo  $P$  la concentración del producto (mg/l)

Estas ecuaciones son aplicables para los cultivos en estado estacionario y no estacionario. La ecuación 10 puede simplificarse si se considera que el consumo de sustrato dirigido al mantenimiento no es significativo, resultando:

$$-\frac{1}{X} \frac{dS}{dt} = -q_s = -\frac{\mu}{Y_{X/S}} - \frac{q_p}{Y_{P/S}} \quad (11)$$

en donde  $q_s$  : velocidad específica de consumo de sustrato (tiempo<sup>-1</sup>)

Con lo descrito, se puede decir que la valoración fisiológica de un cultivo habrá de incluir variables de respuesta como la velocidad específica de crecimiento microbiano, velocidad específica de consumo del sustrato y de formación de producto; la eficiencia de consumo de sustrato, rendimientos de formación de biomasa y de producto. No hacerlo implica que se tendrá sólo una visión parcial del fenómeno.

Por otro lado, un proceso respiratorio completamente desasimilativo (crecimiento microbiano despreciable), la ecuación 11 puede reducirse a:

$$-\frac{1}{X} \frac{dS}{dt} = -q_s = -\frac{q_p}{Y_{P/S}} \quad (12)$$

En el caso de que haya formación de varios productos, entonces la ecuación 12 queda como:

$$-\frac{1}{X} \frac{dS}{dt} = -q_s = -\frac{q_{P_1}}{Y_{P_1/S}} - \frac{q_{P_2}}{Y_{P_2/S}} - \frac{q_{P_{n+1}}}{Y_{P_{n+1}/S}} \quad (13)$$

De esta forma, un proceso respiratorio nitrificante bajo condiciones ambientales netamente desasimilantes, podría ser representado de la siguiente manera:

$$q_{NH_4^+} = \frac{q_{NO_2^-}}{Y_{NO_2^-/NH_4^+}} + \frac{q_{NO_3^-}}{Y_{NO_3^-/NH_4^+}} \quad (14)$$

en donde

$q_{NH_4^+}$  : velocidad específica de consumo de amonio

$q_{NO_2^-}$  : velocidad específica de producción de nitrito

$q_{NO_3^-}$  : velocidad específica de producción de nitrato

$Y_{NO_2^-/NH_4^+}$  : rendimiento en la formación de nitrito

$Y_{NO_3^-/NH_4^+}$  : rendimiento en la formación de nitrato

### **1.1.2.3 Efecto de factores ambientales sobre el proceso respiratorio nitrificante**

#### *1.1.2.3.1 Foto sensibilidad*

Con respecto al efecto de la luz sobre las bacterias nitrificantes, son escasos los estudios en donde se presentan evidencias de este tipo, sobre la oxidación de amonio. Hooper y Terry (1974) observaron que la radiación de luz a partir de una longitud de onda de 400 nm, provocó, en *Nitrosomonas europaea*, una disminución en la eficiencia de oxidación del amonio. Resultados similares fueron también señalados por Shears y Wood (1985), quienes encontraron una disminución de la eficiencia de 85%, con un tiempo de exposición de 20 minutos. De acuerdo a las conclusiones de los autores, una posible explicación a la disminución de la eficiencia amonio-oxidante, podría estar relacionada con la formación de un superóxido, el cual podría acomplejarse con los metales cobre y hierro del centro activo de la amonio monooxigenasa. A pesar de la evidencia existente, queda aún mucho por saber del efecto de la luz ultravioleta sobre la oxidación de amonio.

#### *1.1.2.3.2 Efecto del oxígeno*

Varios autores han obtenido resultados del efecto de la concentración en oxígeno sobre la eficiencia y las velocidades del proceso nitrificante. Helder y De Vries (1983) observaron que la eficiencia de oxidación de amoniaco decrece a concentraciones de oxígeno menores que 30  $\mu\text{mol O}_2/\text{l}$ , mientras que la eficiencia de oxidación de nitrito decrece a concentraciones de oxígeno menores que 125  $\mu\text{mol O}_2/\text{l}$ . Estas diferencias en la sensibilidad de los procesos amonio y nitrito-oxidantes sugieren que la actividad de las bacterias nitrito-oxidantes está mayormente afectada por la disminución de la concentración en oxígeno en el medio de cultivo. Prinic y col. (1998) observaron en *Nitrosomonas europaea*, en cultivos en lote, que a una concentración de oxígeno disuelto de 1.7 mg/l (21% de saturación), las velocidades de consumo de amonio no fueron afectadas (140 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/l.d). Sin embargo, fue observada una disminución del 96% en las velocidades volumétricas de consumo de amonio, cuando la saturación de oxígeno fue 7%. Por otro lado, se ha observado la producción de óxido nítrico (NO) y óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) bajo condiciones limitadas en oxígeno disuelto (Hooper y Terry, 1979, Goreau y col. 1980, Painter 1986, Bock y col. 1995). Se han aportado evidencias

también de la producción de nitrito (SHARON) o nitrógeno molecular (ANAMMOX, CANON y OLAND) bajo condiciones limitantes en oxígeno (Bock y *col.* 1995, Muller y *col.* 1995, Pollice y *col.* 2002). Dadas estas evidencias, es recomendable mantener un control sobre la concentración del O<sub>2</sub>, para evitar el mal funcionamiento del proceso respiratorio nitrificante y la producción de intermediarios no deseables (NO, N<sub>2</sub>O).

### ***1.1.2.3.3 Efecto del amonio, nitrito y pH sobre el proceso nitrificante***

De acuerdo a las evidencias presentadas por Suzuki y *col.* (1974), las bacterias nitrificantes utilizan al nitrógeno de amoniaco como fuente de nitrógeno y energía. Se ha especulado que concentraciones altas de sustrato, amonio para las amonio-oxidantes y nitrito para las nitrito-oxidantes, pueden provocar efectos inhibitorios sobre los procesos respiratorios amonio y nitrito-oxidantes. Sin embargo, diferentes estudios muestran que este efecto inhibitorio por sustrato podría estar relacionado más con el valor del pH, que con las concentraciones elevadas de sustrato en sí. El valor del pH del medio establece las concentraciones de la forma iónica (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) y gaseosa (NH<sub>3</sub>) del sustrato (ecuación 15), así como las concentraciones de la forma disociada (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) y no disociada (HNO<sub>2</sub>) (ecuación 16). También se ha observado que a valores de pH ácidos, puede haber formación de óxido nítrico (ecuación 17) (Anthonisen y *col.* 1976, Hunik y *col.* 1993, Zumft 1993, Villaverde y *col.* 1997) (ecuaciones 15, 16 y 17).



Suzuki y *col.* (1974) observaron que las constantes de Michaelis Menten (K<sub>m</sub>) asociadas a la oxidación del sustrato (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/NH<sub>3</sub>) en cultivos de *Nitrosomonas europaea*, estuvieron determinadas por la acidez o la basicidad del medio. Los valores de las constantes de velocidad (K<sub>m</sub>= 58) fueron menores bajo condiciones alcalinas (pH=9.1). En el equilibrio, en condiciones alcalinas, la concentración de amoniaco es mayor que a valores de pH más bajos. De esta manera estos autores concluyeron que el amoniaco es el sustrato principal para la AMO. En el estudio de Hunik y *col.* (1993) con *Nitrobacter agilis* se observó que ninguna concentración de nitrito de 0 a 100 mM provocó inhibición por sustrato en un intervalo de pH



de 8.0-8.5. Sin embargo, a valores de pH de 6.5, se observó una inhibición por sustrato del 80%, en un intervalo de concentraciones de nitrito de 60 a 100 mM. Esta inhibición podría estar relacionada a la formación del ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ). Además, se ha reportado la formación de complejos metal-nitrosil bajo condiciones ácidas debido a la interacción de los radicales  $\text{NO}^+$  y  $\text{NO}$  con el centro metálico (hierro y cobre) de la enzima AMO (Anthonisen y *col.* 1976; Hunik y *col.* 1993; Zumft 1993, Zahn y *col.* 1996). En otro trabajo (Villaverde y *col.*, 1997), en donde se evaluaron diferentes valores de pH (5-8.5) sobre la velocidad específica del consumo de amonio, en biofiltros sumergidos, observaron que la actividad nitrificante incrementó linealmente con el aumento del valor de pH. A un valor de pH de 8.2, se obtuvo la mayor velocidad específica (15 g  $\text{N-NH}_4^+$ /g SSV.h). Resultados similares, pero utilizando un consorcio nitrificante, fueron también obtenidos por Prinic y *col.* (1998) con una concentración inicial de 3000 mg  $\text{N-NH}_4^+$ /l. Estos autores observaron un cambio en las velocidades volumétricas de consumo de amonio a diferentes valores de pH (6, 7, y 8), obteniendo la mayor velocidad de consumo de amonio (120 mg  $\text{N-NH}_4^+$ /l.d) a valores de pH de 7 y 8. Aunque estos autores no dan alguna explicación sobre los incrementos en las velocidades de consumo de amonio con el valor de pH, podría decirse que a mayores valores de pH, mayor es la disponibilidad del sustrato en forma de amoniaco para la AMO (Suzuki y *col.* 1974). Como puede observarse, es de suma importancia tener un control del valor del pH en un proceso nitrificante para favorecer la disponibilidad del sustrato para las bacterias nitrificantes.

#### ***1.1.2.3.4 Efecto de la materia orgánica***

Un sin número de estudios realizados sobre la nitrificación en presencia de materia orgánica han aportado evidencias de que la actividad de las bacterias amonio-oxidantes es generalmente más afectada por la presencia de materia orgánica, que la de las nitrito-oxidantes (Tomlinson y *col.* 1976; Hyman y Wood 1983; Hyman y *col.* 1985; Keener y Arp 1994, McCarty 1999; Zepeda y *col.* 2003). En la Tabla 2, se muestra una comparación del efecto de diferentes compuestos orgánicos sobre la actividad amonio-oxidante y nitrito-oxidante a partir de los resultados reportados por Tomlinson y *col.* (1976). Como puede observarse, la materia orgánica afectó en mayor grado la actividad amonio-oxidante.

**Tabla 2** Efecto de compuestos orgánicos sobre la actividad amonio y nitrito-oxidante en un consorcio nitrificante.

	Concentración Molar	Porcentaje (%) de nitrógeno oxidado con relación al control sin compuesto orgánico	
		Amonio-oxidante	Nitrito-oxidante
Thiourea	$2.10^{-6}$	23	92
Fenol	$5.10^{-5}$	60	96
Guanadina	$10^{-4}$	33	90
Etil uretano	$3.3.10^{-2}$	3	90
Estricina	$4.10^{-4}$	41	89
Alil alcohol	$3.5.10^{-4}$	26	100
Dimetil <i>p</i> -nitrosalina	$3.5.10^{-4}$	24	41

Tabla modificada de Tomlinson y col. (1976). Concentración inicial de amonio de 39 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/l y 9 mg N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/l

Otro estudio comparativo entre las bacterias amonio y las nitrito-oxidantes, fue realizado por Hynes y Knowles (1982), utilizando *Nitrosomonas europaea* y *Nitrobacter winogradskyi* en presencia de acetileno. *Nitrosomonas europaea* fue la bacteria que mostró mayor sensibilidad en presencia de la materia orgánica, con una disminución en la eficiencia de oxidación de amonio de 100% a una concentración inicial de acetileno de 0.1 mg/l. *Nitrobacter winogradskyi* mostró una mayor resistencia a la presencia de acetileno presentando una eficiencia del 100% en la oxidación de nitrito a nitrato a una concentración inicial de hasta 98.8 mg/l. Se ha tratado de explicar la diferencia del efecto de la materia orgánica sobre la actividad de las bacterias amonio y nitrito-oxidantes a través de distintos argumentos como: a) el ciclo de los ácidos tricarbónicos incompleto en las amonio-oxidantes por la falta de las enzimas fosfoenolpiruvato sintetasa y piruvato descarboxilasa (Smith y col. 1967; Smith y Hoare 1968; Wallace y Nicholas 1969; Martiny y Koops 1982; Bock y col. 1991); b) el desacoplamiento entre las enzimas NADH-dependientes, con la generación de energía y formación de ATP (Kelly, 1971); c) la inhibición competitiva y no competitiva (Hyman y col. 1985) y; d) el efecto quelante de la materia orgánica con el centro activo de la enzima amonio

monooxigenasa (Keener y Arp 1994, Mc Carthy 1999). Por ejemplo, se menciona que el ciclo de los ácidos tricarbónicos se encuentra incompleto en las bacterias amonio-oxidantes. Sin embargo, Chain y col. (2003), auxiliándose de técnicas moleculares detectaron los genes de todas las enzimas del ciclo de los ácidos tricarbónicos en la especie *Nitrosomonas europaea* y de todas las enzimas necesarias para llevar a cabo la gluconeogenesis y glicólisis.

Como se mencionó anteriormente, las bacterias nitrificantes han sido estudiadas en presencia de una amplia variedad de compuestos orgánicos. La mayoría de estos estudios han sido realizados con la especie *Nitrosomonas europaea*. Los resultados obtenidos en estas investigaciones son variables. En la Tabla 3 se muestran algunas evidencias reportadas sobre la disminución de la eficiencia de oxidación del amoníaco en presencia de diferentes compuestos orgánicos con cultivos de *Nitrosomonas europaea*.

**Tabla 3.** Efecto de compuestos orgánicos sobre la oxidación de amoníaco por *Nitrosomonas europaea*.

Compuesto orgánico	Concentración inicial del compuesto orgánico (mg/l)	% de disminución en la oxidación de NH <sub>3</sub>	Referencias
Alquilbenceno sulfonato	18.0	50	Brandt y col. 2001
Acetileno	0.13	90	Hyman y Wood 1985
Benceno	11.7	50	Keener y Arp 1994
Tolueno	13.8	80	“
Etilbenceno	15.9	50	“
<i>p</i> -Xileno	15.9	98	“
Estireno	15.6	90	Keener y Arp 1994
<i>m</i> -anisidina	30.8	5	Keener y col. 1998
<i>p</i> -anisidina	6.16	98	“
1,2-dimetilciclopropano	2.6	93	“
ciclopropil bromuro	0.8	97	“
D-manosa	9057	3	Lees 1952
glicina	375	0	“
L-tirosina	951	10	“
etiluretano	586	67	“
L-arginina	1073	33	“
L-histidina	776	100	Lees 1952

Existen estudios sobre el efecto de la materia orgánica sobre la nitrificación con consorcios nitrificantes. En la Tabla 4 se muestran algunos ejemplos sobre la disminución de la eficiencia de oxidación del amonio en presencia de compuestos orgánicos en consorcios nitrificantes.

**Tabla 4.** Efecto de compuestos orgánicos sobre la oxidación de amoniaco en consorcios nitrificantes.

Concentración inicial del compuesto orgánico (mg/l)	Compuestos orgánicos	% de disminución en oxidación de NH <sub>3</sub>	Referencias
10.7	Benceno	100	Dyreborg y Arvin 1995
8.4	<i>o</i> -Xileno	100	“
1.3	<i>o</i> -Cresol	100	“
3.5	Fenol	100	Dyreborg y Arvin 1995
0.51	3,5-Diclorofenol	50	Gernaey y col. 1997
2.67	Fenol	50	Gernaey y col. 1997
500	Acetato	70	Gomez y col. 2000
500	Propionato	100	“
500	Butirato	100	Gomez y col. 2000
1000	Glucosa	70	Hanaki y col. 1990
11.4	<i>m</i> -cresol	75	Tomlinson 1966
5.6	Fenol	75	“
12.8	<i>o</i> -Cresol	75	“
2,400	Etanol	75	“
2,000	Acetona	75	“
35	Disulfuro de carbono	75	Tomlinson 1966

Aunque la gran mayoría de los estudios realizados con *Nitrosomonas europaea* presentan información relevante a través del porcentaje de disminución de la eficiencia de oxidación del amoniaco en presencia de materia orgánica, esta información no se acompaña de: a) el rendimiento de producción en nitrito (mg N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> formado/mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> oxidado), b) el balance de materia del nitrógeno en el proceso nitrificante, c) las velocidades específicas de consumo de amonio y de producción de nitrito, d) las velocidades específicas de oxidación del compuesto orgánico. A parte, en los cultivos axénicos, no es posible considerar las

interacciones que se pueden establecer entre las bacterias amonio y nitrito-oxidantes en consorcios nitrificantes. Asimismo, a partir de los datos de la literatura es difícil establecer una concentración máxima del compuesto orgánico tolerable para las bacterias nitrificantes. Esto se debe a que las concentraciones inhibitorias dependen de múltiples factores tales como: estructura química del compuesto orgánico, concentración, tipo e historial del inóculo, diseño del reactor e hidráulica del sistema, presencia individual o en mezcla del compuesto orgánico (Anthonisen 1976; Zepeda y col. 2003). Puede verse que el control de la concentración de la materia orgánica disuelta, en el proceso nitrificante, es un factor que debe tomarse en cuenta.

#### **1.1.2.4 Modos de acción de los inhibidores en la nitrificación biológica**

Como se ha indicado antes, la mayoría de los estudios sobre los efectos de inhibición en el proceso nitrificante han sido llevados a cabo con *Nitrosomonas europaea*. El fenómeno se ha generalmente circunscrito a evaluar la disminución en las velocidades de oxidación de amonio a nitrito. Por el contrario, son escasos los estudios que han proporcionado información sobre la inhibición del proceso nitrito-oxidante, vía la disminución de las velocidades de oxidación de nitrito a nitrato. Las posibles hipótesis del modo de acción de los inhibidores en la nitrificación son diversas. Se mencionaron las siguientes causas: a) la quelación del compuesto metálico que contiene el centro activo de la enzima AMO con el inhibidor, b) la limitación del poder reductor (NADH y NH<sub>2</sub>OH), c) la formación de enlace covalente con la AMO, d) la inhibición competitiva y no competitiva, e) la hidrofobicidad del compuesto inhibitorio.

##### ***1.1.2.4.1 Efecto quelante del inhibidor***

De acuerdo a la literatura, los agentes quelantes afectan la estructura de las metalproteinasas inmovilizando el ión metálico requerido para la catálisis, neutralizando de esta manera su actividad catalítica (Bjarnason y Tu 1978). En este contexto, se ha determinado que la enzima AMO contiene metales, como el hierro y el cobre en su centro activo. Este hecho fue comprobado a través de estudios de fotoinactivación de la enzima AMO en *Nitrosomonas europaea*, observándose cambios en las características espectrales similares a los encontrados en la tirosinasa (monooxigenasa con cobre en el centro activo) (Shears y Word 1985). Por otro lado, Zahn y col. (1996) mediante estudios con espectroscopia de resonancia paramagnética

electrónica (EPR) observaron que la exposición de la membrana citoplasmática de *Nitrosomonas europaea*, al óxido nítrico provocó la formación del complejo nitrosil hierro. Este mismo resultado fue reportado por Bédard y Knowles (1989) y Semrau y col. (1995) utilizando una enzima de características bioquímicas y moleculares similares a la enzima AMO, la enzima metano monooxigenasa particular (MMOp), la cual cuenta con hierro en su centro activo. Estos resultados coinciden con los trabajos realizados por Lees (1946) y (1952), quien utilizó a *Nitrosomonas europaea* como fuente de inóculo. Este autor argumentó un efecto quelante sobre el centro metálico de cobre de la enzima AMO en presencia de L-histidina, guanidina, 8-hidroxiquinolina, salicilaldoxima, etil xantato de potasio, dietilditiocarbamato de sodio, tiourea y aliltiourea. La tiourea y la aliltiourea fueron los compuestos que provocaron mayor disminución en las velocidades de oxidación de amonio. En trabajos desarrollados en las décadas de los años 70 y 80 con *Nitrosomonas europaea*, se observó que compuestos azufrados como: tiosulfato, tiocarbamato, xantato, tiourea, aliltiourea, guaniltiourea, 2-mercaptobenzotiazol, dimetil disulfuro, metil mercaptano, y ácido sulfhídrico, inhibieron la oxidación del amonio (Bremmer y Bundy 1974; Hauck 1980). Estos autores argumentaron que los compuestos azufrados inhibieron el proceso nitrificante debido a la producción de compuestos volátiles como el disulfuro de carbono (CS<sub>2</sub>). Esta información fue posteriormente comprobada por Hyman y col. (1990) quienes reportaron la inhibición del proceso nitrificante en presencia de CS<sub>2</sub>, debido a la formación de un complejo con capacidad de quelar al cobre. Como puede observarse en los estudios mencionados, sobre la acción quelante de compuestos orgánicos sobre el centro metálico de la enzima AMO, la mayoría de los autores únicamente han considerado al cobre como centro metálico de la enzima AMO y ha quedado al margen la quelación de hierro que de igual manera se encuentra en el centro activo de la enzima AMO.

Algunos compuestos azufrados (tiourea y aliltiourea) han sido considerados como inhibidores “selectivos” de la AMO dejando a un lado la posibilidad de que estos inhibidores puedan interactuar con otras enzimas que contengan un compuesto metálico en su centro activo (Hooper y Terry 1973; Keener y Arp 1994; Ginestet y col. 1998). La enzima nitrito oxidoreductasa por ejemplo presenta un centro metálico de cobre (Richardson y col. 1999). La utilización de inhibidores “selectivos” (tiourea y aliltiourea) en un consorcio nitrificante

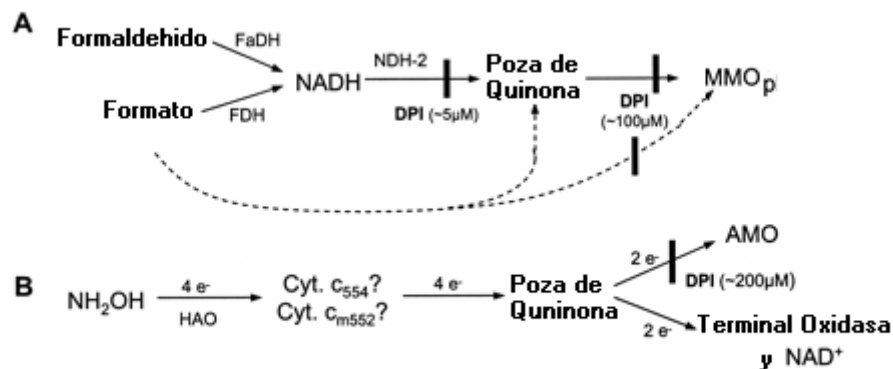
provocaría la posible inhibición de ambos procesos amonio y nitrito-oxidantes. A pesar de toda esta información aún no queda claro si los compuestos anteriormente descritos presentan efectos quelantes con el cobre, hierro o ambos iones metálicos.

Dalvi y *col.* (1974) y Neal y Halpert (1982), utilizando en sus estudios monooxigenasas con centro metálico de hierro, reportaron mecanismos de inhibición basados en la formación de enlaces covalentes sobre la membrana citoplasmática, en presencia de un amplio número de compuestos azufrados entre los cuales se encontraba el CS<sub>2</sub>. Aunque esta información ha sido escasamente mencionada, también podría ser una forma de entender el modo de acción de los compuestos azufrados sobre el proceso respiratorio amonio-oxidante, debido al contenido de hierro en el centro activo de la enzima AMO. Sin embargo cualquiera de los dos modos de acción de los compuestos azufrados anteriormente mencionados en este trabajo (quelación y/o enlaces covalentes) carecen de evidencia tangible debido a que la enzima AMO no ha podido ser aislada y han sido sugeridos a partir de las evidencias obtenidas con la enzima MMOp que tiene la particularidad de tener semejanzas bioquímicas y moleculares con la AMO.

#### ***1.1.2.4.2 Limitación del poder reductor***

Algunos autores han mencionado que otra posible causa de inhibición del proceso amonio-oxidante es la limitación del poder reductor. Hyman y Wood (1984) en cultivos de *Nitrosomonas europaea* observaron la disminución de las velocidades de oxidación del amonio en presencia de etileno. Sin embargo, estas velocidades de oxidación de amonio pudieron ser reestablecidas con la adición de diferentes concentraciones de fuentes reductoras (hidroxilamina e hidracina), destacando que la falta de poder reductor podría ser una posible explicación del mecanismo de inhibición del proceso respiratorio amonio-oxidante. Este mecanismo de inhibición también fue sugerido por Iizumi y *col.* (1998), quienes a través de estudios de bioluminescencia en presencia de aliltiourea, fenol y anilina, con cultivos de *Nitrosomonas europaea*, observaron que el efecto inhibitorio de los compuestos orgánicos estuvo correlacionado con la disminución del poder reductor, debido a la inactivación de la enzima AMO, o bien a la interrupción en otras rutas metabólicas. Posteriormente Shiemke y *col.* (2004) sugirieron que la presencia de difenilioduro (inhibidor irreversible de flavo

proteínas) provocó la inhibición de la oxidación del amonio debido a la interrupción del flujo de electrones de la fuente de quinonas a la enzima AMO (Figura 1).



**Figura 1.** Transferencia de electrones propuesta para la enzima AMO en *Nitrosomonas europaea* (Shiemke y col. 2004).

#### 1.1.2.4.3 Formación de enlace covalente con la enzima AMO

La inhibición de la oxidación del amonio por acetileno ha sido ampliamente estudiada. Uno de los primeros trabajos fue realizado por Hynes y Knowles (1982), quienes presentaron evidencias de la disminución de las velocidades de oxidación del amonio en presencia de acetileno. A través de estudios cinéticos con *Nitrosomonas europaea* mostraron que la inhibición por el acetileno no fue debida a una acción competitiva de este compuesto con el amonio. El mecanismo de inhibición en aquel entonces quedó desconocido. Posteriormente, Hyman y Wood (1985) a través de estudios de electroforesis, con *Nitrosomonas europaea*, en presencia de acetileno radiactivo (<sup>14</sup>C), mostraron que el modo de acción del acetileno (<sup>14</sup>C) fue a través de la formación de un enlace covalente del carbono del acetileno con un polipéptido específico con peso molecular de 28 kDa (AmoA: sitio catalítico de la oxidación del amonio).

#### 1.1.2.4.4 Inhibición competitiva y no competitiva

La inhibición competitiva y no competitiva ha sido mencionada por diferentes autores debido a que la enzima AMO, tiene la capacidad de oxidar simultáneamente amoníaco y una extensa gama de compuestos orgánicos (Hyman y col. 1985; Keener y Arp 1993; Keener y Arp 1994;



McCarthy 1999). Sin embargo, escasos son los estudios en donde se muestran evidencias de estos dos tipos de inhibición. Keener y Arp (1993) realizaron estudios cinéticos sobre la oxidación de amoníaco con *Nitrosomonas europaea* en presencia de diferentes hidrocarburos e hidrocarburos halogenados. Estos autores mostraron que 14 de los 15 compuestos orgánicos estudiados provocaron inhibición no competitiva sobre la oxidación del amoníaco, siendo el metano el único inhibidor competitivo de la enzima AMO. Otro estudio cinético sobre la oxidación del amoníaco fue realizado por Hyman y col. (1985) en presencia de benceno. Estos autores mostraron evidencias de que la inhibición sobre la velocidad de oxidación del amoníaco no correspondió a ninguno de los dos tipos de inhibición (competitiva y no competitiva), sino a otro mecanismo. Algunos autores también han sugerido que un posible mecanismo de inhibición en presencia de los compuestos orgánicos, se debe a que durante la oxidación de éstos, se obtiene un compuesto más tóxico (Stafford 1974, McCarthy 1999).

#### ***1.1.2.4.5 Hidrofobicidad del compuesto inhibitorio***

Dentro de los modos de acción de los inhibidores en el proceso nitrificante también se ha manejado la posibilidad de que la propiedad hidrofóbica del compuesto orgánico (representada por el coeficiente de partición octanol/agua,  $[\log P_{O/W}]$ ), juegue un papel importante en el mecanismo de inhibición de la nitrificación. Esto fue observado por Takahashi y col. (1997), quienes a través del modelamiento estructural de 52 compuestos substituidos de triazinas en dos especies de *Nitrosomonas*, encontraron una correlación del grado de inhibición con el  $\log P_{O/W}$  del compuesto orgánico. Mostraron que el  $\log P_{O/W}$  fue un importante parámetro para determinar el efecto inhibitorio de las triazinas sobre el proceso respiratorio amonio-oxidante. Como puede observarse la mayor parte de la información proporcionada en la literatura sobre los modos de acción de los inhibidores en la nitrificación, ha sido obtenida en cultivos axénicos, en particular con *Nitrosomonas europaea*, marginando las posibles interacciones microbianas que se pueden encontrar en un consorcio nitrificante. Asimismo, se tiene poca información acerca del efecto de los compuestos aromáticos sobre consorcios nitrificantes, el cual podría estar relacionado con cambios en la membrana (incluido el espacio periplásmico) y las funciones del sistema enzimático. Por tal motivo, es de suma importancia llevar a cabo

nuevos trabajos para entender mejor los modos de acción de los compuestos aromáticos sobre la estructura membranal y el sistema enzimático en el proceso nitrificante.

## **1.2 Oxidación de benceno, tolueno y xilenos (BTX)**

### ***1.2.1 Fuentes de contaminación por BTX***

Las industrias químicas y de la refinación del petróleo son unas de las principales fuentes de contaminación por hidrocarburos. Dentro de ellos, se encuentran compuestos como son el benceno, el tolueno y los xilenos (BTX) (U.S. EPA 1980). Otra fuente importante de contaminación por BTX es la causada por derrames accidentales de gasolina y por fugas en los tanques de almacenamiento (pérdidas estimadas a 11 millones de galones por año de gasolina en los Estados Unidos de Norte América) que se encuentran en el subsuelo, ocasionando contaminación del suelo y de las aguas subterráneas (U.S. EPA 1986; Reinhard *y col.* 1997; U.S. EPA 1998b; Hutchins y Miller 1998). Aproximadamente 18% (w/w) de la formulación en una mezcla de gasolina normal está constituida por los BTX (Coates *y col.* 2002). El *m*-xileno es el compuesto con mayor porcentaje en la composición de la gasolina (31%), el cual depende del proceso de refinamiento del petróleo (Christensen y Elton 1996). La contaminación de suelo, agua y aire por BTX es un problema para la salud de los seres humanos, dado el carácter tóxico de estos compuestos. Existen evidencias de que el benceno es inductor de leucemia, de efectos mutagénicos y de anemia aplásica (reducción de elementos celulares en la sangre) en los seres humanos (IARC 1987; ATSDR 1997; U.S. EPA 1998a). Los BTX debido a sus efectos negativos sobre la salud humana, han sido clasificados como contaminantes prioritarios por la EPA y se establecieron los límites máximos de estos compuestos en las aguas subterráneas, a saber (mg/l): benceno, 0.005; tolueno, 1; xileno en todas sus formas isoméricas, 10 y etilbenceno, 0.7 (U.S. EPA 1998a). Los BTX se han llegado a encontrar en aguas subterráneas a concentraciones de (mg/l): 9-50 de benceno, 23-81 de tolueno y 13-171 de isómeros de xileno (Gersberg *y col.* 1989; Weiner y Lovley 1998). La contaminación de aguas subterráneas por los BTX es difícil de remediar debido a que estos compuestos son relativamente solubles en agua y pueden difundirse rápidamente una vez introducidos en el acuífero.

A través de la información proporcionada en la Tabla 5, puede observarse que los BTX son compuestos volátiles, relativamente solubles en agua. De acuerdo con esto, los BTX tienen la particularidad de ser contaminantes en aire, agua y suelo. El coeficiente de partición octanol/agua ( $\log P_{O/W}$ ) muestra que estos compuestos presentan una mayor solubilidad en solventes no polares, es decir, son hidrofóbicos, lo que puede influir de modo significativo en su transporte en los sistemas biológicos (Sikkema *et al.* 1994; Denich *et al.* 2003). Algunas características físico-químicas de los BTX son presentadas en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Características físico-químicas de los BTX (Smallwood 1996; Tiehm y Schulze 2003).

	Benceno	Tolueno	<i>m</i> -Xileno	<i>o</i> -Xileno	<i>p</i> -Xileno
Formula empírica	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub>	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub>	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub>	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub>
Peso molecular (g/mol)	78	92	106	106	106
Solubilidad en agua (a 20°C) (mg/l)	1789	579	160	221	215
Presión de vapor (a 20°C) (mm Hg)	95.2	28.4	6.6	6.6	6.6
Densidad específica (a 20°C)	0.8787	0.8669	0.8642	0.8802	0.8610
Coefficiente de partición (a 20°C) ( $\log P_{\text{octanol/agua}}$ )	2.13	2.69	3.00	3.13	3.18
Constante de Henry (kPa*m <sup>3</sup> /mol)	0.55	0.67	0.70	0.50	0.71
Polaridad	No-polar	No-polar	No-polar	No-polar	No-polar

### 1.2.2 Biodegradación heterotrófica de benceno, tolueno y xilenos

Debido a la importancia de eliminar los compuestos BTX del ambiente, se han llevado a cabo trabajos diversos para su eliminación biológica, sea de forma individual, sea en mezcla. En la mayoría de los estudios, se emplearon cultivos axénicos heterotróficos, utilizando diferentes aceptores de electrones como el oxígeno, nitrato, sulfato, Fe (III), Mn (II), Mn (IV), quinonas, humus y CO<sub>2</sub> (Grbić-Galić y Vogel 1987; Yadav y Reddy 1993; Collins y Daugulis 1999; Heider *et al.* 1999; Cervantes *et al.* 2001). A continuación se describen algunos ejemplos de la eliminación del benceno, tolueno y xilenos en condiciones aerobias y anaerobias.

#### 1.2.2.1 Biodegradación aerobia de benceno, tolueno y xilenos

La oxidación completa de los BTX, ha podido ser observada bajo condiciones aerobias, generalmente en heterotrofia (Harayama *et al.* 1992). La descomposición de los aromáticos involucra una primera etapa, en la que se introduce uno o dos grupos hidroxilo en el anillo aromático. La introducción de un solo grupo hidroxilo es catalizada por las monooxigenasas,

mientras que la introducción simultánea de dos grupos hidroxilo es catalizada por las dioxigenasas (Harayama y Timmis 1989). Existe un elevado número de trabajos en los que se han mostrado las diferentes rutas de oxidación de los BTX (Gibson y col. 1970; Oh y col. 1994; Lee y col. 1995; Zhou y col. 1999; Bühler y col. 2000; Deeb y Cohen 2000; Millar y Peretti 2002; Mitchell y col. 2003). Estas rutas oxidativas dependen de la enzima que participe sobre el compuesto aromático (mono o dioxigenasa) y del sitio donde se lleve a cabo la incorporación del grupo hidroxilo en el anillo aromático (*orto*, *meta* y *para*) (Harayama y col. 1992; Parés y Juárez 1997). La eliminación aerobia de BTX se ha evaluado a través de: a) el crecimiento microbiano (proceso asimilativo), y b) la oxidación del compuesto aromático hasta intermediarios y/o CO<sub>2</sub> (oxidación desasimilativa). La Tabla 6 muestra algunos trabajos reportados en la literatura sobre la eliminación aerobia de BTX en cultivos en lote, así como las fuentes de inóculo empleadas en cada uno de los estudios.

#### ***1.2.2.1.1 Biodegradación aerobia asimilativa de benceno, tolueno y xilenos***

En un gran número de estudios, se ha asociado la biodegradación de BTX con el crecimiento microbiano (asimilación). En estos estudios, el compuesto aromático fue utilizado como fuente de carbono y de energía. La asimilación de los compuestos BTX ha sido observada generalmente en cultivos axénicos organoheterótrofos. La Tabla 7 presenta los datos reportados en estudios sobre la asimilación del benceno, del tolueno y del *p*-xileno, a saber, la velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{\max}$ , tiempo<sup>-1</sup>), la constante de afinidad ( $K_s$ , mg/l), la constante de inhibición ( $K_i$ , mg/l), el rendimiento ( $Y_{x/s}$ , g de biomasa producido/g de sustrato consumido). Como puede observarse, la mayoría de la información sobre la oxidación asimilativa de los compuestos BTX fue obtenida con *Pseudomonas*. En la mayoría de estos estudios, se obtuvieron eficiencias de eliminación de los compuestos aromáticos cercanas al 100%. Sin embargo esta eficiencia de consumo está relacionada con el crecimiento celular, obteniendo rendimientos celulares muy grandes. En general, rendimientos muy altos podrían ser una gran desventaja en este tipo de proceso, debido a que la contaminación no es realmente eliminada sino trasladada a otro tipo de contaminación, es decir una elevada acumulación de lodo. Esto ocasiona un tratamiento posterior para la disposición de la biomasa microbiana que

se encuentre en exceso en el sistema de tratamiento y, en consecuencia, un aumento en los costos de operación.

**Tabla 6.** Biodegradación aerobia de benceno, tolueno y xilenos en cultivos en lote y reactores.

Hidrocarburo	Lote		Reactores	
	Inóculo	Referencia	Tipo de reactor e inóculo	Referencia
Benceno	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Yadav y Reddy (1993)	Feed-batch; <i>Pseudomonas putida</i>	Miller y Pretti (2002)
	<i>Pseudomonas</i> PPO1	Oh y col. (1994)	Biofiltro; Consorcio adaptado	Bielefeldt y col. (1999)
	Acuífero contaminado	Hutchins (1991); Cosuil y Weber (1994)	Bioreactor de partición;	Collins y Daugulis (1999)
	<i>Pseudomonas putida</i> TVA8, F1	Applegate y col. (1998); Reardon y col. (2000); Costura y Alvarez (2000)	<i>Pseudomonas</i> sp. ATCC 5595	
	<i>Pseudomonas</i> sp	Johnson y Olsen (1995); Monero y col. (2003)		
	Consorcio de suelo contaminado	Tsao y col. (1998); Yerushalmi y col. (2002)		
	<i>Xantobacter</i> Py2	Zhou y col. (1999)		
	<i>Ralstonia picketti</i> PKO1	Parales y col. (2000)		
<i>Burkholderia cepacia</i> G4	Parales y col. (2000)			
<i>Rhodococcus</i> sp. RR1 y RR2	Deeb y Cohen (2000)			
Tolueno	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Yadav y Reddy (1993)	Trickle-Bed; Biofiltro; Consorcio adaptado	Wübker y col. (1997); Morales y col. (1998); Bielefeldt y col. (1999)
	<i>Pseudomonas</i> PPO1	Oh y col. (1994)		
	Acuífero contaminado	Hutchins (1991); Cosuil y Weber (1994)		
	<i>Pseudomonas putida</i> 54G, TVA8, F1	Mirpuri y col. (1997); Applegate y col. (1998); Reardon y col. (2000)	Bioreactor de partición en dos fases; <i>Pseudomonas</i> sp. ATCC 5595	Collins y Daugulis (1999)
	Consorcio de suelo contaminado	Tsao y col. (1998)		
	<i>Rhodococcus</i> sp RR1 y RR2	Deeb y Cohen (1999, 2000)		
<i>Xantobacter</i> Py2	Zhou y col. (1999)			
<i>E. coli</i> (DH5 $\alpha$ , S17, INV $\alpha$ F', JM101)	Applegate y col. (1998); Bühler y col. (2000)			

**Tabla 6.** Biodegradación aerobia de benceno, tolueno y xilenos en cultivos en lote y reactores (continuación).

Hidrocarburo	Lote		Reactores	
	Inóculo	Referencia	Tipo de reactor e inóculo	Referencia
<i>o</i> -Xileno	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> Acuífero contaminado Consortio de suelo contaminado <i>Pseudomonas putida</i> F1	Yadav y Reddy (1993) Hutchins (1991); Cosuil y Weber (1994) Tsao y col. (1998) Applegate y col. (1998)	Biofiltro Consortio adaptado	Bielefeldt y col. (1999)
<i>m</i> -Xileno	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> Consortio de suelo contaminado <i>Pseudomonas putida</i> F1, TVA8, PM1	Yadav y Reddy (1993) Hutchins (1991); Tsao y col. (1998) Applegate y col. (1998); Deeb y col. (2001)	Biofiltro Consortio adaptado	Bielefeldt y col. (1999)
<i>p</i> -Xileno	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> <i>Pseudomonas</i> PPO1 Consortio de suelo contaminado <i>Pseudomonas putida</i> F1, TVA8, PM1	Yadav y Reddy (1993) Oh y col. (1994) Tsao y col. (1998) Applegate y col. (1998); Deeb y col. (2001)	Biofiltro Consortio adaptado Bioreactor de partición en dos fases <i>Pseudomonas</i> sp. ATCC 5595	Bielefeldt y col. (1999) Collins y Daugulis (1999)

**Tabla 7.** Biodegradación asimilativa del benceno, del tolueno y del *p*-xileno como fuente de carbono por cultivos axénicos.

Compuesto aromático	Microorganismo	Temp (°C)	Conc. max. (mg/l)	$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	Ks (mg/l)	Ki (mg/l)	Y <sub>x/s</sub> (g/g)	Referencia
Benceno	<i>Pseudomonas sp.</i>	30	200	0.0094	8.30	-	-	Monero y col. (2003)
	<i>Pseudomonas putida</i> F1	30	43	0.73 ± 0.03	0.12 ± 0.02	-	1.20 ± 0.05	Reardon y col. (2000)
	<i>Pseudomonas fragi</i>	amb.	10	0.335 ± 0.129	3.17 ± 0.82	-	1.04 ± 0.09	Chang y col. (1993)
	<i>Pseudomonas putida</i> O1	30	70	0.44	-	-	0.65	Oh y col. (1994)
Tolueno	<i>Pseudomonas putida</i> F1	30	43	0.86 ± 0.01	13.8 ± 0.9	-	1.28 ± 0.13	Reardon y col. (2000)
	<i>Pseudomonas putida</i> R1	25	4	0.504	0.1	-	1.2	Pedersen y col. (1997)
	<i>Pseudomonas putida</i> 54G	24	50	0.42 ± 0.05	3.98 ± 0.78	42.78 ± 3.87	0.90 ± 0.13	Mirpuri y col. (1997)
	<i>Pseudomonas putida</i> O1	30	70	0.72	-	44.43	0.64	Oh y col. (1994)
	<i>Pseudomonas fragi</i>	amb.	10	0.543 ± 0.076	1.96 ± 0.91	-	1.22 ± 0.1	Chang y col. (1993)
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	amb.	10	0.452 ± 0.115	1.88 ± 1.26	-	0.99 ± 0.25	Chang y col. (1993)
	<i>Pseudomonas putida</i> ATTC 23973	32	30	0.437	6.0	1980	-	Choi y col. (1992)
	<i>Burkholderia sp.</i> JS150	amb.	43	0.39 ± 0.01	1.01 ± 0.28	-	1.03 ± 0.09	Reardon y col. (2002)
<i>p</i> -Xileno	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	amb.	10	0.535 ± 0.072	4.55 ± 0.37	-	0.25 ± 0.03	Chang y col. (1993)



### 1.2.2.1.2 Biodegradación aerobia desasimilativa de benceno, tolueno y xilenos

Existen trabajos en donde se muestra que los BTX son enteramente mineralizados (producción de CO<sub>2</sub>). La mineralización de los BTX ha sido confirmada a través de estudios con carbono radiactivo (<sup>14</sup>C) (Tsao y col. 1998; Deeb y Cohen 2000). En la mayoría de estos trabajos se obtuvieron altos rendimientos de producción en CO<sub>2</sub>, variando de 76 a 100%, empleando *Thermus sp.*, *Pseudomonas putida* y *Rhodococcus rhodochrous*, y consorcios microbianos de suelos y acuíferos contaminados con BTX (Mirpuri y col. 1997; Tsao y col. 1998; Yerushalmi y Guiot 1998; Deeb y Cohen 2000; Yerushalmi y col. 2002). A pesar de que existen evidencias experimentales de la mineralización del compuesto aromático de forma individual y en mezcla, muy pocos estudios muestran las velocidades específicas de producción de CO<sub>2</sub>. Esta variable de respuesta es de gran utilidad para poder comparar los resultados obtenidos entre autores. Son aún escasos los trabajos que presentan datos cinéticos sobre la mineralización de los BTX. La Tabla 8 muestra los valores de las velocidades específicas de mineralización de benceno, tolueno y xilenos reportadas por Chen y Taylor (1997) y Deeb y Alvarez-Cohen (1999), quienes utilizaron respectivamente a *Thermus sp.* y *Rhodococcus rhodochrous* como fuentes de inóculo.

**Tabla 8.** Velocidades específicas de mineralización de los BTX.

Compuesto aromático	Velocidades específicas (mg de compuesto aromático/mg SSV. h)	Referencia
Benceno	0.006	Chen y Taylor (1997)
	0.050	Deeb y Alvarez-Cohen (1999)
Tolueno	0.009	Chen y Taylor (1997)
	0.058	Deeb y Alvarez-Cohen (1999)
<i>o</i> -Xileno	0.004	Chen y Taylor (1997)
	0.027	Deeb y Alvarez-Cohen (1999)
<i>m</i> -Xileno	0.002	Chen y Taylor (1997)
<i>p</i> -Xileno	0.004	Chen y Taylor (1997)

A pesar de que los trabajos sobre la biodegradación de los BTX presentan avances importantes, todavía queda mucho por estudiar para entender la fisiología de este tipo de procesos biológicos. Es escasa la información sobre la eliminación de los xilenos a pesar de

que estos compuestos son los que se encuentran en mayor concentración en los sitios contaminados.

#### **1.2.2.2 Biodegradación anaerobia de benceno, tolueno y xilenos**

La preocupación sobre la contaminación ambiental por la presencia de BTX se ha manifestado a través de un gran esfuerzo por parte de la comunidad científica para entender como se puede llevar a cabo su eliminación anaerobia en suelo, agua y aire. En la pasada década se han presentado grandes adelantos en la comprensión de la biodegradación anaerobia de los BTX en ambientes naturales desprovistos de oxígeno (Chakraborty y Coates 2004). En estos trabajos se han estudiado una gran diversidad de aceptadores de electrones que pueden usarse en ausencia de oxígeno, como son los siguientes: nitrato, sulfato, Fe (III), Mn (II), Mn (IV), quinonas, humus y CO<sub>2</sub> (Edwards y *col.* 1992; Langenhoff y *col.* 1997; Lovley 1997; Cervantes y *col.* 2001; Coates y *col.* 2001). Una gran cantidad de bacterias han mostrado la capacidad de oxidar a los BTX en forma individual y en mezcla bajo condiciones anaerobias (Tabla 9). Como puede observarse, los xilenos son los compuestos que han sido menos estudiados. Algunos estudios han reportado valores de mineralización cercanos al 100% (Edwards y *col.* 1992; Häner y *col.* 1995; Lovley y *col.* 1996; Chen y Taylor 1997; Weiner y Lovley 1998; Burland y Edwards 1999). Como en otros casos, no se reportan las velocidades específicas de consumo del compuesto aromático y de producción de CO<sub>2</sub>, las velocidades específicas de utilización del aceptor de electrones ni los balances de materia. No obstante a que estos trabajos presentan evidencias valiosas sobre la posibilidad de eliminar los BTX en cultivos anaerobios, una gran desventaja es el largo tiempo de reacción requerida para la eliminación anaerobia de los BTX (Lovley y *col.* 1995; Anderson y *col.* 1998; Caldwell y Suflita 2000). Como puede observarse en la Tabla 10, las velocidades volumétricas de biodegradación aerobia de los BTX son, por el contrario, mayores que las reportadas en procesos anaerobios.

**Tabla 9.** Biodegradación anaerobia de BTX por diferentes fuentes de inóculo con diferentes aceptores de electrones.

Hidrocarburo	Aceptor de electrones							
	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>		Fe <sup>III</sup> , Mn <sup>II</sup> , Mn <sup>IV</sup>		SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>		CO <sub>2</sub>	
	Inóculo	Referencia	Inóculo	Referencia	Inóculo	Referencia	Inóculo	Referencia
Benceno	<i>Dechloromonas</i> RCB	Coates y col. (2001)	<i>Geobacter metallireducens</i>	Lovley y col. (1996)	Suelo contaminado	Lovley y col. (1995)	Lodo activado	Chaudhuri y Wiesmann (1995)
	Acuífero contaminado	Gersberg y col. (1991); Anid y col. (1993); Reinhard y col. (1997); Reusser y col. (2002)	Acuífero contaminado	Anderson y col. (1998); Varga y col. (1999)	Acuífero contaminado	Reinhard y col. (1997); Weiner y Lovley (1998); Caldwell y Suflita (2000)	Acuífero contaminado	Weiner y Lovley (1998b)
	Suelo contaminado	Burland y Edwards (1999)						
	<i>Thaurea aromatica</i> , <i>Azoarcus evansii</i> (K 172, KB 740)	Anders y col. (1995)						
	Consorcio	Alvarez y Vogel (1995); Ma y Love (2001)			Consorcio	Chen y Taylor (1997)		
Tolueno	<i>Thaurea aromatica</i> T1	Evans y col. (1991)	<i>Geobacter metallireducens</i> y <i>Geobacter grbicum</i>	Lovley y col. (1989); Coates y Lovley (2003)	Sedimento contaminado	Edwards y col. (1992)		
	<i>Azoarcus sp.</i>	Dolfing y col. (1990)			Tol2	Rabus y col. (1993)		
	<i>Dechloromona</i>	Coates y col. (2001)				Reinhard y col. (1997)		
	Bacteria desnitrificante	Evans y col. (1991)			Acuífero contaminado	Chen y Taylor (1997)		
	Consorcio	Alvarez y Vogel (1995)			Consorcio	Chen y Taylor (1997)		
	<i>Thaurea sp.</i> DNT-1	Shinoda y col. (2004)			Bacteria sulfato reductora Tol2	Rabus y col. (1993)		
	Acuífero contaminado	Gersberg y col. (1991); Hutchins y col. (1991); Anid y col. (1993); Elmen y col. (1997); Reinhard y col. (1997); Reusser y col. (2002)						

**Tabla 9.** Biodegradación anaerobia de BTX por diferentes fuentes de inóculo con diferentes aceptores de electrones (continuación).

Hidrocarburo	Aceptor de electrones							
	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>		Fe <sup>III</sup> , Mn <sup>II</sup> , Mn <sup>IV</sup>		SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>		CO <sub>2</sub>	
	Inóculo	Referencia	Inóculo	Referencia	Inóculo	Referencia	Inóculo	Referencia
<i>o</i> -Xileno	Acuífero contaminado  Consorcio Bacteria desnitrificante pCyN1	Gersberg <i>y col.</i> (1991); Hutchins <i>y col.</i> (1991); Anid <i>y col.</i> (1993); Reinhard <i>y col.</i> (1997); Reusser <i>y col.</i> (2002)  Alvarez y Vogel (1995); Ma y Love (2001) Harms <i>y col.</i> (1999)			Sedimento contaminado  Acuífero contaminado  Consorcio  Bacterias sulfato reductoras oXyS1 y mXyS1	Edwards <i>y col.</i> (1992)  Reinhard <i>y col.</i> (1997)  Chen y Taylor (1997)  Harms <i>y col.</i> (1999)	Acuífero contaminado  XyS1 y mXyS1	Reinhard <i>y col.</i> (1997)  Harms <i>y col.</i> (1999)
<i>m</i> -Xileno	Acuífero contaminado  Consorcio Bacteria desnitrificante pCyN1	Gersberg <i>y col.</i> (1991); Hutchins <i>y col.</i> (1991); Anid <i>y col.</i> (1993); Reinhard <i>y col.</i> (1997); Reuser <i>y col.</i> (2002)  Alvarez y Vogel (1995)  Harms <i>y col.</i> (1999)			Sedimento contaminado  Acuífero contaminado, XyS1 y mXyS1  Consorcio  Bacterias sulfato reductoras oXyS1 y mXyS1	Edwards <i>y col.</i> (1992)  Reinhard <i>y col.</i> (1997); Harms <i>y col.</i> (1999)  Chen y Taylor (1997)  Harms <i>y col.</i> (1999)		
<i>p</i> -Xileno	Acuífero contaminado  Consorcio	Gersberg <i>y col.</i> (1991); Hutchins <i>y col.</i> (1991); Anid <i>y col.</i> (1993); Häner <i>y col.</i> (1995); Reuser <i>y col.</i> (2002)  Ma y Love (2001)			Sedimento contaminado  Consorcio	Edwards <i>y col.</i> (1992)  Chen y Taylor (1997)		

**Tabla 10.** Comparación de las velocidades volumétricas de eliminación aerobia y anaerobia de los compuestos BTX.

Compuesto aromático	Velocidad volumétrica de eliminación aerobia (µg/l.h)	Referencias	Velocidad volumétrica de eliminación anaerobia (µg/l.h)	Referencias
Benceno	966	Chen y Taylor (1997)	3.7	Chaudhuri y Wiesmann (1995)
	47800	Shim y Yang (1999)		
	9500	Deeb y col. (2001)		
Tolueno	1278	Chen y Taylor (1997)	8.3	Hutchins (1991)
	35000	Shim y Yang (1999)	4.5	Reinhard y col. (1997)
<i>o</i> -Xileno	574	Chen y Taylor (1997)	5.4	Hutchins (1991)
	12800	Shim y Yang (1999)	0.1	Reinhard y col. (1997)
<i>m</i> -Xileno	286	Chen y Taylor (1997)	5.8	Hutchins (1991)
			2.8	Reinhard y col. (1997)

A pesar de la considerable información existente sobre la biodegradación de los BTX por microorganismos heterotróficos en condiciones aerobias y anaerobias, aún hace falta información de tipo cinético para entender mejor cada uno de estos procesos, así como estudios de la oxidación de los BTX con consorcios microbianos.

Sobre la biodegradación en autotrofia de los BTX, los estudios realizados son escasos, provocando incertidumbre sobre su efecto y transformación en cultivos autotróficos. No obstante que la actividad de los microorganismos nitrificantes puede ser inhibida por la presencia de materia orgánica, también se ha mostrado la capacidad de estas bacterias a biotransformar compuestos orgánicos, entre los cuales se encuentran el benceno y el tolueno.

### ***1.2.3 Biotransformación de compuestos orgánicos en cultivos nitrificantes***

No se han podido realizar estudios *in vivo* y *in vitro* de la enzima AMO, debido a que todavía no ha podido ser extraída y purificada. Sin embargo, diferentes estudios con *Nitrosomonas europaea* han permitido establecer la capacidad de la enzima AMO para oxidar una extensa gama de sustratos, además del amoníaco, incluyendo la oxidación de enlaces C-H en alcoholes, enlaces C=C en epóxidos y sulfuros en óxidos de azufre. Asimismo, se ha reportado que la AMO es capaz de oxidar alquil y aril hidrocarburos, hidrocarburos halogenados, aromáticos, compuestos clorados y varios otros. La participación de la enzima AMO en la oxidación de estos compuestos orgánicos fue mostrada a través de su inhibición en presencia de aliltiurea. En presencia de aliltiurea en cultivos de

*Nitrosomonas europaea*, la oxidación del compuesto orgánico no fue llevada a cabo (Hyman y Wood 1984, Keener y Arp 1994, McCarty 1999). Es bien conocido que durante la participación de una monooxigenasa, en la oxidación de un compuesto aromático, se incorpora un grupo hidroxilo en el sustrato, utilizando como cofactor un metal, flavinas o pteridina que interactúan con el oxígeno molecular (Harayama y col. 1992). En la Tabla 11 se muestran algunos ejemplos de los compuestos orgánicos que han sido reportados como oxidados por la enzima AMO.

**Tabla 11.** Oxidación de compuestos orgánicos a través de la AMO, en condiciones nitrificantes, utilizando a *Nitrosomonas europaea* como fuente de inóculo.

Compuesto orgánico	Producto mayoritario	Referencia
Metano	Metanol	Hyman y Wood (1983)
Etileno	Oxido de etileno	Hyman y Wood (1984)
Metanol	Formaldehído	Voysey y Wood (1987)
Monóxido de carbono	Dióxido de carbono	Tsang y Suzuki (1982)
Metil fluoruro y dimetil éter	Formaldehído y metanol-formaldehído	Hyman y col. (1994)
Alcanos (hasta C <sub>8</sub> )	Alcoholes	Hyman y col. (1988)
Alquenos (hasta C <sub>5</sub> )	Epóxidos y alcoholes	Hyman y col. (1988)
<i>Trans</i> -2-buteno	2-buteno-1-ol	Vannelli y col. (1990)
Metil sulfuro	Metil sulfóxido	Juliette y col. (1993)
Iodoetano	Acetaldehído	Rasche y col. (1990a)
Fluorometano	Formaldehído	Rasche y col. (1990a)
Bromoetano	Acetaldehído	Rasche y col. (1990b)
Clorometano	Formaldehído	Rasche y col. (1990b)
Benceno	Fenol	Keener y Arp (1994)
Tolueno	Alcohol bencílico y benzaldehído	"
Etilbenceno	Fenetil alcohol	"
p-Xileno	4-metilbencil alcohol	"
naftaleno	2-naftol	Chang y col. (2002)
Estireno	Fenilglioxal	Keener y Arp (1994)
Clorobenceno	4-Clorofenol	"
Anilina	Nitrobenceno	"
Nitrobenceno	3-Nitrofenol	"
Acetofenona	2-Hidroxiacetofenona	"
Alcohol bencílico	Benzaldehído	Keener y Arp (1994)
Fenol	Hidroquinona	Hyman y col. (1985)
Nitrapirina (aerobio)	6-Ácido cloropicolinico	Vannelli y Hooper (1992)
Nitrapirina (anaerobio)	2-cloro-6-diclorometil piridina	Vannelli y Hooper (1993)

Como puede observarse, existe una amplia gama de compuestos orgánicos que pueden ser oxidados por la enzima AMO. No obstante, la mayoría de estos estudios carecen de datos cinéticos de la oxidación de amonio a nitrito y nitrato, así como la oxidación de los compuestos aromáticos y de la formación de los intermediarios, además de que no se hace mención a las interacciones de los diversos microorganismos presentes en un consorcio nitrificante.

## **2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

### **2.1 Justificación**

Actualmente existe escasa información del proceso nitrificante en presencia de BTX empleando un consorcio nitrificante. Se ha observado la falta de datos cinéticos del consumo de amonio y producción de nitrito y nitrato, así como del efecto de los BTX sobre la eficiencia de consumo de amonio y los rendimientos de producción de nitrito y nitrato. También se ha destacado la escasez de datos cinéticos sobre la biotransformación de BTX y sus intermediarios. De esta manera, este trabajo ha sido dirigido para proporcionar información fisiológica de la nitrificación en cultivo en lote en presencia de BTX en forma individual, y en mezcla, empleando un consorcio nitrificante. No obstante que el propósito de este trabajo es de tipo básico, no hay duda de que los resultados que se obtengan, serán de gran utilidad cuando se apliquen al tratamiento de las aguas contaminadas con los BTX.

### **2.2 Objetivo general**

- ◆ Estudiar y entender, en cultivos en lote, el efecto de los BTX sobre el proceso respiratorio nitrificante y su biotransformación en forma individual y en mezcla.

### **2.3 Objetivos particulares**

- ◆ Estudiar el efecto de diferentes concentraciones iniciales de BTX en forma individual y en mezcla sobre la eficiencia de consumo de amonio y el rendimiento en la producción de nitrito y nitrato del proceso nitrificante.
- ◆ Estudiar y comparar el efecto inhibitorio de los BTX sobre la nitrificación en presencia de cada uno de los compuestos en forma individual y en mezcla, mediante estudios cinéticos del proceso nitrificante.
- ◆ Estudiar y comparar la biotransformación de los compuestos BTX en forma individual y en mezcla en cultivos nitrificantes mediante estudios cinéticos.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1 Métodos analíticos

##### 3.1.1 Cuantificación de amonio

Para la determinación de amonio se utilizó un electrodo selectivo del ión amoniaco (pHoenix Electrodo Co.), cuya respuesta de linealidad se obtiene en un intervalo de 0.01 a 1000 mg/l de amoniaco. La muestra se alcaliniza con hidróxido de sodio para desprotonar el ión amonio convirtiéndose en amoniaco (Cleseri y col. 1998). La lectura del potencial generado por el electrodo se efectúa con un potenciómetro, bajo agitación constante y temperatura ambiente. La concentración de amonio fue determinada mediante una curva de calibración construida a partir de una solución estándar de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . El valor cuantificado es proporcional al logaritmo de la concentración, cuyo valor puede ser calculado de la ecuación de la recta obtenida por los estándares. Los estándares y las muestras fueron medidos por triplicado. El grado de reproducibilidad fue de 98%.

##### 3.1.2 Cuantificación de nitrito y nitrato

La cuantificación de  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$  fue realizada por electroforesis capilar, mediante un analizador capilar de iones (CIA 4000, Millipore<sup>TM</sup>) a temperatura ambiente (Texier y Gomez 2002). Para establecer las curvas de calibración, se emplearon soluciones estándares de nitrato de potasio y nitrito de sodio, a diferentes concentraciones. Previo al análisis por electroforesis capilar, las muestras fueron sometidas a centrifugación de 9,500g durante 10 min. El sobrenadante fue filtrado con una membrana de nylon de 13 mm de diámetro y 0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro. Los estándares y las muestras fueron medidos por triplicado. El grado de reproducibilidad fue de 98%.

##### 3.1.3 Medición de proteína

La medición de proteína microbiana se llevó a cabo empleando el método de Lowry (Lowry y col. 1951). El método es sensible a concentraciones de 10  $\mu\text{g/ml}$ . La técnica está sujeta a interferencias, entre otros, por Tris o EDTA. Este método tiene ventajas de ser confiable para cuantificar proteínas, además de sólo presentar pequeñas variaciones en la determinación de la concentración cuando se miden diferentes proteínas.



La concentración de proteína fue determinada mediante una curva de calibración construida a partir de una solución estándar de albúmina. El valor cuantificado puede ser calculado de la ecuación de la recta obtenida por los estándares. Los estándares y las muestras fueron medidos por triplicado. El grado de reproducibilidad fue de 98%.

#### ***3.1.4 Cuantificación de carbono orgánico e inorgánico***

El carbono total se midió con un analizador de carbono orgánico total (TOC-5000 de Shimadzu<sup>TM</sup>). El principio de su determinación se basa en la propiedad de absorción de radiación infrarroja que presentan las moléculas poliatómicas de gas como el CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub>.

La concentración de carbono inorgánico fue determinada siguiendo el mismo procedimiento que para el carbono total, con la diferencia de que la muestra es acidificada con ácido fosfórico al 25%, con el objetivo de convertir al componente inorgánico a CO<sub>2</sub>. El carbono orgánico es determinado a través de la diferencia entre estas dos lecturas. Cada muestra fue analizada por duplicado, con un grado de reproducibilidad del 99%.

#### ***3.1.5 Medición de benceno, tolueno y m-xileno***

Se determinaron las concentraciones de benceno, tolueno, y *m*-xileno en el espacio de cabeza y la fase líquida de las botellas serológicas, a través de cromatografía de gases (Varian Star 3400), con un detector de ionización de flama (FID). Un volumen de muestra de 0.2 µl (muestra gaseosa y líquida) fue inyectado en una columna capilar con fase estacionaria carbowax/BTR, con 30 m de longitud, 0.53 mm de diámetro y un espesor de película de 0.1 µl (Quadrex, Woodbridge, USA). Las temperaturas del horno, inyector y detector fueron fijadas a 60, 235, y 250°C, respectivamente. Como gas acarreador se usó al nitrógeno con un flujo constante de 4 ml/min.

#### ***3.1.6 Medición de intermediarios aromáticos***

La cromatografía líquida (HPLC) fue empleada para llevar a cabo la medición de fenol, alcohol bencílico y benzaldehído. Se usó una columna C18 de fase reversa y una fase móvil de acetonitrilo/agua (6:4, v/v) con flujo de 1.5 ml/min. Se empleó un detector de luz ultravioleta con una longitud de onda de 254 nm. La concentración de cada uno de los intermediarios fue calculada usando sus respectivas curvas de calibración. Cada muestra fue analizada al menos por duplicado, con un grado de reproducibilidad del 98%.

### 3.1.7 Medición de ácidos grasos volátiles

El ácido acético, propiónico y butírico fueron medidos por cromatografía de gases (Hewlett-Packard 5890) usando un detector FID y una columna capilar (AT-1000). Las temperaturas del horno, inyector y detector fueron fijadas a 120, 130, y 150°C, respectivamente. Se usó al nitrógeno como gas acarreador con un flujo constante de 4 ml/min. Cada muestra fue analizada al menos por duplicado, con un grado de reproducibilidad de alrededor del 92%.

### 3.1.8 Medición del oxígeno disuelto

La concentración de oxígeno disuelto fue determinada a través de la ley de Henry, asumiendo que el oxígeno es un gas ideal (Berry y col. 1980). La presión parcial del oxígeno fue medida dentro de la botella serológica, herméticamente sellada, usando un medidor digital de presión (Deneb modelo DPM-2015). El procedimiento para calcular la concentración de oxígeno disuelto en cada una de las botellas serológicas fue el siguiente: En primer lugar se determinó la fracción molar del oxígeno presente, bajo las condiciones de trabajo, a través de la ecuación 18.

$$x_{O_2} = \frac{P_{O_2}}{k_{O_2} P} \quad (18)$$

en donde  $x_{O_2}$  : fracción molar de oxígeno

$P_{O_2}$  : presión parcial del oxígeno (atm)

$k_{O_2}$  : constante de Henry para el oxígeno ( $4.75 \times 10^{-4}$  atm/mol) (Liley y col. 1997)

$P$  : presión total (1 atm)

Posteriormente considerando que la fracción molar del  $O_2$  en el agua es relativamente pequeña se usó la siguiente aproximación de acuerdo a Berry y col. (1980):

$$x_{O_2} = \frac{n_{O_2}}{n_{O_2} + n_{H_2O}} \approx \frac{w_{O_2} / M_{O_2}}{w_{H_2O} / M_{H_2O}} \quad (19)$$

en donde  $n$  : número de moles;  $w_i$  : la masa del componente y;  $M_i$  el peso molecular del componente (g/mol). Por lo tanto la ecuación (19) queda de la forma siguiente:

$$w_{O_2} = x_{O_2} \cdot \frac{w_{H_2O} M_{O_2}}{M_{H_2O}} \quad (20)$$

Con la ecuación 20 se calculó la concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo.

## **3.2 Materiales**

### **3.2.1 Reactor continuo nitrificante de tanque agitado**

Como fuente de inóculo para los cultivos en lote, se utilizó un cultivo nitrificante en estado estacionario. El reactor, con un volumen de operación de 3 l, fue operado por más de 3 años con una agitación de 200 rpm, una temperatura constante de 30°C, un pH de  $8.0 \pm 0.5$  y un tiempo de retención hidráulica de 2.2 d. El reactor fue aireado de manera continua con 2 volúmenes de aire por volumen de líquido por minuto (vvm), con una concentración promedio de proteína microbiana de  $0.36 \pm 0.04$  g/l. El medio de cultivo estuvo compuesto por dos medios (A y B), los cuales fueron alimentados al reactor por separado para evitar la precipitación de algunos componentes. Un volumen de 200 ml del medio A fue diluido en un litro de agua para poder obtener la siguiente composición de nutrientes (g/l):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (5.9),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (4.8),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (7.0),  $\text{MgSO}_4$  (3.0), y  $\text{NaCl}$  (5.0), obteniendo una concentración total de  $\text{N-NH}_4^+$  de 500 mg/l. Por otro lado, la composición de nutrientes del medio B fue la siguiente (g/l):  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0.4) y  $\text{NaHCO}_3$  (40.4), el cual actuó como solución amortiguadora del pH, y como fuente de carbono. Ambos medios A y B fueron alimentados con un flujo de 1.19 y 0.26 l/d, respectivamente. También fue adicionado diariamente  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  al reactor a 0.01 g/l.d.

### **3.2.2 Cultivo nitrificante en lote**

#### **3.2.2.1 Inóculo y medio de cultivo de los ensayos en lote**

El inóculo utilizado en estos ensayos fue extraído del reactor continuo nitrificante de tanque agitado, en régimen estacionario. El medio de cultivo para los estudios en lote fue una mezcla de los medios A y B con las siguientes relaciones: C/N de 5.0, N/S de 1.1, y N/P de 1.6. La concentración inicial de  $\text{N-NH}_4^+$  fue de  $100 \pm 10$  mg/l. La composición de nutrientes bajo estas condiciones fue la siguiente (g/l):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0.24),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (0.19),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.28),  $\text{MgSO}_4$  (0.12),  $\text{NaCl}$  (0.20),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.01),  $\text{CaCl}_2$  (0.03) y  $\text{NaHCO}_3$  (3.5). El pH inicial del medio fue de 8.5.

### **3.2.2.2 Cultivos nitrificantes en lote con benceno, tolueno y *m*-xileno**

Todos los experimentos fueron llevados a cabo en botellas serológicas de 120 ml. Se usó un volumen de trabajo de 50 ml y un espacio de cabeza de 70 ml. La fase líquida representada por el medio de cultivo nitrificante fue saturada con oxígeno disuelto (99.6% de pureza) durante 5 min. Posteriormente, fue adicionado el lodo nitrificante al medio de cultivo, para tener una concentración de  $150 \pm 10$  mg de proteína microbiana/l. Una vez sellada la botella serológica, se desplazó al aire del espacio de cabeza con oxígeno durante 5 min. En los estudios en presencia de los BTX en forma individual y en mezcla se adicionaron los compuestos aromáticos mediante una jeringa de 10  $\mu$ l, obteniendo concentraciones iniciales de 5, 10, 20, 30, 40 y 50 mg/l. Cada una de las botellas fue colocada en un agitador orbital a 200 rpm a una temperatura constante de 30°C, durante 16 h. Todos los ensayos fueron realizados al menos por duplicado.

### **3.2.2.3 Ensayos de toxicidad**

Para evaluar la toxicidad de cada uno de los BTX, sobre el lodo nitrificante, el inóculo expuesto a los compuestos aromáticos, fue recuperado por centrifugación (9500g por 20 min). El sedimento fue lavado dos veces con una solución de NaCl (9 g/l). El tiempo de reacción fue de 16 h. Todos los ensayos fueron realizados al menos por duplicado.

### **3.2.2.4 Estudio cinético del proceso nitrificante en presencia de benceno, tolueno y *m*-xileno**

En este estudio cinético se utilizaron concentraciones iniciales de 5, 10 y 20 mg C/l de cada uno de los BTX en forma individual. Para las mezclas binarias y ternarias de BTX se utilizaron concentraciones iniciales de 2.5 mg C/l para cada uno de los compuestos. A cada concentración inicial de BTX se prepararon diferentes cultivos con diferentes tiempos de reacción para realizar cinéticas de la nitrificación sobre 24 h. Todos los ensayos fueron realizados al menos por duplicado.

### **3.2.2.5 Controles**

#### ***3.2.2.5.1 Ensayos abióticos***

Se llevaron a cabo pruebas abióticas para determinar la posible pérdida de los BTX por volatilización. Fueron empleadas concentraciones iniciales de 5, 10, 20, 30, 40 y 50 mg C/l

para cada uno de los compuestos aromáticos. A diferentes tiempos sobre 24 h y hasta 7 d, fueron tomadas las muestras para determinar la concentración de BTX en la fase líquida y gaseosa. Bajo estas condiciones, la relación de la concentración del benceno, del tolueno y del *m*-xileno en el espacio de cabeza y en la fase líquida mostró valores constantes de 20% y 80%, respectivamente. Todos los ensayos fueron realizados al menos por duplicado.

#### **3.2.2.5.2 Ensayos con lodo nitrificante estéril**

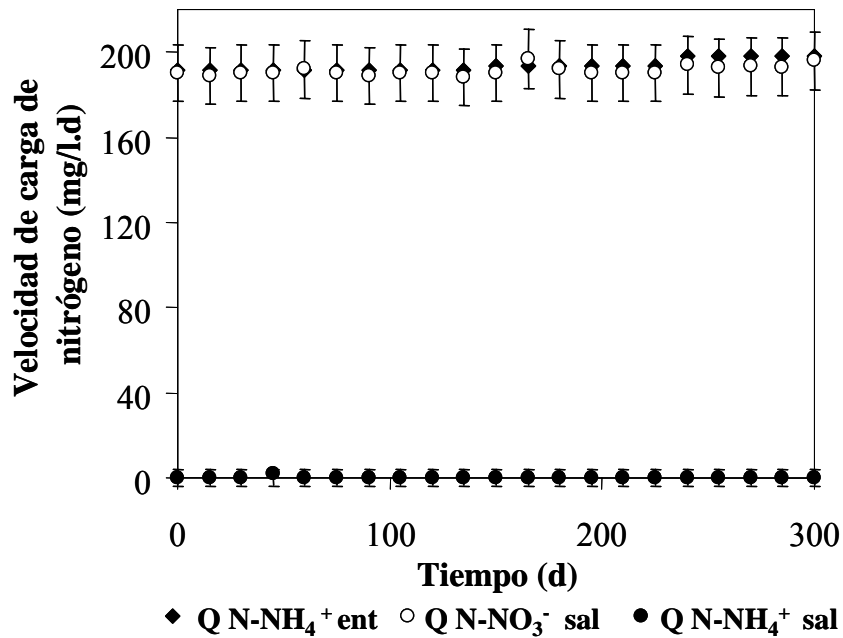
Para determinar la posible adsorción de los BTX sobre la biomasa nitrificante, se utilizó lodo estéril como fuente de inóculo en cultivos en lote control. Se utilizó una concentración inicial de 20 mg C/l para cada uno de los BTX. Después de un tiempo de reacción de 16 h, la concentración del compuesto aromático en la fase líquida y gaseosa fue cuantificada. Todos los ensayos fueron realizados al menos por duplicado.

Todas las muestras obtenidas en este trabajo fueron filtradas (0.45  $\mu\text{m}$ ) y analizadas para determinar la concentración de amonio, nitrito y nitrato. La eficiencia de consumo de amonio ( $\text{E-NH}_4^+$ ) fue calculada a partir del sustrato inicial y residual y expresada en porcentaje. El rendimiento de la formación de nitrito y nitrato ( $\text{Y-NO}_2^-$  y  $\text{Y-NO}_3^-$ ) fue calculado a partir del sustrato consumido convertido en nitrito y nitrato, respectivamente y expresado en  $\text{g N-NO}_x^- / \text{g N-NH}_4^+$ . Las velocidades volumétricas de consumo de amonio y producción de nitrato fueron calculadas a partir de las cinéticas y expresadas en  $\text{g N/l.h}$ . Conociendo la concentración en proteína microbiana y asumiendo que el 16% de la proteína total es nitrógeno, las velocidades específicas de consumo de  $\text{N-NH}_4^+$  y producción de  $\text{N-NO}_3^-$  fueron calculadas y expresadas en  $\text{g N/g N de proteína microbiana.h}$ . Estas muestras también fueron analizadas para determinar la concentración de cada uno de los BTX, de los intermediarios y de los productos finales. El mismo método para determinar las velocidades específicas de la nitrificación fue empleado para determinar las velocidades específicas de consumo de los BTX.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSION

### 4.1 Reactor continuo: fuente de inóculo

La Figura 2 muestra los perfiles de las velocidades de carga de  $\text{N-NH}_4^+$  ( $Q \text{ N-NH}_4^+_{\text{ent}}$ ), las velocidades de producción de  $\text{N-NO}_3^-$  ( $Q \text{ N-NO}_3^-_{\text{sal}}$ ) y las velocidades de salida de  $\text{N-NH}_4^+$  ( $Q \text{ N-NH}_4^+_{\text{sal}}$ ). Aunque la Figura 2 presenta los datos experimentales obtenidos sobre un período de alrededor de 10 meses, cabe mencionar que el reactor continuo nitrificante fue operado y evaluado durante todo el tiempo de este trabajo. En cualquier momento los perfiles mantuvieron la misma tendencia, en consecuencia la eficiencia de consumo de amonio y el rendimiento no mostraron cambios significativos.



**Figura 2.** Perfil de las velocidades de carga y descarga de amonio y nitrato en el reactor continuo nitrificante.

El reactor continuo nitrificante fue alimentado con una velocidad de carga de  $\text{N-NH}_4^+$  constante de  $194 \pm 4$  mg/l.d. Durante el tiempo de operación del reactor, se obtuvo una velocidad de producción de  $\text{N-NO}_3^-$  de  $191 \pm 7$  mg/l.d. La velocidad de salida de  $\text{N-NH}_4^+$  permaneció baja con valores alrededor de 0.2 mg/l.d. En consecuencia, el lodo nitrificante alcanzó el estado estacionario, debido a que las velocidades de carga y descarga en  $\text{N-NH}_4^+$  y  $\text{N-NO}_3^-$  permanecieron constantes. Bajo estas condiciones, la eficiencia de consumo de amonio ( $\text{E-NH}_4^+$ ) fue cercana al 100% con un rendimiento de producción en  $\text{N-NO}_3^-$  (Y-

$\text{NO}_3^-$ ) de 0.98. Durante toda la operación del reactor continuo, el nitrito no fue detectado en el cultivo. En concordancia con el proceso netamente desasimilativo, la velocidad de producción en proteína microbiana fue baja y permaneció cercana a 12 mg/l.d, lo que corresponde a una velocidad aproximada de 1.9 mg N-proteína/l.d. En estos términos, sólo el 1% del nitrógeno de amonio consumido fue utilizado para biosíntesis de biomasa microbiana. Por lo tanto, durante la operación del reactor en continuo, se obtuvo un proceso nitrificante desasimilativo en régimen estacionario (y dada la escasa acumulación de biomasa, es posible decir que el cultivo operó en casi régimen estacionario).

Una forma de entender por que el lodo nitrificante no creció, podría estar relacionada con la definición química del influente. La relación C/N fue muy baja y desbalanceada para un proceso de biosíntesis de proteína. Asimismo, y como se señaló antes, la producción de energía (ATP) durante la oxidación del amonio a nitrito y nitrato es muy baja. Por lo tanto, la producción de ATP será muy baja, la fijación de  $\text{CO}_2$  también y, por lo tanto, la formación de biomasa microbiana tuvo que ser baja. De hecho, los resultados de producción de biomasa son consistentes con las velocidades de alimentación de nitrógeno amoniacal las cuales fueron muy bajas (con una concomitante baja y lenta producción de energía). En conclusión, el comportamiento del lodo nitrificante, en términos de producción de biomasa fue el esperado. Como puede apreciarse, los procesos de lodos activados no son, productores intrínsecos de sólidos suspendidos volátiles.

#### **4.2 Efecto del benceno sobre el cultivo nitrificante**

Resumen del artículo de Zepeda y col. (2003), Benzene transformation in nitrifying batch cultures, *Biotechnol. Prog.* 19: 789-793.

El efecto del benceno sobre la actividad de un lodo nitrificante, producido en estado estacionario, se evaluó por medio de cultivos en lote. En el cultivo control nitrificante, sin benceno, se obtuvo después de 16 h, una eficiencia de consumo de  $\text{N-NH}_4^+$  cercana al 100% y un rendimiento de producción en  $\text{N-NO}_3^-$  de 0.89. Estos resultados mostraron que bajo las condiciones de cultivo en lote el proceso nitrificante se llevó a cabo eficazmente. El proceso oxidativo no estuvo limitado por el oxígeno disuelto. En los cultivos nitrificantes de 16 h, en presencia de diferentes concentraciones iniciales de benceno (5-50

mg/l), se observó que una concentración de 5 mg/l de benceno no afectó significativamente el proceso nitrificante. Sin embargo, concentraciones mayores de benceno (10-50 mg/l) provocaron una disminución en la oxidación del  $\text{N-NH}_4^+$  (57 a 76%) y en la producción de  $\text{N-NO}_3^-$  (53 a 80%). En concentraciones de 20 a 50 mg/l de benceno, la concentración de amonio residual permaneció constante a un valor promedio de  $71 \pm 4$  mg/l. La producción de  $\text{N-NO}_2^-$  fue detectada con concentraciones entre 4 y 8 mg/l. A través de estos resultados puede observarse que el benceno afectó significativamente la actividad nitrificante del lodo, disminuyendo la oxidación del amonio a nitrato. En las pruebas de toxicidad se observó que el inóculo que había sido expuesto a concentraciones de 10 mg/l de benceno, recuperó una significativa parte de su actividad nitrificante, con una eficiencia de consumo de  $\text{N-NH}_4^+$  de 84% y un rendimiento en la producción de  $\text{N-NO}_3^-$  de 0.91. Sin embargo el inóculo que estuvo en presencia de 20 a 50 mg/l de benceno no fue capaz de oxidar completamente el amonio a nitrato, observándose una acumulación de amonio ( $50 \pm 3$  mg/l) y de nitrito ( $30 \pm 3$  mg/l) en los cultivos. Estos resultados sugieren que el benceno a concentraciones de 20 a 50 mg/l afecta tanto la actividad de las bacterias amonio-oxidantes, como de las nitrito-oxidantes. En los estudios cinéticos de 24 h realizados a concentraciones iniciales de benceno de 0, 7, y 10 mg/l, se observó un efecto inhibitorio del benceno sobre el proceso nitrificante, el que se evidenció con una disminución significativa de las velocidades específicas de consumo de amonio (79 y 82%) y de producción de nitrato (44 y 74%). A concentraciones iniciales de benceno de 0, 7 y 10 mg/l, las velocidades específicas de producción de nitrato fueron de  $0.545 \pm 0.101$ ,  $0.306 \pm 0.024$ , y  $0.141 \pm 0.010$  g  $\text{N-NO}_3^-$ / g N de proteína microbiana.h, respectivamente. A concentraciones iniciales de 7, 12, y 20 mg/l, el consumo de benceno empezó después de un tiempo de adaptación de 6 h a una velocidad específica de  $0.034 \pm 0.003$ ; de 15 h a una velocidad específica de  $0.050 \pm 0.006$ , y; de 56 h a una velocidad específica de  $0.027 \pm 0.002$  g/g N de proteína microbiana.h, respectivamente. Hasta una concentración de 10 mg/l, el benceno fue primeramente oxidado a fenol y posteriormente ambos compuestos, fenol y benceno, fueron totalmente oxidados a acetato. A concentraciones mayores de benceno (20 y 30 mg/l), el compuesto aromático fue convertido en intermediarios distintos al acetato, fenol, o catecol, los cuales no fueron detectados.

En este trabajo se llevo a cabo el estudio del comportamiento del lodo nitrificante en presencia de benceno, obteniéndose información de su efecto sobre la cinética de



oxidación del amonio, producción de nitrito y nitrato, y transformación del benceno sobre un consorcio nitrificante. Sin embargo, este trabajo carece de información sobre el comportamiento del lodo nitrificante en presencia de compuestos aromáticos con diferentes estructuras químicas como lo son el tolueno y *m*-xileno. De esta manera el siguiente trabajo que se planteó en esta tesis, fue el de comparar el efecto del benceno, tolueno y *m*-xileno sobre un lodo nitrificante.

En el Anexo I se presentan los detalles de los resultados y discusión del efecto de benceno sobre un cultivo nitrificante, obtenido durante el desarrollo experimental de esta tesis.

#### **4.3 Comparación del efecto del benceno, tolueno y *m*-xileno en forma individual sobre el cultivo nitrificante**

Resumen del artículo de Zepeda y col. (2005), Kinetic and metabolic study of benzene, toluene and *m*-xylene in nitrifying batch cultures, enviado a *Applied and Environmental Microbiology*.

Fue evaluado, en cultivos en lote, el efecto del benceno, tolueno y *m*-xileno (BTX) en forma individual sobre la actividad de un lodo nitrificante producido en estado estacionario. En el cultivo control nitrificante, sin BTX, se obtuvo una eficiencia de consumo de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (E-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) cercana al 100% y un rendimiento en la producción de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Y-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) de 0.91. En los cultivos nitrificantes en presencia de diferentes concentraciones iniciales de benceno, tolueno y *m*-xileno en forma individual (5-50 mg C/l), se observó que en presencia de 5 mg C/l de cada uno de los BTX, no se afectó significativamente el proceso nitrificante, obteniéndose una E-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> de 95 ± 7% y Y-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> de 0.94 ± 0.04. No obstante, a 10 mg C/l de BTX, se observó una disminución en E-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> en presencia de benceno y *m*-xileno. El benceno fue el compuesto que provocó una mayor disminución en la eficiencia de consumo de amonio (E-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> de 43%, Y-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> de 1.00), mientras que el *m*-xileno provocó una disminución del 26% en la eficiencia de consumo de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (E-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> de 74%, Y-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> de 1.00). El tolueno a 10 mg C/l no afectó significativamente el proceso nitrificante. Por otro lado, concentraciones de 20 a 50 mg C/l

de BTX, el compuesto que mayormente afectó el proceso nitrificante fue el *m*-xileno con  $E-NH_4^+$  de  $11.2 \pm 2.5\%$ , seguido por el tolueno con  $E-NH_4^+$  de  $20.0 \pm 7.3\%$  y el benceno con  $E-NH_4^+$  de  $26.8 \pm 2.5\%$ . En todos los casos, el rendimiento en la producción de  $N-NO_3^-$  fue cercano a 1.0. No hubo acumulación de nitrito, su concentración fue despreciable. Estos resultados mostraron que el benceno, tolueno y *m*-xileno disminuyeron significativamente el consumo del amonio del lodo nitrificante. En los estudios sobre la toxicidad de los BTX, el lodo que fue expuesto a 5 mg C/l de cada uno de los compuestos aromáticos recuperó completamente su actividad nitrificante ( $E-NH_4^+$  de 100% y  $Y-NO_3^-$  de 1.0). A 10 mg C/l de BTX, el porcentaje de recuperación de la actividad nitrificante sobre la oxidación del  $N-NH_4^+$  fue de 100% para el tolueno, 84% para el benceno, y 76% para el *m*-xileno. El *m*-xileno fue el más tóxico. De 20 a 50 mg C/l de tolueno y *m*-xileno, no hubo recuperación de la actividad nitrificante con una concentración de  $N-NH_4^+$  no oxidado cercana a 100 mg/l. A estas concentraciones (20-50 mg C/l), el efecto tóxico del tolueno y del *m*-xileno sobre el lodo nitrificante fue mayor que el efecto del benceno. Respecto al benceno, a concentraciones de 20 a 50 mg C/l, los microorganismos recuperaron parcialmente su actividad nitrificante, debido a que  $E-NH_4^+$  estuvo entre 47 y 81% y los valores promedios de  $Y-NO_2^-$  y  $Y-NO_3^-$  fueron de  $0.53 \pm 0.13$  y  $0.39 \pm 0.13$ , respectivamente. En los estudios cinéticos realizados a concentraciones de 5, 10 y 20 mg C/l de BTX, se observó una disminución significativa de las velocidades específicas de consumo de  $N-NH_4^+$  y de producción de  $N-NO_3^-$ . Los porcentajes de disminución de las velocidades específicas de consumo de amonio (76-99%) y de producción de  $N-NO_3^-$  (45-98%) incrementaron con la concentración inicial de BTX. A 10 mg C/l de BTX, el orden de inhibición sobre la velocidad de producción de nitrato fue: benceno > *m*-xileno > tolueno mientras que con 20 mg C/l, el orden de inhibición cambió a *m*-xileno > tolueno > benceno. El estudio cinético de consumo de BTX mostró que el orden de persistencia de los BTX en el cultivo nitrificante, fue similar al orden de inhibición de la nitrificación y que, igualmente, cambió en función del compuesto aromático y de la concentración inicial. A 5 mg C/l, el tolueno fue primero oxidado a bencil alcohol, el cual fue posteriormente oxidado a butirato, mientras que el *m*-xileno fue oxidado a acetato y butirato. Debido a la escasa información existente sobre el efecto de BTX sobre el proceso nitrificante, en este trabajo se llevó a cabo el estudio comparativo de las respuestas fisiológicas del proceso nitrificante en presencia de cada uno de los compuestos aromáticos

en forma individual. Los resultados obtenidos mostraron diferencias significativas del efecto de BTX sobre el proceso nitrificante, sin embargo, en este trabajo no se obtuvo evidencia del efecto de mezclas binarias y ternarias de los compuestos BTX sobre el lodo nitrificante. De esta manera el siguiente trabajo que se planteó en esta tesis fue estudiar el efecto de mezclas binarias y ternarias del benceno, tolueno y *m*-xileno sobre un lodo nitrificante, mismo que fue producido en régimen estacionario.

En el Anexo II se presentan los detalles de los resultados y discusión del efecto de benceno, tolueno y *m*-xileno en forma individual sobre un cultivo nitrificante obtenidos durante el desarrollo experimental de esta tesis.

#### **4.4 Efecto del benceno, tolueno y *m*-xileno en mezclas binarias y ternarias sobre el cultivo nitrificante.**

Resumen del artículo de Zepeda y col. (2005), Batch nitrifying cultures in presence of mixtures of benzene, toluene, and *m*-xylene, enviado a *Biotechnology Letters*.

El efecto del benceno, tolueno y *m*-xileno (BTX) en forma individual ( $5.0 \pm 0.5$  mg C/l) y en mezclas ( $2.5 \pm 0.2$  mg C/l para cada uno de los compuestos aromáticos) sobre la actividad nitrificante de un lodo producido en estado estacionario, fue evaluado en cultivos en lote. En el cultivo control nitrificante, se obtuvo una eficiencia de consumo de  $\text{N-NH}_4^+$  cercana al 100% y un rendimiento en la producción de  $\text{N-NO}_3^-$  de 0.91. La presencia de mezclas binarias de benceno-tolueno (BT), benceno-*m*-xileno (BX), tolueno-*m*-xileno (TX) y mezcla ternaria de benceno-tolueno-*m*-xileno en los cultivos nitrificantes provocó una disminución en las velocidades específicas de consumo de  $\text{N-NH}_4^+$  (72- 90%) y de producción de  $\text{N-NO}_3^-$  (39-79%). Los resultados mostraron que el efecto inhibitorio de los BTX sobre el proceso nitrificante parece ser mayor cuando estuvieron presentes en mezclas binarias y ternarias que en forma individual. Sin embargo, después de 24 h,  $E\text{-NH}_4^+$  fue de 100% y  $Y\text{-NO}_3^-$  fue de 0.92. Los tres compuestos en mezclas binarias y ternarias desaparecieron completamente del medio de cultivo al término de las 24 h y ningún intermediario de la transformación del compuesto aromático fue detectado por

HPLC en el cultivo. Después de 24 h de cultivo, el 50% del carbono de los BTX mezclados ( $5.0 \pm 0.5$  mg C/l) fue convertido a carbono de acetato ( $2.4 \pm 0.5$  mg C/l). El orden de biotransformación de los BTX en forma individual como en mezclas fue: *m*-xileno > tolueno > benceno. La velocidad de biotransformación del *m*-xileno fue de  $0.051 \pm 0.005$  g C/g N-proteína.h en forma individual y en mezcla. Sin embargo cuando el *m*-xileno fue adicionado, la velocidad de biotransformación del benceno aumentó 50% ( $0.051 \pm 0.005$  g C/g N-proteína.h), mientras que la velocidad del tolueno disminuyó 73% ( $0.012 \pm 0.002$  g C/g N-proteína.h).

En este trabajo se aportaron evidencias del efecto de mezclas binarias y ternarias del benceno, tolueno y *m*-xileno sobre un cultivo nitrificante. Estos resultados proporcionaron información novedosa para una mejor comprensión del comportamiento del lodo nitrificante, en presencia de mezclas binarias y ternarias de los compuestos BTX. Cabe hacer notar que aún falta información más detallada sobre la biotransformación de los compuestos BTX en mezclas, debido al desconocimiento de la disposición del 50% de la materia orgánica durante este estudio. También sería necesario realizar estudios más detallados para tratar de entender mejor los mecanismos de inhibición de los procesos respiratorios amonio y nitrito-oxidantes.

En el Anexo III se presentan los detalles de los resultados y discusión del efecto de mezclas binarias y ternarias del benceno, tolueno y *m*-xileno sobre un cultivo nitrificante obtenidos durante el desarrollo experimental de esta tesis.

## 5. CONCLUSIONES GENERALES

La nitrificación biológica es un proceso respiratorio litotrófico que se caracteriza por ser lento y de bajo cambio de energía libre. Es el cuello de botella para la eliminación del nitrógeno en las aguas residuales. Las evidencias de muchos autores muestran que la nitrificación se ve afectada negativamente por cambios en el valor del pH, por el sustrato ( $\text{NH}_3$  o  $\text{NH}_4^+$ ), por la presencia de materia orgánica, principalmente, pero no exclusivamente. No obstante lo abundante de la información bibliográfica sobre la nitrificación, es aún insuficiente lo que se sabe sobre aspectos fisiológicos del proceso respiratorio, debido a que la mayoría de la información es obtenida a través de cultivos axénicos (*Nitrosomonas europaea*), tomando como variable de respuesta la oxidación del amonio en diferentes ambientes de cultivo, omitiéndose en los estudios los cálculos de eficiencia, rendimiento (conversión de amonio a nitrito y nitrato), velocidades específicas, el balance de masa y las posibles interacciones entre los microorganismos presentes en un consorcio. En este trabajo se aportó la evidencia experimental que frecuentemente se omite.

Aunque, efectivamente, las velocidades específicas de los microorganismos nitrificantes son bajas, no necesariamente el proceso nitrificante es lento. La lentitud del proceso puede ser mejorada si la densidad celular es alta, o se cuenta con reactores de velocidades altas de transporte. Por lo tanto, es altamente recomendable emplear a la nitrificación como parte del proceso para eliminar nitrógeno soluble en el agua.

Por lo antes expuesto en este trabajo se decidió revalorar el proceso nitrificante, en unos casos, y en otros abordar nuevos aspectos. En este contexto, se pudo observar que un lodo nitrificante en presencia de benceno tuvo un comportamiento cinético y metabólico no previsto. El benceno, si bien afectó el consumo del amonio, su conversión y velocidad, pudo ser biotransformado completamente a acetato, el cual puede ser mineralizado a  $\text{CO}_2$  por medio de la desnitrificación. En este último proceso, el benceno es difícilmente oxidado a  $\text{CO}_2$  (o reducido a metano, a través de la metanogénesis). No obstante que el benceno se oxidó en la nitrificación, no significa que el tolueno o el *m*-xileno, sean biotransformados y oxidados a acetato, o con la misma eficiencia, rendimiento y velocidad. Efectivamente, se notaron diferencias fisiológicas significativas del lodo nitrificante entre los BTX, de manera individual o en mezcla. Se puso en evidencia, que el comportamiento del lodo nitrificante, tanto cinética como metabólicamente, fue diferente. Las variables de

respuesta como eficiencia, rendimiento y velocidad específica mostraron cambios notables. Nuestro trabajo, por primera vez, aporta evidencias claras de que por medio de un consorcio nitrificante se pueden biotransformar contaminantes del tipo persistente (o recalcitrante), a ácidos grasos volátiles, que por medio de otras vías como la desnitrificación (o la sulfato reducción), pueden finalmente ser eliminados, y/o mineralizados. Además, se observó que en forma individual y en mezcla con una concentración de 5 mg C/l de BTX, la eficiencia nitrificante fue cercana al 100% con un rendimiento cercano a 1. En este trabajo se presenta evidencia que sugiere que la presencia de los BTX, por el tipo o concentración, se afecta particularmente la amonio oxidación, más que la nitrito oxidación. A 10 mg C/l, se obtuvo el siguiente orden de inhibición: benceno > *m*-xileno > tolueno, el cual coincidió con el orden de biotransformación de los BTX. En concentraciones entre 20 a 50 mg C/l, el orden de inhibición cambió a *m*-xileno > tolueno > benceno, en donde se observó que la magnitud y el orden creciente del efecto inhibitorio de los BTX y de su biotransformación en el cultivo nitrificante, no sólo dependen de la naturaleza del compuesto aromático, sino también de su concentración inicial. Igualmente, se observó que las mezclas binarias y ternarias de los compuestos BTX provocaron una mayor disminución de las velocidades específicas de consumo de amonio y producción de nitrato que las obtenidas en forma individual. Con evidencias de este trabajo, y la existente en la literatura, se trató de explicar por qué hubo tal afectación. El argumento utilizado fue a través del papel que juega la enzima amonio monooxigenasa y su relación con los hidrocarburos; la estructura química de los compuestos aromáticos que puede influir sobre su estabilidad en el cultivo (a bajas concentraciones  $\leq 10$  mg C/l); el efecto de los hidrocarburos sobre las estructuras celulares debido a su hidrofobicidad (concentraciones mayores, 20-50 mg C/l); y la interacción de los hidrocarburos en las mezclas binarias y ternarias.

## 6. PERSPECTIVAS

De acuerdo a los resultados presentados en este trabajo es aconsejable profundizar sobre la información obtenida, mediante más estudios de investigación básica y aplicada. Con respecto a la investigación básica, son necesarios realizar estudios a nivel membranaral para identificar y evaluar los daños, así como la resistencia desarrollada por los microorganismos nitrificantes debido a la presencia de los compuestos BTX. Una propuesta podría ser mediante estudios en cultivo en lote secuenciado (SBR, por sus siglas en inglés) en donde se evaluarían los aspectos metabólicos, de estructura celular y los mecanismos de adaptación del cultivo a los compuestos BTX. También se podrían llevar a cabo estudios con compuestos aromáticos radiactivos para tratar de entender el transporte de estos compuestos en la célula nitrificante. Asimismo, es importante también el empleo de técnicas moleculares para estudiar el posible cambio poblacional en el consorcio nitrificante debido a la presencia de BTX en el cultivo nitrificante. Esta propuesta está en relación con la interrogante que surgió durante el desarrollo de la tesis: ¿cuáles son los microorganismos que llevan a cabo la biotransformación, los nitrificantes, o la población organoheterótrofa acompañante?

En lo que respecta a la investigación aplicada, sería necesario estudiar el acoplamiento del proceso nitrificante con el desnitrificante para evaluar la eliminación completa del compuesto aromático a dióxido de carbono. Junto a estos estudios, es necesario el diseño de reactores *ad hoc*, que permitan una oxidación eficaz sin pérdida de los hidrocarburos por volatilización. Igualmente, es muy recomendable utilizar la información básica y aplicarla en el tratamiento de los efluentes industriales y los mantos de agua para consumo humano.

## 7. REFERENCIAS

1. **Abeling, U. y Seyfried, C. F.** 1992. Anaerobic-aerobic treatment of high-strength ammonium wastewater-nitrogen removal via nitrite. *Wat. Sci. Tech.* **26**:1007-1015.
2. **Aleem, M. I. H., Hoch, G. E. y Varner, J. E.** 1965. Water as the source of oxidizing and reducing power in bacterial chemosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **54**:869-873.
3. **Alvarez, P. J. J. y Vogel, T. M.** 1995. Degradation of BTEX and their aerobic metabolites by indigenous microorganisms under nitrate reducing conditions. *Wat. Sci. Technol.* **31**:15-28.
4. **Anders, H. J., Kaetzke, A., Kämpfer, P., Ludwig, W. y Fuchs, G.** 1995. Taxonomic position of aromatic-degrading denitrifying *Pseudomonad* strains K 172 and KB 740 and their description as new members of the genera *Thauerea*, as *Thauerea aromatica* sp. nov., and *Azoarcus*, as *Azoarcus evansii* sp. nov., respectively, members of the beta subclass of the *Proteobacteria*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**:327-333.
5. **Anderson, R. T.** 1998. Anaerobic benzene oxidation in the Fe (III) reduction zone of petroleum-contaminated aquifers. *Environ. Sci. Technol.* **32**:1222-1229.
6. **Anderson, R. T. y Lovley, D. R.** 2000. Anaerobic bioremediation of benzene under sulfate-reducing conditions in a petroleum-contaminated aquifer. *Environ. Sci. Technol.* **34**:2261-66
7. **Andrew, C., Han, J., de Vries, S., van de Oost, J., Averill, B., Loehr, T. y Sanders-Loehr, J.** 1994. *CuA* of cytochrome c oxidase and the A site of  $N_2O$  reductase are tetrahedrally distorted type 1 Cu cysteinates. *J. Am. Chem. Soc.* **116**:10805-10806.
8. **Anid, P. J., Alvarez, P. J. y Vogel, T. M.** 1993. Biodegradation of monoaromatic hydrocarbons in aquifer columns amended with hydrogen peroxide and nitrate. *Water Res.* **27**:685-691.
9. **Anthonisen, A. C., Loehr, R. C., Prakasam, T. B. S. y Srinath, E. G.** 1976. Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *J. Water Pollut. Control Fed.* **48**:835-852.



10. **Applegate, B. M., Kehrmeier, S. R. y Sayler, G. S.** 1998. A chromosomally based *tod-luxCDABE* whole-cell reporter for benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene (BTEX) sensing. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:2730-2735.
11. **Arciero, D., Balny, C. y Hooper, A. B.** 1991. Spectroscopic and rapid kinetic studies of reduction of cytochrome c554 by hydroxylamine oxidoreductase from *Nitrosomonas europaea*. *Biochem.* **30**:11466-11472
12. **ATSDR.** 1997. Toxicological profile for benzene. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
13. **Barnes, D. y Bliss, P. J.** 1983. *Biological Control of Nitrogen in Wastewater Treatment*. E. and F. N. Spon, New York, NY.
14. **Berry, R. S., Rice, S. A. y Ross, J.** *Physical Chemistry*; John Wiley & Sons: New York, 1980; pp 914-921.
15. **Beccari, M., Marani, D. y Ramadori, R.** 1979. A critical analysis of nitrification alternatives. *Water Res.* **13**:185-192.
16. **Beccari, M., Passino, R., Ramadori, R., Tandoi, V.** 1983. Kinetics of dissimilatory nitrate and nitrite reduction in suspended growth culture. *J. WPCF.* **55**:58-64.
17. **Bédard, C. y Knowles, R.** 1989. *Microbiol. Rev.* **53**:68-83
18. **Bergmann, D. J. y Hooper, A. B.** 1994. Sequence of the gene, *amoB*, for the 43-kDa polypeptide of ammonia monooxygenase of *Nitrosomonas europaea*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **204**:759-762
19. **Bielefeldt, A. R. y Stensel, H. D.** 1999. Treating VOC-contaminated gases in activated sludge: mechanistic model to evaluate design and performance. *Environ. Sci. Technol.* **33**:3234-3240.
20. **Bock, E.** 1976. Growth of *Nitrobacter* in the presence of organic matter. II. Chemoorganic growth of *Nitrobacter agilis*. *Arch. Microbiol.* **108**:299-304.
21. **Bock, E., Schmidt, I., Stüven, R. y Zart, D.** 1995. Nitrogen loss caused by denitrifying *Nitrosomonas* cells using ammonium or hydrogen as electron donors and nitrite as electron acceptor. *Arch. Microbiol.* **163**:16-20.
22. **Bock, E., Koops, H.-P., Harms, H. y Ahlers, B.** 1991. The biochemistry of nitrifying organisms. In *Variations in Autotrophic Life*; ed. Academic Press London. **15**: 171-200.

23. **Bjarnason, J.B. and Tu, A.T.** 1978. Hemorrhagic toxins from western diamond back rattlesnake (*crotalus atrox*) venom: Isolation and characterization of five toxins and the role of zinc in hemorrhagic toxine. *Biochemistry*. **17**: 3396-3404.
24. **Brand, K. K., Hesselsoe, M., Rosley, P., Henriksen, K. y Sorensen, J.** 2001. Toxic effects of linear alkylbenzene sulfonate on metabolic activity growth rate and microcolony formation of *Nitrosomonas* and *Nitrospira* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:2484-2498.
25. **Bremmer, J. M. y Bundy, L. G.** 1974. Inhibition of nitrification in soils by volatile sulphur compounds. *Soil Biol. Biochem.* **6**:161-165.
26. **Bühler, B., Schmid, A., Hauer, B. y Witholt, B.** 2000. Xylene monooxygenase catalyzes the multistep oxygenation of toluene and Pseudocumene to corresponding alcohols, aldehyde, and acids in *Escherichia coli* JM101. *J. Biol. Chem.* **275**:10085-10092.
27. **Burland, S. M. y Edwards, E. A.** 1999. Anaerobic benzene biodegradation linked to nitrate reduction. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:529-533.
28. **Caldwell, M. E. y Suflita, J. M.** 2000. Detection of phenol and benzoate as intermediates of anaerobic benzene biodegradation under different terminal electron-accepting conditions. *Environ. Sci. Technol.* **34**:1216-1220.
29. **Cervantes, F. J., Dijksma, W., Duong-Dac, T., Ivanova, A., Lettinga, G. Field, J. A.** 2001. Anaerobic mineralization of toluene by enriched sediments with quinones and humus as terminal electron acceptors. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:4471-4478.
30. **Chain, P., Lamerdin, J., Larimer, F., Regala, W., Lao, V., Land, M., Hauser, L., Hooper, A., Klotz, M., Norton, J., Sayavedra-Soto, L., Arciero, D., Hommes, H., Whittaker, M. y Arp, D.** 2003. Complete genome sequence of the ammonia-oxidizing bacterium and obligate chemolithoautotroph *Nitrosomonas europaea*. *J. Bacteriol.* **185**:2759-2773.
31. **Chakraborty, R. y Coates, J. D.** 2004. Anaerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**:437-446.
32. **Chang, S. W., Hyman, M. R. y Williamson.** 2002. Cooxidation of naphthalene and other polycyclic aromatic hydrocarbons by nitrifying bacterium, *Nitrosomonas europaea*. *Biodegradation.* **13**:373-381.

33. **Chen, C. I. y Taylor, R. T.** 1997. Batch and feed-batch bioreactor cultivations of a *Thermus* species with thermophilic BTEX-degrading activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**:726-733.
34. **Choi, Y. B., Lee, J. Y. y Kim, H. S.** 1992. A novel bioreactor for the biodegradation of inhibitory aromatic solvents: experimental results and mathematical analysis. *Biotechnol. Bioeng.* **40**:1403-1411.
35. **Christtensen, J. S. y Elton, J.** 19996. Soil and groundwater pollution from BTEX. <http://ewr.cee.vt.edu/environmental/teach/gwprimer/btex/btex.html>.
36. **Christtensen, M . H. y Harremoes, P.** 1997. Biological denitrification of sewage: a literature review. *Prog. Water Technol.* **8**:509-555.
37. **Churchwell, R. L., Kachtick, J. W., y Ford, D. L.** 1980. "Comprehensive Analysis of Nitrification of Chemical Processing Wastewaters" *J. WPCF.* **52**:2726-2746.
38. **Clescri, L. S., Greenberg, A. E. y Eaton, A. D.** Standard methods for examination of water and wastewater. 20<sup>th</sup> ed. American public health associaton. Washington, D. C. 1998.
39. **Coates, J. D., Chakraborty, R., Lack, J. G., O'Connor, S. M. y Cole, K. A.** 2001. Anaerobic benzene oxidation coupled to nitrate reduction in pure culture by two strains of *Dechloromonas*. *Nature.* **411**:1039-43
40. **Collins, L. D., Daugulis, A. J.** 1999. Simultaneous biodegradation of benzene, toluene, and *p*-xylene in a two-phase partitioning bioreactor: concept demonstration and practical application. *Biotechnol. Prog.* **15**: 74-80.
41. **Corseuil, H. X. Y Weber, W. J.** 1994. Potential biomass limitations on rates of degradation of monoaromatic hydrocarbons by indigenous microbes in subsurface soils. *Water Res.* **28**:1415-1423.
42. **Costura, R. K. y Alvarez, P. J. J.** 2000. Expression and longevity of toluene dioxygenase in *Pseudomonas putida* F1 induced at different dissolved oxygen concentrations. **34**:3014-3018. *Water Res.*
43. **Coyle, C. L., Zumft, W. G., Kroneck, P. M. H., Körner, H. y Jakob, W.** 1985. Nitrous oxide reductase from denitrifying *Pseudomonas perfectomarina* – Purification and properties of a novel multicopper enzyme. *Eur. J. Biochem.* **153**:459- 467.
44. **Dalvi, R. R., Hunter, A. L. y Neal, R. A.** 1974. Studies of the metabolism of carbon disulfide by rat liver microsomaes. *Life Sci.* **14**:1785-1796.

45. **Deeb, R. A. y Cohen, L. A.** 1999. Temperature effects and substrate interactions during the aerobic biotransformation of BTEX mixtures by toluene-enriched consortia and *Rhodococcus rhodochrous*. *Biotechnol. Bioeng.* **62**:526-536.
46. **Deeb, R. A. y Cohen, L. A.** 2000. Aerobic biotransformation of gasoline aromatics in multicomponent mixtures. *Bioremediation J.* **4**:1-9
47. **Deeb, R. A., Hu, H. Y., Hanson, J. R., Scow, K. M. y Cohen, L. A.** 2001. Substrate interactions in BTEX and MTBE mixtures by an MTBE-degrading isolate. *Environ. Sci. Technol.* **35**:312-317.
48. **Delwiche, C. C. y Bryan, B. A.** 1976. Denitrification. *Ann. Rev. Microbiol.* **30**:241-262.
49. **Denich, T. J., Beaudette, L. A., Lee, H., and Trevors, J. T.** 2003. Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes. *J. Microbial. Methods.* **52**:149-182.
50. **Dyreborg, S., y Arvin, E.** 1995. Inhibition of nitrification by creosote-contaminated water. *Water Res.* **29**:1603-1606.
51. **Edwards, E. A., Wills, L. E., Reinhard, M. y Grbic-Galic, D.** 1992. Anaerobic degradation of toluene and xylene by aquifer microorganisms under sulfate-reducing conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:794-800.
52. **Elmen, J., Pan, W., Leung, S. Y., Magyarosy, A. Keasling, J. D.** 1997. Kinetics of toluene degradation by a nitrate-reducing bacterium isolated from a groundwater aquifer. *Biotechnol. Bioeng.* **55**:82-90.
53. **Evans, P. J., Mang, D. T., Kim, K. S. y Young, L. Y.** 1991. Anaerobic degradation of toluene by a denitrifying bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:1139-1145.
54. **Ferguson, S.** 1994. Denitrification and its control. *Antonie van Leeuwenhoek* **66**:89-110.
55. **Garnaey, K., Verschuere, L., Luyten, L. y Verstraete, W.** 1997. Fast and sensitive acute toxicity detection with an enrichment nitrifying culture. *Wat. Environ. Res.* **69**:1163-1169.
56. **Gauntlet, R. B.** Removal ammonia and nitrate in the treatment of potable water. In: *Biological fluidized potable water and wastewater*, Cooper, T. y Atkinson, H. ed. Ellis Horwood Ltd. London, 1981. 49-60.

57. **Gersberg, R., Dawsey, W. J. y Ritgeway, H. F.** 1989. Biodegradation of dissolved aromatic hydrocarbons in gasoline contaminated groundwater using denitrification. In: Petroleum contaminated soils. Vol. 2 Lewis Publishers. Chelsea Michigan. pp 211-217.
58. **Gibson, T., Cardini, E., Maseles, F. C. y Kallio, R. E.** 1970. Incorporation of oxygen-18 into benzene by *Pseudomonas putida*. Biochem. **9**:1631-1635.
59. **Ginestet, P., Audic, J. M., Urbain, V. y Block, J. C.** 1998. Estimation of nitrifying bacterial activities by measuring oxygen uptake in the presence of the metabolic inhibitors allylthiourea and azide. Appl. Environ. Microbiol. **64**:2266-2268.
60. **Gómez, H. J., Lema, R. J. M. y Méndez, P. J. R.** 1995. La nitrificación biológica con cultivos axénicos o lodos activados. Ciencia. **46**:507-523.
61. **Goretski, J. y Hollocher, T. C.** 1990. The kinetic isotopic competence of nitric oxide as an intermediate in denitrification. J. Biol. Chem. **265**:889-895.
62. **Goreau, T. J., Kaplan, W. A., Wofsy, S. C., McElroy, M. B. Valois, F. W. y Watson, S. W.** 1980. Production of NO<sub>2</sub><sup>-</sup> y N<sub>2</sub>O by nitrifying bacteria at reduced concentration of oxygen. Appl. Environ. Microbiol. **40**:526-532.
63. **Grbić-Galić, D. y Vogel, T.** 1987. Transformation of toluene and benzene by mixed methanogenic cultures. Appl Environ. Microbiol. **53**:254-260
64. **Halling-Sørensen, B. and S. Jørgensen** (eds.). 1993. The removal of nitrogen compounds from wastewater, p. 3. Elsevier, Netherlands.
65. **Han, D. W., Yun, H. J. y Kim, D. J.** 2001. Autotrophic nitrification and denitrification characteristics of an upflow biological aerated filter. J. Chem. Technol. Biotechnol. **76**:1112-1116.
66. **Hanaki, K., Wantawin, C. y Ohgaki, S.** 1990. Effects of the activity of heterotrophs on nitrification in a suspended-growth reactor. Wat. Res. **24**:289-296.
67. **Häner, A., Höhener, P. y Zeyer, J.** 1995. Degradation of *p*-xylene by a denitrifying enrichment culture. Appl. Environ. Microbiol. **61**:3185-3188.
68. **Harayama, S., Kok, M. y Neidle, E. L.** 1992. Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. Annu. Rev. Microbiol. **46**:565-601.
69. **Harayama, S., Timmis, K. N.** 1989. Catabolism of aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas*. In: Genetics of Bacterial Diversity, ed. D. A. Hopwood, K. Charter, pp. 151-74. New York: Academic

70. **Harms, G., Zengler, K., Rabus, R., Aeckersberg, F., Minz, D., Mora, R. R. y Widdel, F.** 1999. Anaerobic oxidation of *o*-xylene, *m*-xylene, and homologous alkylbenzenes by new types of sulfate-reducing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:999-1004.
71. **Hao, X., Heijnen, J. J. y van Loosdrecht, M. C. M.** 2002. Sensitivity analysis of a biofilm model describing a one-stage completely autotrophic nitrogen removal (CANON) process. *Biotechnol. Bioeng.* **77**:267-277.
72. **Hauck, R. D.** 1980. Mode of action of nitrification inhibitors. In: Meisinger J. J. (ed) *Nitrification inhibitors-potential and limitations.* American Society of Agronomy. Madison, Wis., pp 19-32.
73. **Heider, J., Spormann, A. M., Beller, H. R. y Widdel, F.** 1999. Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. *FEMS Microbiol. Rev.* **22**:459-473.
74. **Helder, W. y De Vries, R. T. P.** 1983. Estuarine nitrite maxima and nitrifying bacteria (ems-Dollard Estuary).” *Neth. J. Sea Res.* **17**:1-18.
75. **Hollocher, T. C., Tate, M. E. y Nicholas, D. J. D.** 1981. Oxidation of ammonia by *Nitrosomonas europaea*: definitive <sup>18</sup>O-tracer evidence that hydroxylamine formation involves a monooxygenase. *J. Biol. Chem.* **256**:10834-10836.
76. **Hooper, A. B. y Terry, K. R.** 1973. Specific inhibitors of ammonia oxidation in *Nitrosomonas*. *J. Bacteriol.* **115**:480-485.
77. **Hooper, A. B. y Terry, K. R.** 1974. Photoinactivation of ammonia oxidation in *Nitrosomonas*. *J. Bacteriol.* **119**:899-906.
78. **Hooper, A. B. y Terry, K. R.** 1979. Hydroxylamine oxidoreductase of *Nitrosomonas*: production of nitric oxide from hydroxylamine. *Biochim. Biophys. Acta.* **571**:12-20
79. **Hooper, A. B., Vannelli, T., Bergmann, D. J. y Arciero, D. M.** 1997. Enzymology of the oxidation of ammonia to nitrite by bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek.* **71**:59-67.
80. **Hunik, J. H., Meijer, J. G. y Tramper, M. J.** 1993. Kinetics of *Nitrobacter agilis* at extreme substrate, product and salt concentrations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**:442-448.
81. **Hutchins, S. R.** 1991. Biodegradation of monoaromatic hydrocarbons by aquifer microorganisms using oxygen, nitrate, or nitrous oxide as the terminal electron acceptor. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:2403-2407.

82. **Hutchins, S. R., Miller, D. E. y Thomas, A.** 1998. Combined laboratory/field study on the use of nitrate for in situ bioremediation of a fuel-contaminated aquifer. *Environ. Sci. Technol.* **32**:1832-1840.
83. **Hyman, M. R., Arp, D. J.** 1992.  $^{14}\text{C}_2\text{H}_2$  - and  $^{14}\text{CO}_2$  - labeling studies of the de novo synthesis of polypeptides by *Nitrosomonas europaea* during recovery from acetylene and light inactivation of ammonia monooxygenase. *J. Biol. Chemistry.* **267**:1534-1545.
84. **Hyman, M. R., Kim, C. Y. y Arp, D. J.** 1990. Inhibition of ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea* by carbon disulfide. *J. Bacteriol.* **172**:4775-4782.
85. **Hyman, M. R., Murton, I. B., y Arp, D. J.** 1988. Interaction of ammonia monooxygenase from *Nitrosomonas europaea* with alkanes, alkenes, and alkynes. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:3187-3190.
86. **Hyman, M. R., Page, C. L. y Arp, D. J.** 1994. Oxidation of methyl fluoride and dimethyl ether by ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:3033-3035.
87. **Hyman, M. R., Sansome-Smith A. W., Shears, J. H. y Wood, P. M.** 1985. A kinetic study of benzene oxidation to phenol by whole cells of *Nitrosomonas europaea* and evidence for the further oxidation of phenol to hydroquinone. *Arch. Microbiol.* **143**:302-306
88. **Hyman, M. R. y Wood, P. M.** 1983. Methane oxidation by *Nitrosomonas europaea*. *Biochem. J.* **212**:31-37.
89. **Hyman, M. R. y Wood, P. M.** 1984. Ethylene oxidation by *Nitrosomonas europaea*. *Arch. Microbiol.* **137**:155-158.
90. **Hyman, M. R. y Wood, P. M.** 1985. Suicidal inactivation and labelling of ammonia mono-oxygenase by acetylene. *Biochem. J.* **227**:719-725.
91. **Hynes, R. K. y Knowles, R.** 1982. Effect of acetylene on autotrophic and heterotrophic nitrification. *Can J. Microbiol.* **28**:334-340.
92. **IARC** monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. An updating of IARC monographs. 1987. vol. 1±42, Suppl 7, Lyon, France.
93. **Igarashi, N., Moriyama, N., Fujiwara, T., Fukumori, Y. Tanaka, N.** 1997. The 2.8<sup>Å</sup> structure of hydroxylamine oxidoreductase from a nitrifying chemoautotrophic bacteria *Nitrosomonas europaea*. *Nat. Struct. Biol.* **4**:276-284.

94. **Iizumi, T., Mixumoto, M. y Nakamura, K.** 1998. A bioluminescence assay using *Nitrosomonas europaea* for rapid and sensitive detection of nitrification inhibitors. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:3656-3662.
95. **Jetten, M. S. M., Logemann, S., Muyzer, G., Robertson, L., de Vries, S., van Loosdrecht, M. y Kuenen, J.** 1997. Novel principles in the microbial conversion of nitrogen compounds. *Antonie van Leeuwenhoek.* **71**:75-93.
96. **Jetten, M. S. M., Strous, M., van de Pas-Schoonen, K. T., Schalk, J., van Dongen, U. G. J. M., van de Graaf, A. A., Logemann, S., Muyzer, G., van Loosdrecht, M. C. M. y Kuenen, J. G.** 1999. The anaerobic oxidation of ammonium. *FEMS Microbiol. Rev.* **22**:421-437.
97. **Johnson, G. R. y Olsen, R. H.** 1995. Nucleotide sequence analysis of genes encoding a toluene/benzene-2-monooxygenase from *Pseudomonas* sp. strain JS150. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:3336-3346.
98. **Juliette, L. Y., Hyman, M. R. y Arp, D. J.** 1993. Inhibition of ammonia oxidation in *Nitrosomonas europaea* by sulfur compounds: thioethers are oxidized to sulfoxides by ammonia monooxygenase. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:3718-3727.
99. **Keener, W. K. y Arp, D. J.** 1993. Kinetic studies of ammonia monooxygenase inhibition in *Nitrosomonas europaea* by hydrocarbons and halogenated hydrocarbons in an optimized whole-cell assay. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:2501-2510.
100. **Keener, W. K. y Arp, D. J.** 1994. Transformations of aromatic compounds by *Nitrosomonas europaea*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:1914-1920.
101. **Keener, W. K., Rusell, S. A. y Arp, D. J.** 1998. Kinetic characterization of the inactivation of ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea* by alkyne, aniline and cyclopropane derivatives. *Biochem. Biophys. Acta.* **1388**:373-385.
102. **Kelly, D. P.** 1971. Autotrophy: Concepts of lithotrophic bacteria and their organic metabolism. *Ann. Rev. Microbiol.* **25**:177-210.
103. **Krieger, C. J., Beller, H. R., Reinhard, M. y Spormann, A. M.** 1999. Initial reactions in anaerobic oxidation of *m*-xylene by the denitrifying bacterium *Azoarcus* sp. Strain T. *J. Bacteriol.* **181**:6403-6410
104. **Kroneck, P. M., Beuerle, M. J. y Schumacher, R. W.** 1992. Metal-dependent conversion of inorganic nitrogen and sulfur compounds, p. 455-505. In: H. Siegel and A. Siegel (ed.). *Metal ions in biological systems*, v. 28. Marcel Dekker, U.S.A.



105. **Kuai, L., y Verstraete, W.** 1998. Ammonium removal by the oxygen-limited autotrophic nitrification-denitrification system. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:4500-4506.
106. **Langenhoff, A. A. M., Brouwers-Ceiler, D. L., Engelberting, J. H. L., Quist, J. J., Wolkenfelt, J. G. P. N., Zehnder, A. J. B. y Schraa, G.** 1997. Microbial reduction of manganese coupled to toluene oxidation. *FEMS Microbiol. Ecol.* **22**:119-127.
107. **Lee, J. Y., Jung, K. H., Choi, S. H. y Kim, H. S.** 1995. Combination of the *tod* and the *tol* pathways in redesigning a metabolic route of *Pseudomonas putida* for the mineralization of a benzene, toluene, and *p*-xylene. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:2211-2217.
108. **Lees, H.** 1952. The biochemistry of the nitrifying organisms. 1. The ammonia-oxidizing systems of *Nitrosomonas*. *Nombre de la revista.* **52**:134-139.
109. **Lees, H.** 1946. Effect of copper-enzyme poisons on soil nitrification. *Nature.* **185**:512-514.
110. **Leuthner, B. y Heider, J.** 2000. Anaerobic toluene catabolism of *Thauera aromatica*: the *bbs* operon codes for enzymes of beta oxidation of the intermediate benzylsuccinate. *J. Bacteriol.* **182**:272-277
111. **Liley, P. E., Thomson, G. H., Friend, D. G., Daubert, T. E. y Buck, E.** Physical and chemical data. In *Perry's Chemical Engineers' Handbook*, 7th ed.; Perry, R. H., Green, D. W., Eds.; McGraw-Hill Companies, Inc.: New York, 1997; Section pp 1-204.
112. **Lovley, D. R.** 2000. Anaerobic benzene degradation. *Biodegradation.* **11**:107-116
113. **Lovley, D. R.** 1997. Microbial Fe (III) reduction in subsurface environments. *FEMS Microbiol. Rev.* **20**:305-313.
114. **Lovley, D. R., Coates, J. D., Woodward, J. C. y Phillips, E. J. P.** 1995. Benzene oxidation coupled to sulfate reduction. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:953-958.
115. **Lovley, D. R., Woodward, J. C. y Chapelle, F. H.** 1996. Rapid anaerobic benzene oxidation with a variety of chelated Fe (III) forms. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:288-291.
116. **Lowry, O. H., Rosen Brough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J.** 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**:265-275.

117. **Ma, G. y Love, N. G.** 2001. BTX biodegradation in activated sludge under multiple redox conditions. *J. Environ. Engneen.* 509-515.
118. **Martiny, H. y Koops, H.-P.** 1982. Incorporation of organic compounds into cell protein by lithotrophic, ammonia-oxidizing bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek.* **48**: 327-336.
119. **McCarty, G. W.** 1999. Review article: Modes of action of nitrification inhibitors. *Biology and Fertility of Soils.* **29**:1-9.
120. **McTavish, H., Fuchs, J. A. y Hooper, A. B.** 1993a. Sequence of the gene coding for ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea*. *J. Bacteriol.* **175**:2436-2444
121. **McTavish, H., LaQuier, F., Arciero, D., Logan, M., Mundfrom, G., Fuchs, J. A. y Hooper, A. B.** 1993b. Multiple copies of genes coding for electron transport proteins in the bacterium *Nitrosomonas europaea*. *J. Bacteriol.* **175**:2445-2447.
122. **Metcalf y Eddy, Inc.** 1991a. "Chapter 8: Biological Unit Processes" in: *Wastewater Engineering: Treatment, Disposal, and Reuse, Third Ed.* McGraw-Hill, Inc., New York, NY.
123. **Metcalf y Eddy, Inc.** 1991b. "Chapter 11: Biological Unit Processes" in: *Wastewater Engineering: Treatment, Disposal, and Reuse, Third Ed.* McGraw-Hill, Inc., New York, NY.
124. **Miller, E. S. y Peretti, S. W.** 2002. Toluene bioconversion to *p*-hydroxybenzoate by fed-bacth cultures of recombinant *Pseudomonas putida*. *Biotechnol. Bioeng.* **77**:340-351.
125. **Mirpuri, R., Jones, W. y Bryers, J. D.** 1997. Toluene degradation kinetics for planktonic and biofil-grown cells of *Pseudomonas putida* 54G. *Biotechnol. Bioeng.* **53**:535-546.
126. **Mitchell, K. H., Rogge, C. E., Gierahn, T. y Fox, B. G.** 2003. Insight into the mechanism of aromatic hydroxylation by toluene 4-monooxygenase by use of specifically deuterated toluene and *p*-xylene. *Biochem.* **100**:3784-3789.
127. **Moat, G. A. y Foster, J. W.** *Microbial physiology.* 1988. John Wiley and Sons. Singapore.

128. **Monero, A., Lanza, L., Zilli, M., Sene, L. y Converti, A.** 2003. Batch kinetics of *Pseudomonas* sp. growth on benzene. Modelling of product and substrate inhibitions. *Biotechnol. Prog.* **19**:676-679.
129. **Monod, J.** 1949. The growth of bacterial cultures. *Ann. Rev. Microbiol.* **3**:371.
130. **Monroy, O., Fama, G., Meraz, M., Montoya, L. y Macarie H.** 2000. Anaerobic digestion for wastewater treatment in Mexico: State of the technology. *Water Res.* **36**:1803-1816.
131. **Mulder, J. W., Van Loosdrecht, M. C. M., Hellinga, C. y Van Kempen, R.** 2001. Full-scale application of the SHARON process for treatment of rejection water of digested sludge dewatering. *Water Sci. Technol.* **43**: 127-134.
132. **Muller, E. B., Stouthamer, A. H. y Verseveld, H. W.** 1995. Simultaneous NH<sub>3</sub> oxidation and N<sub>2</sub> production at reduced O<sub>2</sub> concentrations by sewage sludge subcultured with chemolithotrophic medium. *Biodegradation.* **6**:339-349.
133. **Muller, E. B., Stouthamer, A. H. y Verseveld, H. W.** 1995b. A novel method to determine maximal nitrification rates by sewage sludge at a non-inhibitory nitrite concentration applied to determine maximal rates as a function of the nitrogen load. *Water Res.* **29**:1191-1197.
134. **Murray, I., Parsons, J. W., Robinson, K.** 1975. Inter-relationships between nitrogen balance, pH and dissolved oxygen in an oxidation ditch treating farm animal waste. *Water Res.* **9**:25-30.
135. **Neal, R. A. y Halpert, J.** 1982. Toxicology of thiono-sulfur compounds. *Annu. Rev. Pharmacol.* **22**:321-339.
136. **Oh, S. Y., Shareefdee, Z., Baltzis, B. C. y Bartha, R.** 1994. Interactions between benzene, toluene, and *p*-xylene (BTX) during their biodegradation. *Biotechnol. Bioeng.* **44**:533-538.
137. **Painter, H. A.** 1986. Nitrification in the treatment of sewage and waste waters, p. 185-211. *In* J. I. Prosser (ed.), *Nitrification*. Society for general microbiology, Oxford IRL Press, Washington, D. C.
138. **Pantea-Kiser, L.; Wukasz, R. F.; Alleman, J. E.** Effect of inhibitory compounds on biological nitrification. Proceedings of the 44<sup>th</sup> Purdue Industrial Waste Conference, May 9-11 1989, Purdue University, West Lafayette, Indiana, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1990; pp 465-474.

139. **Parales, R. E., Ditty, J. L. y Harwood, C. S.** 2000. Toluene-degrading bacteria are chemotactic towards the environmental pollutants benzene, toluene, and trichloroethylene. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:4098-4104.
140. **Páres, R. F. y Juárez, A. G.** *Bioquímica de los microorganismos.* Reverté. Barcelona. 1997. pp. 223-234.
141. **Pedersen, A. R., Moller, S., Molin, S. y Arvin, E.** 1997. Activity of toluene-degrading *Pseudomonas putida* in the early growth phase of a biofilm for waste gas treatment. *Biotechnol. Bioengn.* **54**:131-141.
142. **Perez, T. J.** 1998. Estudio y evaluación del efecto del pH y la fuente de electrones en la desnitrificación en estado estacionario. Tesis. Maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. Iztapalapa. México.
143. **Philips, S., Wyffels, S., Sprengers, R. y Verstraete, W.** 2002. Oxygen-limited autotrophic nitrification/denitrification by ammonia oxidisers enables upward motion towards more favourable conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**:557-566.
144. **Pollice, A., Tandoi, V. y Lestingi, C.** 2002. Influence of aeration and sludge retention time ammonium oxidation to nitrite and nitrate. *Water Res.* **36**:2541-2546.
145. **Poth, M. y Focht, D. D.** 1985. <sup>15</sup>N Kinetic analysis of N<sub>2</sub>O production by *Nitrosomonas europaea*: an examination of nitrifier denitrification. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**:1134-1141.
146. **Poughon, L., Dussap, C. G. y Gros, J. B.** 2001. Energy model and metabolic flux analysis for autotrophic nitrifiers. *Biotech. Bioeng.* **72**:416-433.
147. **Princic, A., Mahne, I., Megusar, F. Paul, E. A. y Tiedje, J.** 1998. Effects of pH oxygen and ammonium concentrations on the community structure of nitrifying bacteria from wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:3584-3590.
148. **Prosser, J. I.** 1989. Autotrophic nitrification in bacteria. *Adv. Microbiol. Physiol.* **30**:125-181.
149. **Rabus, R., Nordhaus, R., Ludwig, W. y Widdel, F.** 1993. Complete oxidation of toluene under strictly anoxic conditions by a new sulfate-reducing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:1444-1451.
150. **Rasche, M. E., Hicks, R. E., Hyman, M. R. y Arp, D. J.** 1990a. Oxidation of monohalogenated ethanes and n-chlorinated alkanes by whole cells of *Nitrosomoas europaea*. *J. Bacteriol.* **172**:5368-5373.

151. **Rasche, M. E., Hyman, M. R. y Arp, D. J.** 1990b. Biodegradation of halogenated hydrocarbon fumigants by nitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:2568-2571.
152. **Reardon, K. F., Mosteller, D. C., Rogers, J. D., Dyteau, N. M. y Kim, K. H.** 2002. Biodegradation kinetics of aromatic hydrocarbon mixtures by and mixed bacterial cultures. *Environ. Health Perspect.* **6**:1005-1011.
153. **Reardon, K. F., Mosteller, D. C. y Rogers, J. D. B.** 2000. Biodegradation kinetics of benzene, toluene, and phenol as single and mixed substrates for *Pseudomonas putida* F1. *Biotechnol. Bioeng.* **69**:385-400.
154. **Reinhard, M., Shang, S., Kitanidis, P. K., Orwing, E., Hopkins, G. D. y Lebron, C. A.** 1997. In situ BTEX biotransformation under enhanced nitrate-and sulfate-reducing conditions. *Environ. Sci. Technol.* **31**:28-36.
155. **Reusser, D. E., Istok, J. D., Beller, H. R. y Field, J. A.** 2002. In situ transformation of deuterated toluene and xylene to benzylsuccinic acid analogues in BTEX-contaminated aquifers. *Environ. Sci. Technol.* **36**:4127-4134.
156. **Richardson, D. J. y Watmough, N. J.** 1999. Inorganic nitrogen metabolism in bacteria. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**:207-219.
157. **Sayavedra-Soto, L. A., Hommes, N. G., Alzerreca, J. J., Arp, D. J., Norton, J. M. y Klotz, M. G.** 1998. Transcription of the amoC, amoA, and amoB genes in *Nitrosomonas europaea* and *Nitrosospira* sp. NpAV. *FEMS Microbiol. Lett.* **167**:81-88.
158. **Schmidt, I., Sliemers, O., Schmid, M., Bock, E., Fuerst, J., Kuenen, J. G. Jetten, M. S. M. y Strous, M.** 2003. New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**:481-492.
159. **Shears, J. H. and Wood, P. M.** 1985. Spectroscopic evidence for a photosensitive oxygenated state of ammonia monooxygenase. *Biochem. J.* **226**:499-507.
160. **Shiemke, A., Arp, D. J. y Sayavedra-Soto, L. A.** 2004. Inhibition of membrane-bound methane monooxygenase and ammonia monooxygenase by diphenyliodonium: implications for electron transfer. *J. Bacteriol.* **186**:928-937.
161. **Shinoda, Y., Sakai, Y., Uenishi, H., Uchihashi, Y., Hiraishi, A., Yukawa, H., Yurimoto, H. y Kato, N.** 2004. Aerobic and anaerobic toluene degradation by a newly isolated denitrifying bacterium, *Thauera* sp. strain DNT-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:1385-1392.

162. **Shoun, H. y Tanimoto, T.** 1991. Denitrification by the fungus *Fusarium oxysporum* and involvement of cytochrome P-450 in the respiratory nitrite reduction. *J. Biol. Chem.* **25**:1527-1536.
163. **Sikkema, J., de Bont, J. A. M., and Poolman, B.** 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews.* **59**:201-222.
164. **Sliekers, A. O., Derwort, N., Gomez, J. L. C., Strous, M., Kuenen, J. G. Jetten, M. S. M.** 2002. Completely autotrophic nitrogen removal over nitrite in one single reactor. *Water Res.* **36**:2475-2482.
165. **Smallwood, I. M.** 1996. Handbook of organic solvent properties. Edit. Arnold. Great Britain. London.pag.35-47.
166. **Smith, A. J., London, J. R. y Stainer, R.** 1967. Biochemical basis of obligate autotrophy in blue-green algae and thiobacilli. *J. Bacteriol.* **94**:972-983.
167. **Smith, A. J., Hoare, D. S.** 1968. Acetate assimilation by *Nitrobacter agilis* Nitrobacter agilis in relation to its "obligate autotrophy". *J. Bacteriol.* **95**:844-855.
168. **Spieck, E., Ehrich, S., Aamand, J. y Bock, E.** 1998. Isolation and immunocytochemical location of the nitrite-oxidizing system in *Nitrospira moscoviensis*. *Arch. Microbiol.* **169**:225-230.
169. **Stein, L. Y., Arp, D. J. y Hyman, M. R.** 1997. Regulation of the synthesis and activity of ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea* by altering pH. *Appl. Environ. Microbio.* **63**:4588-4592
170. **Stafford, D. A.** 1974. The effect of phenols and heterocyclic bases on nitrification in activated sludges. *J. Appl. Bact.* **37**:75-82.
171. **Stouthamer, A.** 1976. Biochemistry and genetics of nitrate reductase in bacteria. *Adv. Microbiol. Physiol.* **14**:315-375.
172. **Strous, M., Heijnen, J. J., Kuenen, J. G. y Jetten, M. S. M.** 1998. The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**:589-596.
173. **Strous, M., Van Gerven, E., Ping, Z. Kuenen, J. G. y Jetten, M. S. M.** 1997a. Ammonium removal from concentrated waste streams with the anaerobic ammonium oxidation (Anammox) process in different reactor configurations. *Water Res.* **31**:1955-1962.

174. **Strous, M., Van Gerven, E., Kuenen, J. G. y Jetten, M.** 1997b. Effects of aerobic and microaerobic conditions on anaerobic ammonium-oxidizing (Anammox) sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:2446-2448.
175. **Sundermeyer-Klinger, H., Meyer, W., Warninghoff, B. y Bock, E.** 1984. Membrane-bound nitrite oxidoreductase of *Nitrobacter*: evidence for a nitrite reductase system. *Arch. Microbiol.* **140**:153-158.
176. **Surmacz-Górska, J., Cichon, A. y Miksch, K.** 1997. Nitrogen removal from wastewater with high ammonia nitrogen concentration via shorter nitrification and denitrification. *Wat. Sci. Tech.* **36**:73-78.
177. **Suzuki, I., Dular, V. and Kwok, S. C.** 1974. Ammonia or ammonium ion as substrate for oxidation by *Nitrosomonas europaea* cells and extracts. *J. Bacteriol.* **120**:556-558.
178. **Takahashi, I., Ohki, S., Murakami, M., Takagi, S., Stato, Y., Vonk, J. W. y Wakabayashi, K.** 1997. Mode of action and QSAR studies of nitrification inhibitors: effect of trichloromethyl-1,3,5-triazines on ammonia-oxidizing bacteria. *J. Pest. Sci.* **22**:27-32.
179. **Texier, A. -C. y Gomez, J.** 2002. Tolerance of nitrifying sludge to *p*-cresol. *Biotechnol. Lett.* **24**:321-324.
180. **Tiehm, A. y Schulze, S.** 2003. Intrinsic aromatic hydrocarbon biodegradation from groundwater remediation. *Oil and Gas Science and Technology.* **58**:449-462.
181. **Tijhuis, L., Huisman, H. D., van Loosdrecht, M. y Heijnen, J.** 1995. Formation of nitrifying biofilms on small suspended particles in airlift reactors. *Biotechnol. Bioeng.* **47**:585-595.
182. **Tomlinson, T. G., Boon, A. G. y Trotman, C. N. A.** 1966. Inhibition of nitrification in the activated sludge process of sewage disposal. *J. Appl. Bact.* **29**:266-291.
183. **Tsang, D. C. Y. y Suzuki, I.** 1982. Cytochrome c554 as a possible electron donor in the hydroxylation of ammonia and carbon monooxide in *Nitrosomonas europaea*. *Can J. Biochem.* **60**:1018-1024.
184. **Tsao, C. -W., Song, H.-G. y Bartha, R.** 1998. Metabolism of benzene, toluene, and xylene hydrocarbons in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:4924-4929.

185. **Tsien, H. C., Lambert, R., and Loudelout, H.** 1968. Fine structure and the localization of the nitrite oxidizing system in *Nitrobacter winogradskyi*. J. Anton. Leeuwenhoek. **34**:483-494.
186. **Turk, O., Mavinic, D. S.** 1987. Benefits of using selective inhibition to remove nitrogen from highly nitrogenous wastes. Environ. Technol. Lett. **8**:419-426
187. **U.S. Environmental Protection Agency (U.S. EPA).** 2001. National primary drinking water regulations. Federal register, 19(141).
188. **U.S. Environmental Protection Agency (U.S. EPA).** 1998a. "Carcinogenic effects of benzene: An update." *Rep. No. EPA/600/P-97/001F*, Washington, D.C.
189. **U.S. Environmental Protection Agency (U.S. EPA).** 1998b. "Monitoring and assessment of in-situ biocontainment of petroleum-contaminated ground-water plumes." *Rep. No. EPA/600/R-98/020*, Washington, D.C.
190. **U. S. Environmental Protection Agency.** 1986. Underground motor fuel storage tanks: a national survey, NTIS PB 86-216512. U. S. Environmental Protection Agency, Washington, D. C.
191. **U.S. Environmental Protection Agency (U.S. EPA).** 1980. "Treatability manual. Vol.1. Treatability data." *Rep. No. EPA/600/8-80/042a*, Washington, D.C.
192. **Van Cleemput, O., y Baert L.** 1984. Nitrite: a key compound in N loss processes under acid conditions. Plant Soil **76**:233–241.
193. **Van de Graaf, A. A., de Bruijin, P., Robertson, L. A., Jetten, M. S. M. y Kuenen, J. G.** 1996. Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms in a fluidized bed reactor. Microbiol. **142**:2187-2196.
194. **Van de Graaf, A. A., Mulder, A., de Bruijin, P., Jetten, M. S. M., Robertson, L. A. y Kuenen, J. G.** 1995. Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process. Appl. Environ. Microbiol. **61**:1246-1251.
195. **Van Loosdrecht, M. C. M. y Jetten, M. S. M.** 1998. Microbial conversions in nitrogen removal. Water Scie. Tenchnol. **38**:1-7.
196. **Vannelli, T. y Hooper, A. B.** 1992. Oxidation of nitrapyrin to 6-chloropicolinic acid by ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*. Appl. Environ. Microbiol. **58**:2321-2325.



197. **Vannelli, T. y Hooper, A. B.** 1993. Reductive dehalogenation of the trichloromethyl group of nitrapyrin by the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:3597-3601.
198. **Vannelli, T., Logan, M., Arciero, D. M. y Hooper, A. B.** 1990. Degradation of halogenated aliphatic compounds by ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:1169-1171.
199. **Varga, J. N. R., Anderson, R. T., Fraga, J. L., Ringelberg, D. y Lovley, D. R.** 1999. Microbial communities associated with anaerobic benzene degradation in a petroleum-contaminated aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:3056-3063.
200. **Villaverde, S., García-Encina, P. A. y FDZ-Polanco, F.** 1997. Influence of pH over nitrifying biofilm activity in submerged biofilters. *Water Res.* **31**:1180-1186.
201. **Voysey, P. A. y Wood, P. M.** 1987. Methanol and formaldehyde oxidation by an autotrophic nitrifying bacterium. *J. Gen. Microbiol.* **33**:283-290.
202. **Wallace, A. W. y Nicholas, D. J. D.** 1969. *Biochem. Biophys. Acta.* **171**:229-237.
203. **Wang, D. I. C., Cooney, C. L., Demain, A. L., Dunnill, P., Humphrey, A. E. y Lilly, M. D.** Fermentation and enzyme technology. John Wiley and Sons. Canada. 1979. p. 57-97.
204. **Weiner, J. M. y Lovley, D. R.** 1998a. Anaerobic benzene degradation in petroleum-contaminated aquifer sediments after inoculation with a benzene-oxidizing enrichment. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:775-778.
205. **Weiner, J. M. y Lovley, D. R.** 1998b. Rapid benzene degradation in methanogenic sediments from a petroleum-contaminated aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:1937-1939.
206. **Whittaker, M., Bergmann, D., Arciero, M. y Hooper, A. B.** 2000. Electron transfer during the oxidation of ammonia by the chemolithotrophic bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1459**:346-355.
207. **Wiesmann, U.** 1994. Biological nitrogen removal from wastewater. p. 113-154. In: Fiechter, A. (ed.). *Advances in biochemical engineering/biotechnology.* Springer Verlag, Berlin.
208. **Wood, P. M.** 1986. Nitrification as a bacterial energy source, p. 39-62. *In* J. I. Prosser (ed.), *Nitrification.* IRL Press, Oxford.

209. **Wübker, S. M., Laurenzis, A., Werner, U. y Friedrich, C.** 1997. Controlled biomass formation and kinetics of toluene degradation in a bioscrubber and in a reactor with a periodically moved trickled-bed. *Biotechnol. Bioeng.* **55**:686-692.
210. **Yadav, J. S. y Reddy, C. A.** 1993. Degradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes (BTEX) by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:756-762.
211. **Yamanaka, T. y Shinra, M.** 1974. Cytochrome c-552 and cytochrome c-554 derived from *Nitrosomonas europaea*. Purification, properties and their function in hydroxylamine oxidation. *J. Biochem.* **75**:1265-1273.
212. **Yerushalmi, L. y Guiot, S. R.** 1998. Kinetics of biodegradation of gasoline and its hydrocarbon constituents. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49**:475-481.
213. **Zahn, J. A., Arciero, D. M., Hooper, A. B. y DiSpirito, A. A.** 1996. Evidence for an iron center in the ammonia monooxygenase from *Nitrosomonas europaea*. *FEBS. Lett.* **397**:35-38.
214. **Zepeda, A., Texier, A.-C. y Gomez, J.** 2003. Benzene transformation in nitrifying batch cultures. *Biotechnol. Prog.* **19**:789-793.
215. **Zhou, N. Y., Jenkins, A., Chion, C. K. N. y Leak, D. J.** 1999. The alkane monooxygenase from *Xanthobacter* strain Py2 is closely related to aromatic monooxygenases and catalyzes aromatic monohydroxylation of benzene, toluene and phenol. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:1589-1595.
216. **Zumft, W. G.** 1993. The biological role of nitric oxide in bacteria. *Arch. Microbiol.* **160**:253-264.
217. **Zumft, W.G.** 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**:533-616.

# Benzene Transformation in Nitrifying Batch Cultures

A. Zepeda,<sup>†</sup> A.-C. Texier,<sup>\*,†,‡</sup> and J. Gomez<sup>†</sup>

Departamento de Biotecnología, Div. CBS, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco 186, C.P. 09340, México, D.F., and Programa de Biotecnología del Petróleo, Instituto Mexicano del Petróleo, Eje Central Lázaro Cárdenas 152, C.P. 07730, México, D.F.

The effect of benzene on the nitrifying activity of a sludge produced in steady-state nitrification was evaluated in batch cultures. Benzene at 10 mg/L inhibited nitrate formation by 53%, whereas at 5 mg/L there was no inhibition. For initial benzene concentrations of 0, 7, and 10 mg/L, the specific rates of  $\text{NO}_3^-$ -N production were  $0.545 \pm 0.101$ ,  $0.306 \pm 0.024$ , and  $0.141 \pm 0.010$  g  $\text{NO}_3^-$ -N/g microbial protein-N·h, respectively. The specific rates of benzene consumption at 7, 12, and 20 mg/L were  $0.034 \pm 0.003$ ,  $0.050 \pm 0.006$ , and  $0.027 \pm 0.002$  g/g microbial protein-N·h, respectively. Up to a concentration of 10 mg/L, benzene was first oxidized to phenol, which was later totally oxidized to acetate. Benzene at higher concentrations (20 and 30 mg/L) was converted to intermediates other than acetate, phenol, or catechol. These results suggest that this type of nitrifying consortium coupled with a denitrification system may have promising applications for complete removal of nitrogen and benzene from wastewaters.

## Introduction

Nitrification followed by denitrification is a widely used process for biological removal of nitrogen from wastewaters. Nitrification is the process of oxidation of ammonia to nitrite and nitrate by lithoautotrophic ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria. The nitrifying bacteria are sensitive to a number of environmental factors, such as substrate concentration, pH, temperature, oxygen concentration, and the presence of organic compounds (1, 2). A large number of organic compounds can inhibit nitrification (3, 4).

Benzene, toluene, ethylbenzene, and *o*-, *m*-, and *p*-xylenes (BTEX) compounds have been found as contaminants in soils, sediments, and groundwater. These have been classified as priority pollutants by the Environmental Protection Agency (5). The BTEX compounds can adversely affect the efficiency of biological treatment systems because of their toxicity and recalcitrance to many microorganisms. Biodegradation of BTEX compounds by heterotrophic bacteria under anaerobic and aerobic conditions has been explored (5–9). However, very little attention has been paid to the toxicological or inhibitory influence of these compounds on lithoautotrophic nitrifying microorganisms. Inhibition of nitrification by toxic chemicals, such as BTEX compounds, focuses on the modes of action of nitrification inhibitors on the enzyme ammonia monooxygenase (AMO) (10, 11). It has been suggested that this enzyme is responsible for the  $\text{NH}_3$  oxidation to hydroxylamine in *Nitrosomonas europaea* cultures. Pure strains or enriched cultures of nitrifiers coupled with various toxicity tests have been used to evaluate the inhibition of nitrification (3, 12). The experimental conditions in these reports were different

(type of inoculum, concentration of cells, and techniques of measurement), and the variables used for evaluating the rate of inhibition have been heterogeneous. Moreover, the values for the nitrification specific rates and rates of removal of inhibiting substances are not reported in the literature and are needed for characterizing the physiological behavior of the nitrifying sludge in the presence of organic compounds.

The aim of this study was to evaluate the effect of different initial concentrations of benzene on a nitrifying sludge produced in steady-state nitrification in batch cultures. To evaluate the overall performance of the nitrification process, benzene,  $\text{NH}_4^+$ -N,  $\text{NO}_2^-$ -N, and  $\text{NO}_3^-$ -N concentrations were measured, and the specific rates were calculated from the kinetic data. Toxic effects and transformation of benzene were also studied in the nitrifying batch cultures.

## Materials and Methods

**Analytical Methods.** Headspace and liquid concentrations of benzene in the bottles were analyzed by gas chromatography (GC) (Varian Star model 3400) using a flame ionization detector (FID). A 0.2- $\mu\text{L}$  sample was injected into a capillary column with stationary phase carbowax/BTR (30 m long by 0.53 mm i.d. and film thickness of 1  $\mu\text{m}$ ) (Quadrex, Woodbrige, USA). The temperatures of the oven, the injector, and the detector were fixed at 60, 235, and 250 °C, respectively. Acetate was measured by GC (Hewlett-Packard 5890) using a FID and a capillary column (AT-1000). The temperatures of the oven, the injector, and the detector were fixed at 120, 130, and 150 °C, respectively. For both GC analyses, the carrier gas used was nitrogen at a flow rate of 4 mL/min. HPLC was also used to measure benzene and its intermediates formed during the cultures. A C18 reverse phase column was employed, and the mobile phase was acetonitrile/water (6:4, v/v) at 1.5 mL/min. The UV detector was used at 254 nm. Ammonium nitrogen

\* To whom correspondence should be addressed. Tel: (52) 55 58 04 47 11. Fax: (52) 55 58 04 64 07. E-mail: actx@xanum.uam.mx.

<sup>†</sup> Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

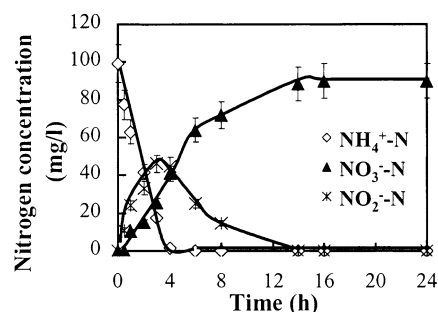
<sup>‡</sup> Instituto Mexicano del Petróleo.

( $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ) was analyzed by a selective electrode (Phoenix Electrode Co., USA) (13). Samples were centrifuged (9500*g* for 10 min) and filtered (0.45  $\mu\text{m}$ ) for the analysis of nitrite and nitrate by capillary electrophoresis (Waters capillary ion analyzer). A microcapillary silica-fused column was used. The reference electrolyte was sodium chromate  $4.6 \times 10^{-3}$  M. The standard solution was a mixture of nitrite and nitrate, each at 50 mg/L, which were detected at 254 nm at 25 °C. Total organic carbon (TOC) was measured using a TOC meter (Shimadzu TOC-5000A). Lowry's method was employed to measure microbial protein concentration (14). The concentration of the dissolved oxygen was determined through Henry's law, assuming that gaseous  $\text{O}_2$  was ideal gas (15, 16). The partial pressure of oxygen was measured into the flask's headspace using a digital pressure meter (Deneb model DPM-2015). Analytical methods had a variation coefficient of less than 10%.

**Inoculum and Culture Medium Composition.** The sludge used for inoculating batch reactors was obtained from a continuous stirred nitrifying culture. The 3-L reactor was kept operating continuously for over 2 years at 300 rpm, temperature at 30 °C, pH  $8.0 \pm 0.5$ , and with a hydraulic retention time of 2.2 days. A constant airflow was provided of 2 volumes of air per volume of liquid per minute (VVM). The microbial protein content of the continuous culture was  $0.36 \pm 0.04$  g/L.

A synthetic wastewater composed of two media, A and B, was fed to the continuous culture. Medium A contained 200 mL/L of the following nutrient solution (g/L):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (5.9),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (4.8),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (7.0),  $\text{MgSO}_4$  (3.0), and  $\text{NaCl}$  (5.0). Total  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  concentration was 500 mg/L. Medium B consisted of  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0.4 g/L) and  $\text{NaHCO}_3$  (40.4 g/L), which acted as pH buffer and as carbon source. Both media, A and B, were fed at 1.19 and 0.26 L/d, respectively.  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  was added daily into the reactor at 0.01 g/L·d. The medium used for batch cultures was a mixture of media A and B at the following ratios: C/N of 5.0, N/S of 1.1, and N/P of 1.6. The initial  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  concentration was  $100 \pm 10$  mg/L. The chemical composition of batch culture medium was (g/L):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0.24),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (0.19),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.28),  $\text{MgSO}_4$  (0.12),  $\text{NaCl}$  (0.20),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.01),  $\text{CaCl}_2$  (0.03), and  $\text{NaHCO}_3$  (3.5).

**Batch Cultures.** All experiments were conducted in 120-mL serum bottles. A 50-mL volume of medium used for batch cultures was put in each bottle. Oxygen (99.6% purity) was then bubbled through the medium for 5 min. Nitrifying sludge was drawn from the 3-L continuous reactor and centrifuged (9500*g* for 20 min). The harvested biomass was resuspended (inoculum) in the medium placed in the flasks. The bottles were later sealed with rubber caps and aluminum rings. The initial microbial protein concentration in batch cultures was  $150 \pm 10$  mg/L. Oxygen was again injected for 5 min into the bottle's 70-mL headspace. Benzene was added to the microbial suspension using a 10- $\mu\text{L}$  syringe to fix the initial concentration ranging from 5 to 50 mg/L. The cultures were placed on an orbital shaker working at 200 rpm at 30 °C. Initial pH value was 8.5 in all cases. To evaluate the toxicity of benzene on the nitrifying sludge, the inoculum that had been previously exposed to different concentrations of benzene for 16 h was harvested by centrifugation (9500*g* for 20 min). The pellets were washed twice with a solution of  $\text{NaCl}$  (9 g/L) before using the same as inoculum in 16-h nitrifying batch cultures without benzene. Cultures were incubated in the presence of benzene at 0, 7, and 10 mg/L, and samples were withdrawn at different times over a period of 24 h for conducting kinetic studies of nitrification. Samples were



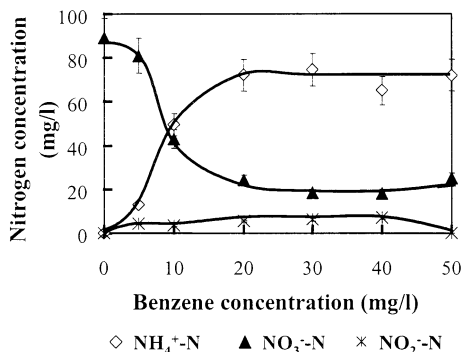
**Figure 1.** Ammonia oxidation by a stabilized nitrifying inoculum in batch culture.

filtered (0.45  $\mu\text{m}$ ) and analyzed for ammonia, nitrite, and nitrate. The volumetric rates of  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  consumption and  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  production were estimated from the kinetic curves and expressed as mg N/L·h. With the microbial protein concentration known and assuming that 16% of total microbial protein is nitrogen, the specific rates of  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  consumption and  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  production were calculated and expressed as g N/g microbial protein·h. Kinetic profiles for benzene removal were established when benzene was provided at 7, 12, and 20 mg/L. Culture samples were drawn at different times through 100 h, filtered (0.45  $\mu\text{m}$ ), and analyzed for benzene, phenol, catechol, and acetate. According to the same calculation method used for determining the specific rates of nitrification, the specific rates of benzene disappearance were deduced from the volumetric rates of benzene removal and the microbial protein concentration. All batch cultures were carried out at least in duplicate. Possible loss of benzene due to volatilization and adsorption on bacterial sludge was monitored by using abiotic and sterile controls.

## Results and Discussion

**Continuous Nitrifying Reactor.** At a constant  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  loading rate ( $194 \pm 4$  g/m<sup>3</sup>·d), the  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  production rate reached  $191 \pm 7$  g/m<sup>3</sup>·d. The output of  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  rate remained very low (0.2 g/m<sup>3</sup>·d). The nitrification was in steady state as the nitrate production rates of the continuous reactor remained constant. Under these steady-state operating conditions, ammonium consumption efficiency was very close to 100% and conversion of the consumed  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  to  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  was 98%. Nitrite was not detected in the culture. The rate of production of microbial protein remained around 12 g/m<sup>3</sup>·d. The sludge used in our study for inoculating the batch cultures was routinely produced under these conditions.

**Effect of Benzene on Nitrifying Sludge.** Control batch cultures without benzene were conducted before looking for the effect of benzene on the nitrifying sludge to ensure that the nitrification process proceeded successfully under batch experimental conditions. Results of the tests are shown in Figure 1. It can be seen that nitrite concentration remained negligible after 16 h. A high  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  consumption efficiency (100%) coupled with a high rate of conversion of ammonium to nitrate (89%) was attained. Under these culture conditions, there was no significant formation of microbial protein. Thus it was evident that nitrification batch process occurred in the control cultures without any limitation for oxygen. The initial dissolved oxygen concentration was found to be of 25 mg/L, which gradually came down to 15 mg/L in the course of 16 h. Consequently, a contact time of 16 h was chosen for carrying out the batch cultures in the presence of benzene. Tests with abiotic blanks showed that any



**Figure 2.** Effect of benzene concentration on the nitrifying activity. Each point was determined after 16 h.

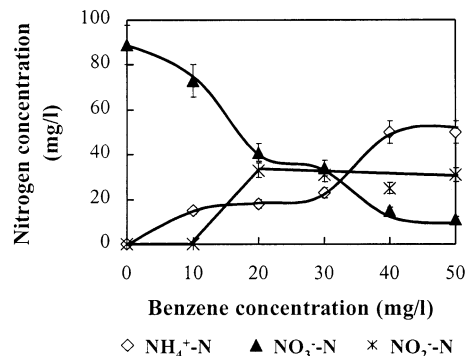
possible loss of benzene from the bottles due to volatilization was negligible. Under these conditions, the ratio of benzene concentration in the headspace and liquid phase showed constant values of 20% and 80%, respectively.

Figure 2 shows the effect of different concentrations of benzene on the nitrification process after 16 h. At 10 mg/L of benzene, the  $\text{NO}_3^-$ -N production dropped to 47%, whereas 5 mg/L did not significantly affect the biological process. Between 20 and 50 mg/L of benzene, the concentration of non-oxidized  $\text{NH}_4^+$ -N remaining in solution reached a constant level of  $71 \pm 4$  mg/L.  $\text{NO}_2^-$ -N production reached concentrations between 4 and 8 mg/L. Benzene, therefore, significantly inhibited the nitrifying activity of the sludge by decreasing the  $\text{NH}_4^+$ -N oxidation to  $\text{NO}_3^-$ -N. Results also suggest that benzene inhibited the ammonia-oxidizing microorganisms and in turn the non-oxidized  $\text{NH}_4^+$ -N inhibited the nitrite-oxidizing microorganisms (17). Keener and Arp (10) in their study on the inhibition of  $\text{NH}_4^+$  oxidation by *Nitrosomonas europaea* from various aromatic compounds reported that benzene concentrations of 14.0 and 23.4 mg/L inhibited the  $\text{NO}_2^-$  production by 60% and 80%, respectively. Dyreborg and Arvin (12) observed that the level of benzene concentration provoking 100% inhibition of the ammonium oxidation was 10.7 mg/L. It must be noted that the results cited above were obtained under different experimental conditions (pure strains, toxicity test, saturated sand column as reactor). The results reported in our study were obtained from a nitrifying consortium in steady-state nitrification and using batch reactors.

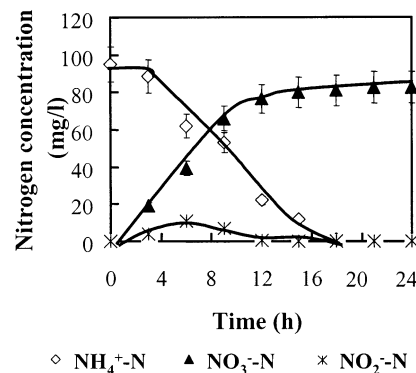
**Toxic Effect of Benzene on Nitrifying Bacteria.**

The pellets in each batch culture previously exposed for 16 h to different concentrations of benzene were washed with a solution of NaCl (9 g/L) and used in nitrifying batch cultures without benzene in order to evaluate the toxic influence of benzene on the nitrifying sludge. Figure 3 shows that after 16 h, the inoculum previously exposed to 10 mg/L of benzene recovered a significant part of its nitrifying activity with a conversion rate of 82% from  $\text{NH}_4^+$ -N to  $\text{NO}_3^-$ -N. However, the inocula that were in the presence of 20–50 mg/L of benzene were not able to oxidize ammonium to nitrate completely. Benzene at 20–50 mg/L induced a significant inhibition of the nitrification process with accumulation of ammonium ( $50 \pm 3$  mg/L) and nitrite ( $30 \pm 3$  mg/L) in the cultures. This suggests that benzene at 20–50 mg/L inhibits the activity not only of the ammonia-oxidizing microorganisms but also of the nitrite-oxidizing microorganisms.

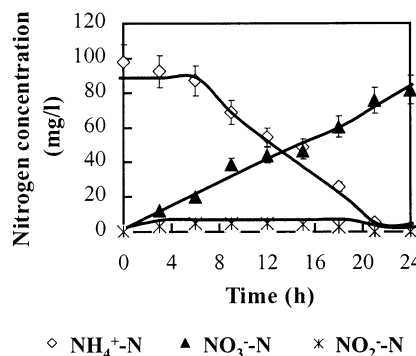
**Nitrification Kinetic Studies in the Presence of Benzene.** Kinetic profiles were established for  $\text{NH}_4^+$ -N,  $\text{NO}_2^-$ -N, and  $\text{NO}_3^-$ -N when benzene was present at 7 and 10 mg/L in the batch cultures (Figures 4 and 5). Adapta-



**Figure 3.** Toxic effect of benzene on the nitrifying sludge. Each inoculum previously exposed to different concentrations of benzene for 16 h was reused in batch cultures without benzene.



**Figure 4.** Ammonia oxidation in a nitrifying culture in the presence of benzene at 7 mg/L.



**Figure 5.** Ammonia oxidation in a nitrifying culture in the presence of benzene at 10 mg/L.

tion times and specific rates of  $\text{NH}_4^+$ -N consumption and  $\text{NO}_3^-$ -N production were calculated and compared with the results obtained in control cultures without benzene (Figure 1). Results are presented in Table 1. Benzene provoked an increase in the adaptation time of the sludge for initiating ammonium oxidation and a significant decrease in the values for nitrification specific rates. At 7 and 10 mg/L of benzene, the specific rate of  $\text{NO}_3^-$ -N production decreased by 44% and 74%, respectively. Moreover, it was observed that nitrite formation was not favored by the presence of benzene at these concentrations in the cultures. At 0, 7, and 10 mg/L of benzene, the nitrite concentrations reached maximum levels of 46, 11, and 6 mg/L, respectively. It appeared that, up to 10 mg/L, benzene inhibited mainly the activity of the ammonia-oxidizing microorganisms, perhaps competing to link with the active site of the AMO as suggested by McCarty (11).

**Benzene Transformation in Nitrifying Cultures.** As previously indicated in this study, loss of benzene was

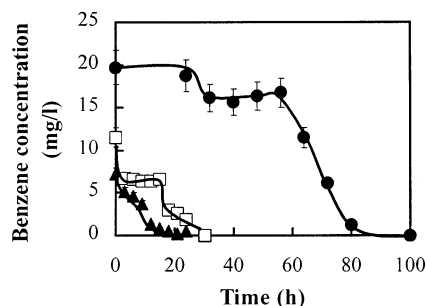
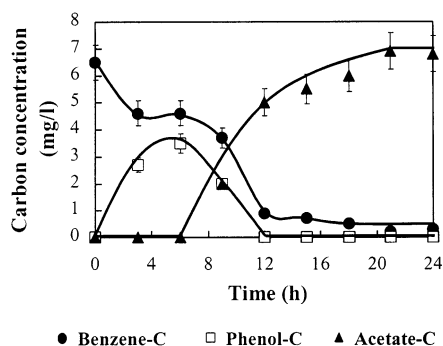
**Table 1. Adaptation Times and Specific Rates of the Nitrification Cultures in the Absence and Presence of Benzene**

initial benzene concns (mg/L)	adaptation times (h)	specific rates	
		NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N consumption <sup>a</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N production <sup>b</sup>
0	0	1.252 ± 0.116	0.545 ± 0.101
7	3	0.266 ± 0.008	0.306 ± 0.024
10	6	0.226 ± 0.009	0.141 ± 0.010

<sup>a</sup> In g NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N/g microbial protein-N·h <sup>b</sup> In g NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N/g microbial protein-N·h.

negligible under the batch experimental conditions. Furthermore, adsorption was evaluated using sterile controls. Benzene at 20 mg/L decreased by 4% as a result of adsorption on the sludge. With active bacteria, it was observed that benzene at 7 mg/L disappeared completely from the culture medium over 24 h. The benzene consumption kinetics were established in the nitrifying batch cultures at different initial concentrations (7, 12, and 20 mg/L) (Figure 6). Estimations of adaptation times and benzene removal rates were deduced from the kinetic curves, considering the second decreasing wave as representative of the main benzene removal rate. For initial concentrations of 7, 12, and 20 mg/L, benzene consumption occurred mainly after adaptation times of 6, 15, and 56 h, respectively. In addition, the specific rates of benzene disappearance estimated for initial concentrations of 7, 12, and 20 mg/L were 0.034 ± 0.003, 0.050 ± 0.006, and 0.027 ± 0.002 g/g microbial protein-N·h, respectively. From these results, it appears that the microbial sludge showed a distinct behavior when benzene was present at 20 mg/L in the cultures than for lower concentrations. At 20 mg/L of benzene, the nitrifying consortium needed a long adaptation time of 56 h to initiate benzene consumption and the removal rate of benzene was lower.

At 7 mg/L of benzene, the corresponding theoretical concentration of TOC was 6.5 mg/L, and after 24 h of culture its measured value was 7.1 mg/L ± 10%. Benzene disappeared from the aqueous solution despite the fact that the carbon concentration remained almost constant. The initial microbial protein concentration of 150 ± 10 mg/L did not change significantly as compared to 155 ± 10 mg/L regardless of whether benzene was initially added. Thus, benzene was not consumed by the lithoautotrophic nitrifying consortium as carbon source but was converted to other carbon substances. To obtain more information on the benzene transformation, the kinetic profiles of benzene and its intermediates were established for an initial concentration of 7 mg/L (6.5 mg benzene-C/L). As shown in Figure 7, the decrease in the benzene concentration was first accompanied by the formation of phenol. After 6 h, both benzene and phenol disappeared progressively from the cultures and, concomitantly, acetate was produced. In control batch cultures without benzene, acetate was not detected in the medium. The added benzene (6.5 mg benzene-C/L ± 10%) was totally transformed into acetate (6.8 mg acetate-C/L ± 10%). Previous studies carried out with whole cells of *N. europaea* have shown that the AMO (the enzyme which oxidizes ammonia to hydroxylamine) oxidized benzene to phenol and subsequently phenol to hydroquinone (10, 18). Hydroquinone was not detected in our study as a product of phenol oxidation, but acetate was detected. No evidence for ring fission of aromatics by *N. europaea* was obtained as noted by Keener and Arp (10). It is presumed that *N. europaea* may initiate oxidation of benzene to provide phenol, which could later be transformed to

**Figure 6.** Benzene removal kinetics in a nitrifying culture at three different initial concentrations: 7, 12, and 20 mg/L.**Figure 7.** Kinetic profiles of the benzene transformation in a nitrifying culture for an initial concentration of 7 mg/L.

acetate by other bacteria from the nitrifying consortium. Microorganisms, both aerobes and anaerobes, capable of oxidizing phenol are frequently found in the consortia. Many aerobic phenol degrading microorganisms have been isolated, and the pathways of aerobic phenol metabolism and the enzymes involved have been studied in detail. The first step of the aerobic degradation of phenol results in catechol, which can be transformed via two alternative pathways where ring fission occurs and where the compounds produced are further metabolized into intermediates of the Krebs cycle (19). Acetate could be a product of such pathway in the biodegradation of phenol.

When benzene was present at 12 mg/L (11 mg benzene-C/L ± 10%), phenol was not detected as an intermediate in the culture medium. However, duplicated results showed that after 24 h, 71% of benzene was transformed into acetate. The benzene-C and acetate-C concentrations in the culture were 1.8 mg C/L ± 10% and 7.8 mg C/L ± 10%, respectively. When benzene was present at 20 and 30 mg/L, two unidentified intermediates were detected by HPLC. Acetate, phenol, and catechol were tested as possible benzene intermediates. However, neither of them was detected in the culture medium. These results are in agreement with those previously obtained in this work from the benzene kinetic study. It was observed that, at 20 mg/L of benzene, the sludge needed a much longer adaptation time to initiate benzene transformation and proceeded at a lower rate than when benzene was present at 7 and 12 mg/L. It appeared that at higher concentrations (20 and 30 mg/L), the consumption of benzene from the culture medium probably occurred through a different metabolic pathway than for lower concentrations (7 and 12 mg/L). This would explain why the intermediates produced from the benzene transformation were different at 20 and 30 mg/L than at 7 and 12 mg/L.

## Conclusion

Benzene at 5 mg/L can be tolerated by the sludge produced in steady-state nitrification whereas benzene

at 10 mg/L inhibited by 53% nitrate formation, suggesting that wastewaters containing up to 5 mg/L of benzene would not affect the rate of ammonium removal from a treatment system. Benzene induced an increase in the adaptation time of the cultures for initiating nitrification and a significant decrease in the values for specific rates of  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  consumption (82% for 10 mg/L benzene) and  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  production (74% for 10 mg/L benzene). For initial concentrations of 7, 12, and 20 mg/L, the benzene consumption occurred after an adaptation time of 6 h at  $0.034 \pm 0.003$  g/g microbial protein-N·h, after 15 h at  $0.050 \pm 0.006$  g/g microbial protein-N·h, and after 56 h at  $0.027 \pm 0.002$  g/g microbial protein-N·h, respectively. Up to a concentration of 10 mg/L, benzene was first oxidized to phenol, which was later totally oxidized to acetate. These results indicated that, up to 10 mg/L of benzene, the nitrification inhibition would be mainly due to a competition of benzene for the active site of the AMO. Benzene at higher concentrations (20 and 30 mg/L) was converted to intermediates other than acetate, phenol, or catechol, probably through a different metabolic pathway.

The results suggest that this type of nitrifying consortium coupled with a denitrification system may have promising applications for complete removal of both nitrogen and benzene from wastewater streams into  $\text{N}_2$  and  $\text{CO}_2$ . The nitrification system could be used to oxidize ammonia to nitrate and to transform benzene to acetate. As heterotrophic denitrification uses organic matter for nitrate reduction to  $\text{N}_2$ , nitrification could be coupled with a denitrification system where nitrate and acetate are easily consumed by denitrifiers.

#### Acknowledgment

This research was supported by CONACYT (400200-5-33668-U, 160302) and IMP projects (D.00021, FIES 98-106-VI).

#### References and Notes

- (1) Prosser, J. I. Autotrophic nitrification in bacteria. *Adv. Microbiol. Physiol.* **1989**, *30*, 125–181.
- (2) Bock, E.; Koops, H.-P.; Harms, H.; Ahlers, B. The biochemistry of nitrifying organisms. In *Variations in Autotrophic Life*; Shively, J. M., Barton, L. L., Eds.; Academic Press: London, 1991; Vol. 15, pp 171–200.
- (3) Pantea-Kiser, L.; Wukasch, R. F.; Alleman, J. E. Effect of inhibitory compounds on biological nitrification. *Proceedings of the 44th Purdue Industrial Waste Conference*, May 9–11 1989, Purdue University, West Lafayette, IN; CRC Press: Boca Raton, FL, 1990; pp 465–474.
- (4) Texier, A.-C.; Gomez, J. Tolerance of nitrifying sludge to *p*-cresol. *Biotechnol. Lett.* **2002**, *24*, 321–324.
- (5) Yadav, J. S.; Reddy, C. A. Degradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes (BTEX) by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **1993**, *59*, 756–762.
- (6) Chang, M. K.; Voice, T. C.; Criddle, C. S. Kinetics of competitive inhibition and cometabolism in the biodegradation of benzene, toluene, and *p*-xylene by two *Pseudomonas* isolates. *Biotechnol. Bioeng.* **1993**, *41*, 1057–1065.
- (7) Elmén, J.; Pan, W.; Leung, S. Y.; Magyarosy, A.; Keasling, J. D. Kinetics of toluene degradation by a nitrate-reducing bacterium isolated from a groundwater aquifer. *Biotechnol. Bioeng.* **1997**, *55*, 82–90.
- (8) Chang, S. W.; La, H. J.; Lee, S. J. Microbial degradation of benzene, toluene, ethylbenzene and xylene isomers (BTEX) contaminated groundwater in Korea. *Water Sci. Technol.* **2001**, *44*, 165–171.
- (9) Collins, L. D.; Daugulis, A. J. Simultaneous biodegradation of benzene, toluene, and *p*-xylene in a two-phase partitioning bioreactor: Concept demonstration and practical application. *Biotechnol. Prog.* **1999**, *15*, 74–80.
- (10) Keener, W. K.; Arp, D. J. Transformations of aromatic compounds by *Nitrosomonas europaea*. *Appl. Environ. Microbiol.* **1994**, *60*, 1914–1920.
- (11) McCarty, G. W. Review article: Modes of action of nitrification inhibitors. *Biol. Fertil. Soils* **1999**, *29*, 1–9.
- (12) Dyreborg, S.; Arvin, E. Inhibition of nitrification by creosote-contaminated water. *Water Res.* **1995**, *29*, 1603–1606.
- (13) Clesceri, L. S.; Greenberg, A. E.; Eaton, A. D. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20th ed.; American Public Health Association: Washington, DC, 1998.
- (14) Lowry, O. H.; Rosen Brough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**, *193*, 265–275.
- (15) Berry, R. S.; Rice, S. A.; Ross, J. *Physical Chemistry*; John Wiley & Sons: New York, 1980; pp 914–921.
- (16) Liley, P. E.; Thomson, G. H.; Friend, D. G.; Daubert, T. E.; Buck, E. Physical and chemical data. In *Perry's Chemical Engineers' Handbook*, 7th ed.; Perry, R. H., Green, D. W., Eds.; McGraw-Hill Companies, Inc.: New York, 1997; Section 2, pp 1–204.
- (17) Anthonisen, A. C.; Loehr, R. C.; Prakasam, T. B. S.; Srinath, E. G. Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *J. Water Pollut. Control Fed.* **1976**, *48*, 835–852.
- (18) Hyman, M. R.; Sansome-Smith A. W.; Shears, J. H.; Wood, P. M. A kinetic study of benzene oxidation to phenol by whole cells of *Nitrosomonas europaea* and evidence for the further oxidation of phenol to hydroquinone. *Arch. Microbiol.* **1985**, *143*, 302–306.
- (19) Van Schie, P. M.; Young, L. Y. Biodegradation of phenol: Mechanisms and applications. *Bioremediation J.* **2000**, *4*, 1–18.

Accepted for publication February 19, 2003.

BP0201408

## ANEXO II

### **Kinetic and metabolic study of benzene, toluene and *m*-xylene in nitrifying batch cultures**

**A. Zepeda, A. -C. Texier\* and J. Gomez**

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Div. CBS, Departamento de Biotecnología, Av. San Rafael Atlixco 186, C.P. 09340, México, D. F.

\* Author for correspondence (Fax: +52 55 58046407; E-mail: actx@xanum.uam.mx).

**Key words:** BTX compounds, inhibition, kinetics, nitrification, transformation.

#### **Abstract**

The effect of benzene, toluene, and *m*-xylene (BTX) compounds on the nitrifying activity of a sludge produced in steady-state nitrification was evaluated in batch cultures. Benzene, *m*-xylene, and toluene at 10 mg C/l decreased ammonium consumption efficiency by 57%, 26%, and 0%, respectively, while the consumed  $\text{NH}_4^+$ -N was totally oxidized to  $\text{NO}_3^-$ -N. There was no significant effect at 5 mg C/l of each aromatic compound. BTX (5-20 mg C/l) induced a significant decrease in the values for specific rates of  $\text{NH}_4^+$ -N consumption (76-99%) and  $\text{NO}_3^-$ -N production (45-98%). At 10 mg C/l of BTX compounds, the inhibition order on nitrate production was: benzene > *m*-xylene > toluene while at 20 mg C/l, the sequence changed to *m*-xylene > toluene > benzene for both nitrification inhibition and BTX compounds persistence. At 5 mg C/l of BTX compounds, there was no toxic effect on the sludge whereas from 10 to 50 mg C/l, bacteria did not totally recover their nitrifying activity. At a concentration of 5 mg C/l, toluene was first oxidized to benzyl alcohol, which was later oxidized to butyrate while *m*-xylene was oxidized to acetate and butyrate.



## Introduction

Nitrification is the oxidation of ammonia to nitrate via nitrite by two groups of chemolithotrophic bacteria: the ammonia and nitrite oxidizers. Ammonia oxidizers, typified by the genus *Nitrosomonas* and the species *N. europaea*, obtain their energy for CO<sub>2</sub> fixation from the combined action of the ammonia monooxygenase (AMO) and the hydroxylamine oxidoreductase (HAO) (Hollocher *et al.* 1981). AMO is a membrane-bound enzyme ( $\text{NH}_3 + 2 \text{e}^- + \text{O}_2 + 2 \text{H}^+ \rightarrow \text{NH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$ ) and HAO is located in the periplasm ( $\text{NH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NO}_2^- + 4 \text{e}^- + 5 \text{H}^+$ ) (Igarashi *et al.* 1997). Nitrite oxidizers, typified by the genus *Nitrobacter* and the species *N. agilis* and *N. winogradskyi*, oxidize nitrite to nitrate ( $\text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NO}_3^- + 2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^-$ ) by the nitrite oxidoreductase. This enzyme is located at inner side of the cytoplasmic and intracytoplasmic membranes (Sundermeyer-Klinger *et al.* 1984; Prosser 1989; Arp *et al.* 2002).

Some aromatic compounds are known to inhibit nitrification (McCarty 1999; Brandt *et al.* 2001; Texier and Gomez 2002). Zepeda *et al.* (2003) have observed that benzene significantly inhibited the nitrifying activity of a sludge produced in steady-state nitrification by decreasing the NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N oxidation to NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N. Benzene, toluene, and xylenes (BTX) are toxic and carcinogenic contaminants found in soils, sediments, and groundwater. Little attention has been paid to the inhibitory influence of these compounds on nitrifying microorganisms. Several investigations have shown that *N. europaea* oxidizes a broad range of hydrocarbon, including aromatic and no-aromatic compounds (Hyman *et al.* 1985; Keener and Arp 1993; 1994; Duddleston *et al.* 2002). These oxidations are mediated by AMO and provided oxidation products which are not assimilated but rather accumulated in the culture medium. However, these studies have been performed in axenic cultures ignoring both interactions and diversity of the bacteria present in microbial consortium. It has been shown in an earlier study that benzene can be totally oxidized to acetate by a nitrifying consortium (Zepeda *et al.* 2003). These previous results have suggested that this type of nitrifying consortium coupled with a denitrification system may have promising applications for complete removal of nitrogen and benzene from wastewaters. It was of interest to continue investigations in order to compare the inhibitory effect of BTX on nitrification processes and investigate the capacity of the nitrifying consortium to transform these compounds into volatile fatty acids (VFA). Moreover,

values for specific rates of both nitrification and inhibitory substances elimination are rarely reported in the literature when they are useful data to characterize the physiological behavior of a sludge in presence of aromatic compounds and understand better the possible mechanisms of inhibition. Considerable work has been conducted on the response of the bacterial membrane to hydrophobic pollutants and the possible mechanisms for the inhibition of  $\text{NH}_3$  oxidation in axenic cultures by aromatic compounds (Sikkema *et al.* 1995; McCarty 1999). However, less research has been conducted on nitrifying consortium where both cellular damage and enzymatic inhibition by chemicals are involved.

The aim of this study was to evaluate and compare the inhibitory effect of different initial concentrations of benzene, toluene, and *m*-xylene on a nitrifying sludge produced in steady-state nitrification in batch cultures. Kinetic studies were carried out to determine the specific rates of both nitrification and BTX elimination. Toxic effects and BTX compounds biotransformation were also investigated in the nitrifying batch cultures.

## **Materials and Methods**

**Analytical methods.** Concentrations of BTX compounds (headspace and liquid phases) and VFA in the bottles were analyzed by gas chromatography (Varian Star model 3400 and Hewlett Packard 5890) using a flame ionization detector. HPLC was also used to measure the BTX compounds and their intermediates. Ammonium nitrogen ( $\text{NH}_4^+$ -N) was analyzed by a selective electrode (Phoenix Electrode Co., USA). Nitrite and nitrate were analyzed by capillary electrophoresis (Waters Capillary Ion Analyzer). Lowry's method was employed to measure microbial protein concentration. All experimental conditions used for the analytical methods formerly mentioned were previously detailed by Zepeda *et al.* (2003). Analytical methods had a variation coefficient of less than 10%.

**Batch cultures.** The sludge used for inoculating batch reactors was obtained from a continuous stirred nitrifying culture. Steady-state operating conditions and performance of the continuous reactor were previously described by Zepeda *et al.* (2003). The chemical composition of batch culture medium was (g/l):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0.24),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (0.19),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.28),  $\text{MgSO}_4$  (0.12),  $\text{NaCl}$  (0.20),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.01),  $\text{CaCl}_2$  (0.03), and  $\text{NaHCO}_3$  (3.5). The following ratios were used: C/N of 5.0, N/S of 1.1, and N/P of 1.6. The initial  $\text{NH}_4^+$ -N concentration was  $100 \pm 10$  mg/l.

All experiments were conducted in 120 ml serum bottles. A 50 ml volume of medium used for batch cultures was put in each bottle. Oxygen (99.6% of purity) was then bubbled through the medium for 5 min. Nitrifying sludge was drawn from the continuous reactor and centrifuged (9500 g for 20 min). The harvested biomass (inoculum) was resuspended in the medium placed in the flasks. The bottles were later sealed with rubber caps and aluminum rings. The initial microbial protein concentration in batch cultures was  $150 \pm 10$  mg/l. Oxygen was again injected for 5 min into the bottle's 70 ml headspace. BTX compounds were added to the microbial suspension using a 10  $\mu$ l syringe to fix the initial concentration ranging from 5 to 50 mg C/l. The cultures were placed on an orbital shaker working at 200 rpm at 30°C for 16 h. Initial pH value was  $8.5 \pm 0.5$  in all cases.  $\text{NH}_4^+$ -N consumption efficiency ( $E\text{-NH}_4^+$ , %) and nitrifying yield ( $Y\text{-NO}_3^-$ , g  $\text{NO}_3^-$ -N/g  $\text{NH}_4^+$ -N consumed) were determined after 16 h. To evaluate the toxicity of BTX on the nitrifying sludge, the inoculum that had been previously exposed to different concentrations of BTX for 16 h was harvested by centrifugation (9500 g for 20 min). The pellets were washed twice with a solution of NaCl (9 g/l) before using them as inoculum in 16 h nitrifying batch cultures without BTX compounds. For nitrification kinetic study, cultures were incubated in the presence of benzene at 0, 6.5, 10, and 20 mg C/l and toluene and *m*-xylene at 0, 5, 10, and 20 mg C/l and samples were withdrawn at different times over a period of 24 h. Samples were filtered (0.45  $\mu$ m) and analyzed for ammonia, nitrite, and nitrate. The volumetric rates of  $\text{NH}_4^+$ -N consumption and  $\text{NO}_3^-$ -N production were estimated from the kinetic curves and expressed as mg N/l.h. With the microbial protein concentration known and assuming that 16% of total microbial protein is nitrogen, the specific rates of  $\text{NH}_4^+$ -N consumption and  $\text{NO}_3^-$ -N production were calculated and expressed as g N/g microbial protein-N.h. The nitrite accumulation in batch cultures was determined by the integration of kinetic curves. Kinetic profiles for BTX removal were established when benzene was provided at 6.5, 10, and 20 mg C/l and toluene and *m*-xylene at 5, 10, and 20 mg C/l. Culture samples were drawn at different times, filtered (0.45  $\mu$ m), and analyzed for BTX and VFA. Persistence of BTX in the cultures was considered as a property of these compounds in that they may be biotransformed at different rates depending on experimental conditions used (Cheremisinoff 1996). Possible loss of BTX due to volatilization and adsorption on bacterial sludge was monitored by using abiotic and sterile controls. All batch cultures were carried out in triplicate.

## Results

**Effect of BTX compounds on nitrifying sludge.** In control batch cultures without BTX compounds, a high  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  consumption efficiency ( $E\text{-NH}_4^+ = 100\%$ ) coupled with a high conversion of consumed  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  to  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  ( $Y\text{-NO}_3^- = 0.91$ ) were attained after 16 h. Nitrite concentration remained negligible after this time. Consequently, a contact time of 16 h was chosen for carrying out the batch cultures in the presence of BTX. Results from control batch cultures showed that there was no limitation for oxygen. Tests with abiotic and sterile controls showed that any possible loss of BTX compounds from the bottles due to volatilization and adsorption on the nitrifying sludge was negligible. It was verified under abiotic conditions that for each BTX compound, the ratio of headspace and liquid phase concentrations showed constant values of 20% and 80%, respectively.

Figure 1 compares the effect of different concentrations of BTX compounds on the nitrification process after 16 h. At 5 mg C/l of each aromatic compound, there was no significant effect with  $E\text{-NH}_4^+$  of  $95 \pm 7\%$  and  $Y\text{-NO}_3^-$  of  $0.94 \pm 0.04$ . At 10 mg C/l, the decrease in ammonium consumption efficiency was the highest in the presence of benzene with  $E\text{-NH}_4^+$  of 43% and  $Y\text{-NO}_3^-$  of 1.00. *m*-Xylene provoked a decrease of 26% in  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  consumption efficiency ( $E\text{-NH}_4^+$  of 74%,  $Y\text{-NO}_3^-$  of 1.00) and lastly toluene did not significantly affect the nitrifying process. Thus, when BTX compounds were added at 10 mg C/l, the  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  consumption efficiency decreased according to the following order: benzene > *m*-xylene > toluene. Between 20 and 50 mg C/l of BTX compounds, the sequence of ammonium consumption efficiency decrease changed to *m*-xylene > toluene > benzene. At these higher concentrations, the compound that mostly affected the nitrifying process was *m*-xylene with  $E\text{-NH}_4^+$  of  $11.2 \pm 2.5\%$ , followed by the toluene with  $E\text{-NH}_4^+$  of  $20.0 \pm 7.3\%$  and the benzene with  $E\text{-NH}_4^+$  of  $26.8 \pm 2.5\%$ . In all cases, nitrifying yield was close to 1.0 and nitrite concentration was negligible. These results showed that benzene, toluene, and *m*-xylene significantly decreased the ammonium consumption by the sludge. It was found that this effect depended on the aromatic compound and proceeded according to different general patterns depending on the initial concentration of BTX in the medium.

**Toxic effect of BTX compounds on nitrifying sludge.** Figure 2 shows the behavior of the nitrifying sludge previously exposed for 16 h to different concentrations of BTX compounds. This sludge was washed and newly used in nitrifying batch cultures without BTX in order to evaluate the toxic influence of BTX on the sludge. After 16 h, the sludge exposed to 5 mg C/l of each compound recovered completely its nitrifying activity as the  $\text{NH}_4^+$ -N consumption efficiency was close to 100% and the nitrifying yield for nitrate was close to 1.0. At 10 mg C/l of BTX, the percentage of recovery of the nitrifying activity in the  $\text{NH}_4^+$ -N oxidation was of 100% for toluene, 84% for benzene, and 76% for *m*-xylene. *m*-Xylene was the highest toxic compound. From 20 to 50 mg C/l of toluene and *m*-xylene, there was no recovery of the nitrifying activity, while for benzene, bacteria recovered partially their activity as E- $\text{NH}_4^+$  was comprised between 47% and 81% and average values for Y- $\text{NO}_2^-$  and Y- $\text{NO}_3^-$  were  $0.53 \pm 0.13$  and  $0.39 \pm 0.13$ , respectively. Such results indicated that exposition of cells to benzene (20-50 mg C/l) provoked a decrease not only in the activity of ammonia-oxidizing bacteria by decreasing the  $\text{NH}_4^+$ -N consumption efficiency but also in the activity of nitrite-oxidizing bacteria by decreasing the  $\text{NO}_2^-$ -N oxidation to  $\text{NO}_3^-$ -N. At these higher concentrations (20-50 mg C/l), toxic effect of toluene and *m*-xylene on the nitrifying sludge was higher than benzene effect.

**Nitrification kinetic studies in the presence of BTX.** Kinetic profiles were established for  $\text{NH}_4^+$ -N,  $\text{NO}_2^-$ -N, and  $\text{NO}_3^-$ -N when benzene was present at 6.5, 10, and 20 mg C/l, and toluene and *m*-xylene at 5, 10, and 20 mg C/l. Specific rates of  $\text{NH}_4^+$ -N consumption and  $\text{NO}_3^-$ -N production as well as  $\text{NO}_2^-$ -N accumulation in the medium were calculated and compared with the results obtained in control cultures without BTX compounds (Table 1). The aromatic compounds provoked a significant decrease in the values for nitrification specific rates. The percentages of decrease for specific rates increased with the initial concentrations of BTX and varied from 76 to 99% for  $\text{NH}_4^+$ -N consumption and from 45 to 98% for  $\text{NO}_3^-$ -N production. Except for benzene at 20 mg C/l and comparing with the value obtained in the control culture, the nitrite accumulation in the nitrifying cultures remained very low, indicating that nitrite formation did not increase in the presence of BTX in the cultures. It can be observed that, in all cases, the percentages of decrease in the specific rates of  $\text{NH}_4^+$ -N consumption were higher than those of  $\text{NO}_3^-$ -N production.

Moreover, regarding toluene and *m*-xylene, the values for specific rates of  $\text{NH}_4^+$ -N consumption were similar to those of  $\text{NO}_3^-$ -N production, corroborating the low  $\text{NO}_2^-$ -N accumulation in the cultures. This indicates that the decrease in the specific rates of  $\text{NO}_3^-$ -N production was mainly caused by the decrease in the specific rates of  $\text{NH}_4^+$ -N consumption. These results showed that toluene and *m*-xylene at 5-20 mg C/l and benzene at 10 mg C/l inhibited mainly the activity of the ammonia-oxidizing microorganisms. As shown in Table 1, when BTX were added at 10 mg C/l in the cultures, values for specific rates of  $\text{NH}_4^+$ -N consumption were the same for the three compounds. Whereas at 20 mg C/l of BTX, the specific rates of  $\text{NH}_4^+$ -N consumption decreased by 89% for benzene, 96% for toluene and 99% for *m*-xylene. These results are in agreement with previous observations where it was found that the order of E- $\text{NH}_4^+$  decrease was: *m*-xylene > toluene > benzene for initial concentrations of BTX compounds comprised between 20 and 50 mg C/l (Figure 1).

**BTX compounds transformation in nitrifying cultures.** As previously indicated in this study, possible loss of BTX compounds due to volatilization and adsorption on the sludge was negligible under the batch experimental conditions. Figure 3 shows the consumption kinetics of BTX in the nitrifying cultures at initial concentrations of 6.5 mg C/l for benzene and 5 mg C/l for both toluene and *m*-xylene. It was found that the three compounds disappeared completely from the culture medium over 21 h. In the case of benzene, the second decreasing wave was considered as representative of the main benzene disappearance from the culture and used to estimate the adaptation time and the benzene consumption rate. It can be observed that benzene consumption occurred mainly after an adaptation time of 6 h while the disappearance of both toluene and *m*-xylene was immediate. In addition, specific rates of BTX consumption were (g C/g microbial protein-N.h):  $0.055 \pm 0.001$  for *m*-xylene,  $0.045 \pm 0.003$  for toluene, and  $0.034 \pm 0.003$  for benzene. These results indicate that for initial concentrations below 6.5 mg C/l, toluene and *m*-xylene disappeared faster from the cultures than benzene, which appeared to be the most persistent. Benzene at low concentrations was the highest inhibitory compound on nitrification (Figure 1 and Table 1).

As shown in Figure 4, at 20 mg C/l of benzene, the sludge needed a longer adaptation time (2.3 d) to initiate benzene consumption at  $0.016 \pm 0.002$  g C/g microbial protein-N.h. At 20

mg C/l of toluene and *m*-xylene, the nitrifying consortium presented, after a first removal phase, very long adaptation phases of 6.2 and 8.8 d, respectively, before to achieve toluene and *m*-xylene consumption at  $0.014 \pm 0.003$  and  $0.0016 \pm 0.0001$  g C/g protein-N.h, respectively. Benzene, toluene, and *m*-xylene disappeared completely from the cultures after 4.2, 8.3, and 14.6 d, respectively. The microbial sludge showed a distinct behavior when BTX compounds were present at 20 mg C/l in the cultures than for lower concentrations. When the initial concentrations increased from 5 to 20 mg C/l, the persistence of aromatic compounds in the nitrifying culture increased significantly according to the following order: *m*-xylene > toluene > benzene. These results again coincide with the inhibition order of nitrification observed in the first part of this study for concentrations of BTX comprised between 20 and 50 mg C/l (Figure 1 and Table 1). The inhibitory effect of BTX compounds seemed to be directly related to their persistence and then to the capacity of the sludge to eliminate them from the medium. As previously found for the inhibitory effect, the persistence of BTX compounds not only depends on the type of compound but also on its initial concentration in the medium. At 6.5 mg C/l, benzene was the most persistent of the three compounds while at 20 mg C/l, it was the less one and *m*-xylene the most persistent.

It has been shown in an earlier study that benzene was converted to intermediates by the lithoautotrophic nitrifying consortium (Zepeda *et al.* 2003). Up to a concentration of 10 mg C/l, benzene was first oxidized to phenol, which was later totally oxidized to acetate. To obtain more information on the BTX compounds transformation, the kinetic profiles of toluene and *m*-xylene, and their intermediates were established for an initial concentration of 5 mg C/l (Figures 5 and 6). As shown in Figure 5, the decrease in the toluene concentration was first coupled with the formation of benzyl alcohol. After 3 h, both toluene and benzyl alcohol disappeared progressively from the cultures and, concomitantly, butyrate was produced. 80% of the added toluene (5 mg toluene-C/l) was transformed into butyrate (4 mg butyrate-C/l). Propionate and acetate were detected at low concentrations in the cultures. In the case of *m*-xylene, butyrate and acetate were the final intermediates produced in the 24 h cultures (Figure 6). 80% of the added *m*-xylene (5 mg *m*-xylene-C/l) was converted to both acetate (60%) and butyrate (20%). In control batch cultures without BTX compounds, VFA were not detected in the medium.

## Discussion

Results showed that benzene, toluene, and *m*-xylene significantly inhibited the nitrifying activity of the sludge by decreasing the nitrification specific rates. However, it was found that the nitrifying sludge can tolerate up to 5 mg C/l of BTX by maintaining high the  $\text{NH}_4^+$ -N oxidation efficiency and the nitrifying yield after 16 h of culture. The fact that, at higher concentrations of BTX (10-50 mg C/l), the  $\text{E-NH}_4^+$  decreased while the  $\text{Y-NO}_3^-$  kept close to 1.0 showed that the ammonia oxidation pathway was the most affected by the BTX. It was observed that this inhibitory effect seemed to be related to the persistence of the BTX compounds in the nitrifying cultures. The inhibitory effect and persistence of the BTX depended not only on the aromatic compound and its chemical structure but also on its initial concentration in the medium. Up to an initial concentration of 10 mg C/l, benzene was the most inhibitory and persistent, and from 20 to 50 mg C/l of BTX compounds, the sequence of inhibition and persistence changed to *m*-xylene > toluene > benzene. The concentration and the presence of different functional groups as well as the nature of the substituent can influence the metabolism and toxicity of aromatic compounds (O'Connor and Young 1996). The absence of functional group may confer to benzene higher stability and persistence to biotransformation while the presence of methyl groups may facilitate the mechanisms of biotransformation for toluene and *m*-xylene. This could partly explain why at initial concentrations less than 10 mg C/l, it was in presence of benzene that the acclimation period of nitrifying bacteria to BTX was the highest and the specific rates of both BTX transformation and nitrification were the lowest. However, at higher concentrations (20-50 mg C/l) of BTX, results suggested that the inhibitory effect was more related to the hydrophobicity of the compounds than to their chemical structure. Previous studies reported that many cyclic hydrocarbons are toxic and inhibitory to microorganisms because of their hydrophobic character and their devastating effects on biological membranes (Sikkema *et al.* 1992, Isken and de Bont 1998). Sikkema *et al.* (1994) indicated that the accumulation of cyclic hydrocarbon in the membrane is proportional to the concentration in the aqueous phase and the membrane-aqueous phase partition coefficient. This latter parameter relates directly to the hydrophobicity, expressed by the logarithm of the partition coefficient between octanol and water ( $\log P_{O/W}$ ). Compounds with  $\log P_{O/W}$  values between 1 and 5, such as aromatic solvents, have a high



affinity for membranes. Among the BTX studied in this work, *m*-xylene is the most hydrophobic with a log  $P_{O/W}$  value of 3.0 while for toluene and benzene, log  $P_{O/W}$  are 2.69 and 2.13, respectively (Smallwood 1996). Major accumulation of lipophilic compounds in the membrane may lead to alteration of the membrane structure and function and inhibit the respiratory enzymes activity (Sikkema *et al.* 1995, Denich *et al.* 2003). From 20 to 50 mg C/l of BTX, the inhibitory effect and persistence proceeded according to the general pattern *m*-xylene > toluene > benzene and correlated with the hydrophobic character of the compounds.

Experimental results obtained on toxic effect of BTX on nitrifying sludge are consistent with earlier observations on hydrophobicity and its negative effects on the nitrifying microorganisms. At 10 mg C/l, *m*-xylene appeared more toxic than toluene and benzene. Between 20 and 50 mg C/l of BTX, toxicity was found to be the highest for *m*-xylene and toluene followed by benzene. Literature reported results which indicate that the effects of hydrocarbons on the functioning of biological membranes involve effects on the membrane permeability, lipid and protein components within the lipid bilayer, and the activity of membrane enzymes (Sikkema *et al.* 1994; 1995; Tsitko *et al.* 1999; Heipieper *et al.* 2003). Major cellular and enzymatic damages may lead to longer period for carrying out metabolic adaptation mechanisms and allowing bacteria to recover their activity (Weber and de Bont 1996; Isken *et al.* 1997). Such considerations could explain why bacteria recovered partially their nitrifying activity after being exposed to benzene (20-50 mg C/l) which is the less hydrophobic of the three compounds. In case of *m*-xylene and toluene, the most hydrophobic compounds, the cellular and enzymatic damages appeared more severe because bacteria did not recover their nitrifying activity after 16 h and seemed to need a longer acclimation period. In the same way, at 20 mg C/l of toluene and *m*-xylene, the nitrifying consortium needed very long adaptation times to achieve BTX consumption.

Kinetic study demonstrated that percentages of decrease in the values for nitrification specific rates increased with the initial concentration of BTX in the medium. The specific rate of ammonium consumption was found to be the lowest when nitrifying consortium was exposed to 20 mg C/l of *m*-xylene. Such results might be accounted for by the fact that the extent to which hydrophobic chemicals accumulate in the membrane depends on their concentration in the aqueous phase and their degree of hydrophobicity. Major accumulation of BTX compounds in the membrane might result in both greater alteration

in transport mechanisms of substrates, such as  $\text{NH}_3$ , and greater damages in activity of enzymes, such as AMO and HAO. Thus, this would provoke significant decrease in the values for nitrification specific rates as observed experimentally in this work. Except for benzene at 20 mg C/l, nitrite formation did not increase in the presence of BTX in the cultures, suggesting that these compounds inhibited mainly the activity of the ammonia-oxidizing microorganisms. McCarty (1999) suggested that hydrocarbons could compete with  $\text{NH}_3$  to link with the active site of the AMO. According to Sikkema *et al.* (1994), an important part of the toxicity of hydrocarbons is exerted by effects on the proton motive force. Moreover, Whittaker *et al.* (2000) in their study on electron transfer during the oxidation of  $\text{NH}_3$  by *Nitrosomonas europaea* mentioned the possibility that ammonia oxidation is dependent on a proton gradient and that collapse of the proton gradient might inhibit AMO activity. It is interesting to note that benzene at 20-50 mg C/l appeared to inhibit the activity not only of the ammonia-oxidizing microorganisms but also of the nitrite-oxidizing microorganisms while toluene and *m*-xylene at 5-50 mg C/l seemed to inhibit mainly the activity of the ammonia-oxidizing microorganisms. This difference suggests that, at higher concentrations (20-50 mg C/l), the modes of action of benzene, toluene, and *m*-xylene on nitrifying processes and bacteria are different. These results support the point of view that both membrane changes and enzymes inhibition must be considered to understand the overall inhibition mechanisms in microbial consortia.

Toluene and *m*-xylene were converted to VFA by the lithoautotrophic nitrifying consortium. Various studies performed with *N. europaea* have shown that the AMO was able to oxidize aromatic compounds (Hyman *et al.* 1985; Keener and Arp 1994; Vannelli and Hooper 1995). As it has been previously shown that the AMO oxidized benzene to phenol, then it is likely that benzyl alcohol be an intermediate of toluene oxidation by the AMO (Hyman *et al.* 1985; Keener and Arp 1994; Zepeda *et al.* 2003). It is presumed that *N. europaea* may initiate oxidation of BTX to provide intermediates, such as phenol and benzyl alcohol, which could later be transformed to VFA by other bacteria from the nitrifying consortium. In contrast with results obtained in studies carried out with pure strains, results reported in our work demonstrated that BTX compounds can be transformed to VFA by the nitrifying consortium. It can be considered that the high diversity of microorganisms, enzymatic material and possible metabolic pathways which characterizes microbial consortia could contribute to obtain these results. However, further

work is required in this direction to elucidate the underlying processes involved in the transformation of BTX by nitrifying consortia.

### **Conclusion**

Benzene, *m*-xylene, and toluene at 10 mg C/l decreased the  $\text{NH}_4^+$ -N oxidation efficiency by 57%, 26%, and 0%, respectively, whereas at 5 mg C/l there was no effect. These results suggested that the ammonia oxidation pathway was affected by the BTX. BTX (5-20 mg C/l) induced a significant decrease in the values for specific rates of  $\text{NH}_4^+$ -N consumption (from 76 to 99%) and  $\text{NO}_3^-$ -N production (from 45 to 98%). Initial concentration of BTX in the aqueous phase has an influence not only on the magnitude of the inhibitory effect but also on the inhibition order of the different compounds. When BTX compounds were provided at 10 mg C/l, the following inhibition sequence was obtained: benzene > *m*-xylene > toluene while between 20 and 50 mg C/l, it changed to *m*-xylene > toluene > benzene. Similarly, and as shown by kinetic data for BTX disappearance, the persistence of BTX compounds in the nitrifying cultures proceeded according to the same general pattern in function of the initial concentration of chemicals in the medium. At 5 mg C/l of BTX compounds, there was no toxic effect on the sludge whereas from 10 to 50 mg C/l, bacteria did not totally recover their nitrifying activity. Results indicated that mechanisms involved in the inhibition of nitrification processes by BTX compounds depend on various factors, such as the initial concentration, the chemical structure, and the hydrophobic character of the pollutants. At low concentrations ( $\leq 10$  mg C/l), the chemical structure of the BTX compounds appeared to be the predominant factor when at higher concentrations (20-50 mg C/l), their hydrophobicity played an important role.

At a concentration of 5 mg C/l, toluene was first oxidized to benzyl alcohol, which was later oxidized to butyrate while *m*-xylene was oxidized to both acetate and butyrate. These results confirmed that the lithoautotrophic nitrifying consortium is able to convert benzene, toluene, and *m*-xylene to VFA and that this type of nitrifying consortium coupled with a denitrification system may have promising applications for complete removal of both nitrogen and BTX compounds from wastewater streams into  $\text{N}_2$  and  $\text{CO}_2$ .

### **Acknowledgement**

This research was supported by CONACYT (400200-5-33668-U, 160302).

## References

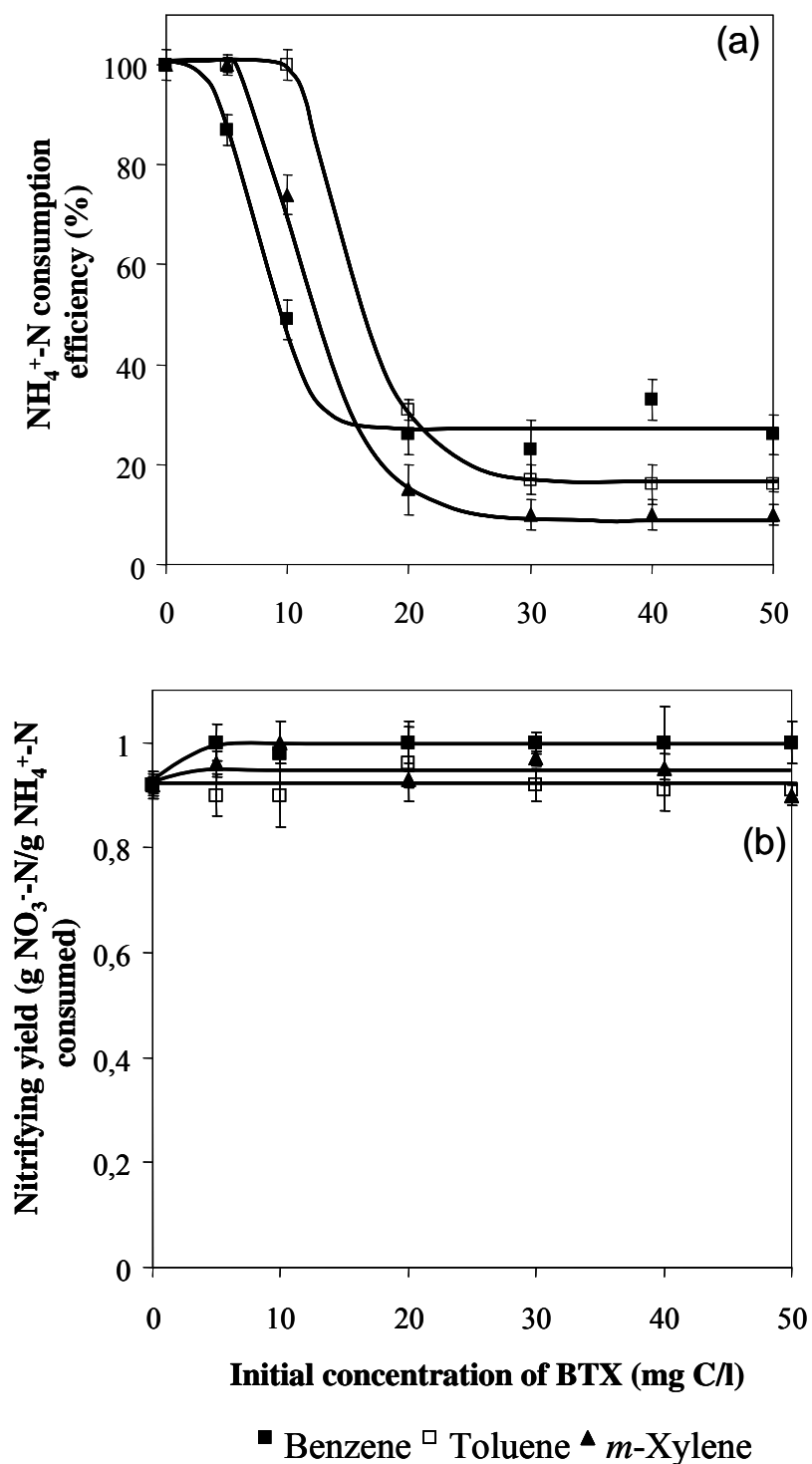
- Arp, D. J., Sayavedra-Soto, L. A., and Hommes, N. G.** 2002. Molecular biology and biochemistry of ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea*. *Arch. Microbiol.* **178**:250-255.
- Brandt, K. K., Hesselsoe, M., Roslev, P., Henriksen, K., and Sorensen, J.** 2001. Toxic effects of linear alkylbenzene sulfonate on metabolic activity, growth rate, and microcolony formation of *Nitrosomonas* and *Nitrospira* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:2489-2498.
- Denich, T. J., Beaudette, L. A., Lee, H., and Trevors, J. T.** 2003. Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes. *J. Microbiol. Methods.* **52**:149-182.
- Duddlestone, K. M., Arp, D. J., and Bottomley, P. J.** 2002. Biodegradation of monohalogenated alkanes by soil NH<sub>3</sub>-oxidizing bacteria. **59**:535-539.
- Heipieper, H. J., Meinhardt, F., and Segura, A.** 2003. The *cis-trans* isomerase of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas* and *Vibrio*: biochemistry, molecular biology and physiological function of a unique stress adaptive mechanism. *FEMS Microbiol. Lett.* **229**:1-7.
- Hollocher, T. C., Tate, M. E., and Nicholas, D. J. D.** 1981. Oxidation of ammonia by *Nitrosomonas europaea*: definitive <sup>18</sup>O-tracer evidence that hydroxylamine formation involves a monooxygenase. *J. Biol. Chem.* **256**:10834-10836.
- Hyman, M. R., Sansome-Smith A. W., Shears, J. H., and Wood, P. M.** 1985. A kinetic study of benzene oxidation to phenol by whole cells of *Nitrosomonas europaea* and evidence for the further oxidation of phenol to hydroquinone. *Arch. Microbiol.* **143**:302-306.
- Igarashi, N., Moriyama, N., Fujiwara, T., Fukumori, Y., and Tanaka, N.** 1997. The 2.8<sup>Å</sup> structure of hydroxylamine oxidoreductase from a nitrifying chemoautotrophic bacteria *Nitrosomonas europaea*. *Nat. Struct. Biol.* **4**:276-284.
- Isken, S., and de Bont, J. A. M.** 1998. Bacteria tolerant to organic solvents. *Extremophiles.* **2**:229-238.
- Isken, S., Santos, P. M. A. C., and de Bont, J. A. M.** 1997. Effect of solvent adaptation on the antibiotic resistance in *Pseudomonas putida* S12. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**:642-647.

- Keener, W. K., and Arp, D. J.** 1993. Kinetic studies of ammonia monooxygenase inhibition in *Nitrosomonas europaea* by hydrocarbons and halogenated hydrocarbons in an optimized whole-cell assay. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:2501-2510.
- Keener, W. K., and Arp, D. J.** 1994. Transformations of aromatic compounds by *Nitrosomonas europaea*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:1914-1920.
- McCarty, G. W.** 1999. Review article: Modes of action of nitrification inhibitors. *Biology and Fertility of Soils.* **29**:1-9.
- O'Connor, O. W., and Young, L. Y.** 1996. Effects of six different functional groups and their position on the bacterial metabolism of monosubstituted phenols under anaerobic conditions. *Environ. Sci. Technol.* **30**:1419-1428.
- Prosser, J. I.** 1989. Autotrophic nitrification in bacteria. *Adv. Microbiol. Physiol.* **30**:125-181.
- Sikkema, J., de Bont, J. A. M., and Poolman, B.** 1994. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J. Biol. Chemistry.* **11**:8022-8028.
- Sikkema, J., de Bont, J. A. M., and Poolman, B.** 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews.* **59**:201-222.
- Sikkema, J., Poolman, B., Konings, W. N., and de Bont, J. A. M.** 1992. Effects of the membrane action of tetralin on the functional and structural properties of artificial and bacterial membranes. *J. Bacteriol.* **174**:2986-2992.
- Smallwood, I. M.** 1996. Handbook of organic solvent properties. Edit. Arnold. Great Britain, London, pag.35-47.
- Sundermeyer-Klinger, H., Meyer, W., Warninghoff, B., and Bock, E.** 1984. Membrane-bound nitrite oxidoreductase of *Nitrobacter*: evidence for a nitrate reductase system. *Arch. Microbiol.* **140**:153-158.
- Texier, A. -C., and Gomez, J.** 2002. Tolerance of nitrifying sludge to *p*-cresol. *Biotechnol. Lett.* **24**:321-324.
- Tsitko, I. V., Zaitsev, G. M., Lobanok, A. G., and Salkinoja-Solonen, M. S.** 1999. Effect of aromatic compounds on cellular fatty acid composition of *Rhodococcus opacus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:853-855.
- Vannelli, T., and Hooper, A. B.** 1995. NIH shift in the hydroxylation of aromatic compounds by the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*. Evidence against an arene oxide intermediate. *Biochemistry.* **34**:11743-11749.

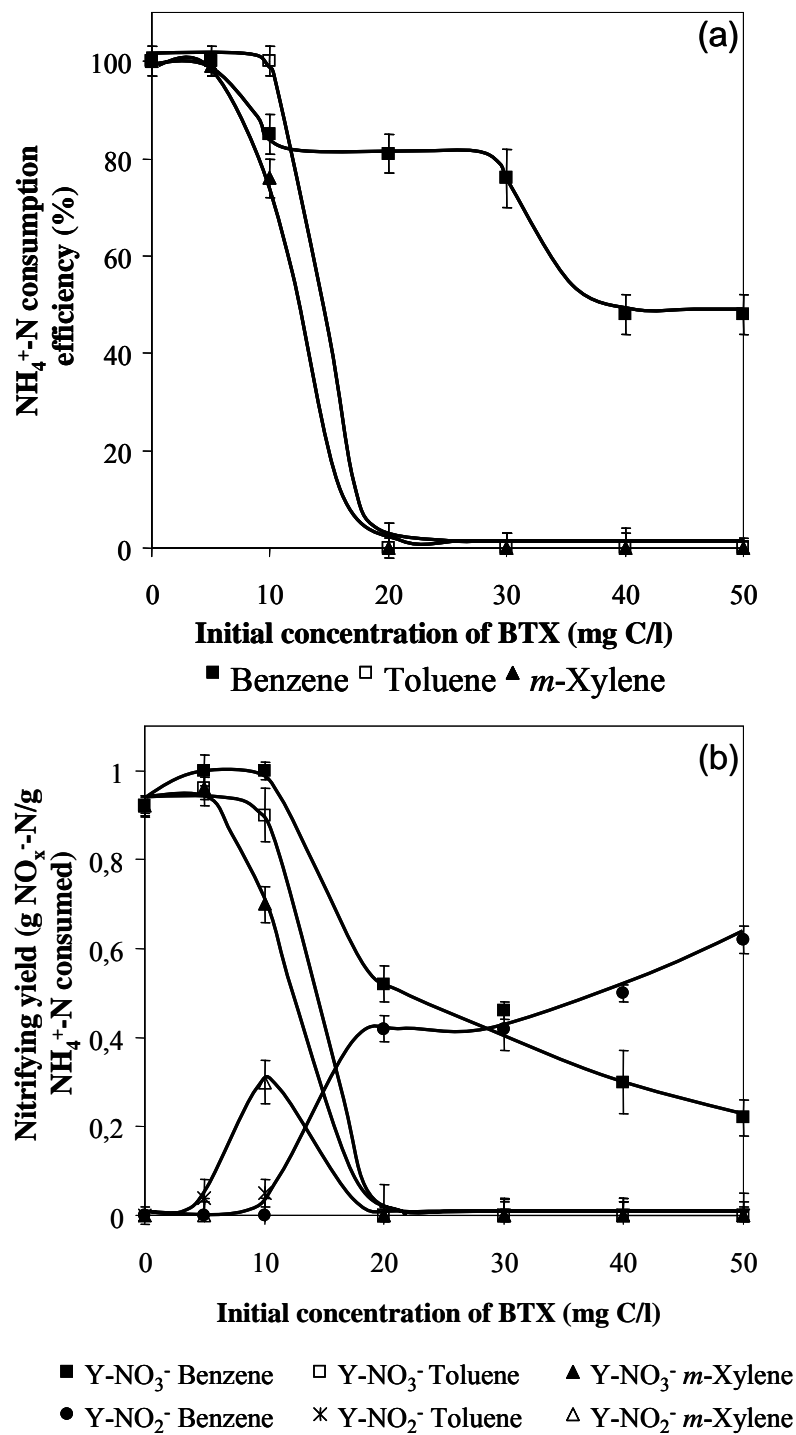
**Weber, F. J., and de Bont, J. A. M.** 1996. Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* **1286**:225-245.

**Whittaker, M., Bergmann, D., Arciero, D., and Hooper, A. B.** 2000. Electron transfer during the oxidation of ammonia by the chemolithotrophic bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1459**:346-355.

**Zepeda, A., Texier, A.-C., and Gomez, J.** 2003. Benzene transformation in nitrifying batch cultures. *Biotechnol. Prog.* **19**:789-793.

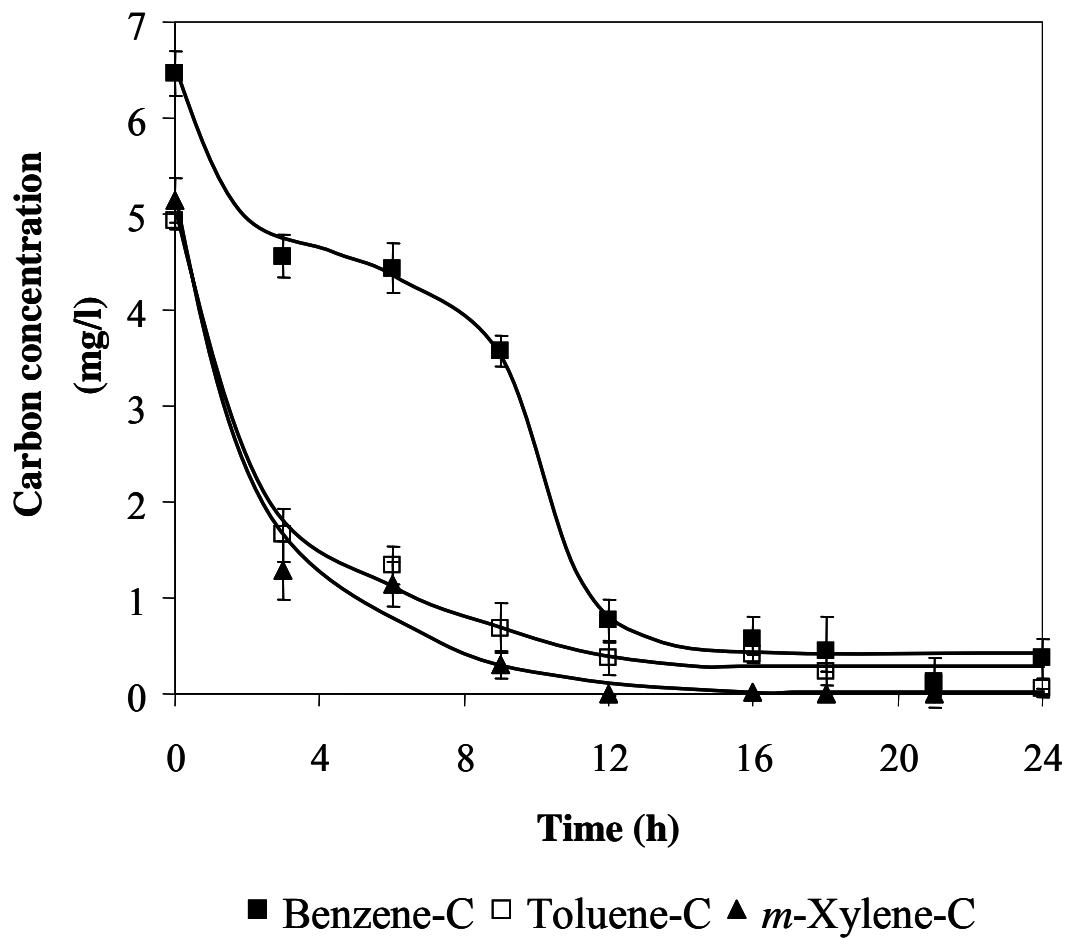


**Figure 1.** Effect of initial concentration for benzene, toluene, and m-xylene on the nitrifying activity. Each point was determined after 16 h. (a) Effect on NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N consumption efficiency, (b) Effect on nitrifying yield.

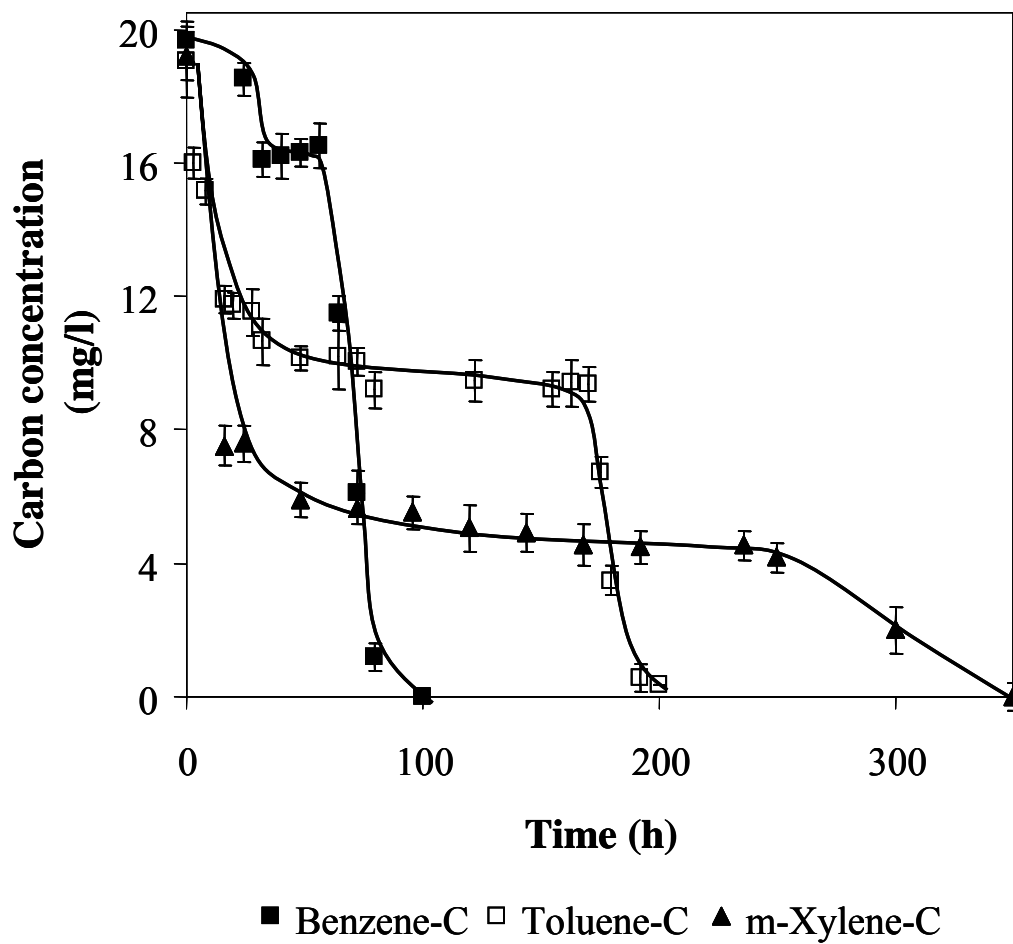


**Figure 2.** Toxic effect of benzene, toluene, and *m*-xylene on the nitrifying sludge. Each inoculum previously exposed to different concentrations of BTX compounds for 16 h was reused in batch cultures without BTX compounds. (a) Effect on NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N consumption efficiency, (b) Effect on nitrifying yield.

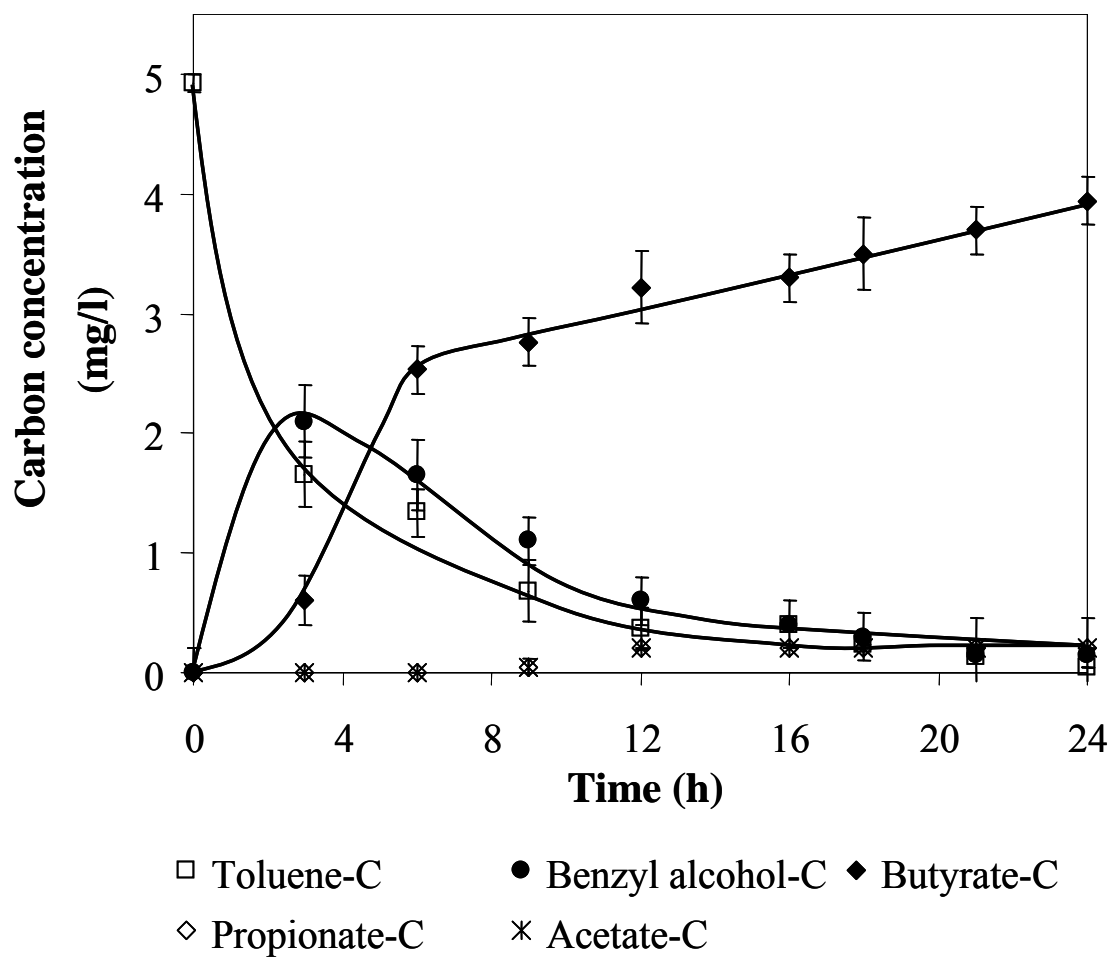




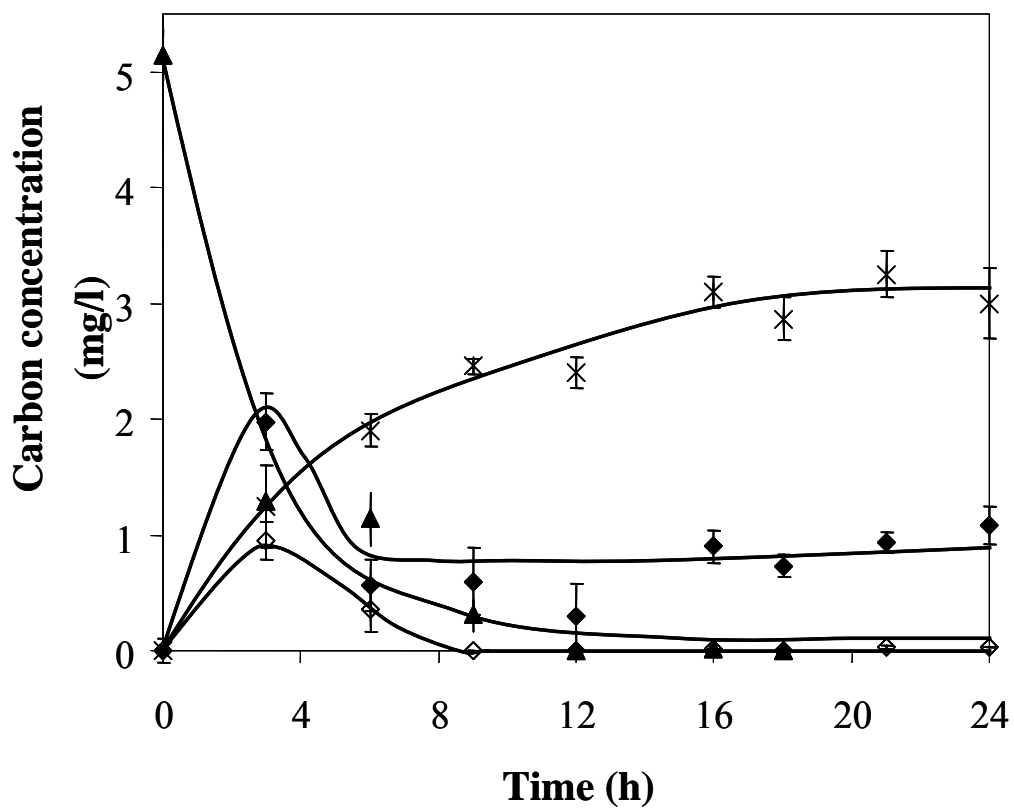
**Figure 3.** Removal kinetics of BTX compounds in nitrifying cultures at initial concentrations of 6.5 mg C/l for benzene and 5 mg C/l for toluene and *m*-xylene.



**Figure 4.** Removal kinetics of BTX compounds in nitrifying cultures for an initial concentration of 20 mg C/l.



**Figure 5.** Kinetic profiles of the toluene transformation in a nitrifying culture for an initial concentration of 5 mg toluene-C/l.



▲ *m*-Xylene-C ◆ Butyrate-C ◇ Propionate-C \* Acetate-C

**Figure 6.** Kinetic profiles of the *m*-xylene transformation in a nitrifying culture for an initial concentration of 5 mg *m*-xylene-C/l.

**Table 1.** Nitrification specific rates and nitrite accumulation in the nitrifying cultures in the absence and presence of BTX compounds.

	Initial concentrations (mg C/l)	Specific rates (g N/g microbial protein-N.h)		NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N accumulation (mg/l)
		NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N consumption	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N production	
Control	0	1.389 ± 0.079	0.577 ± 0.030	346
Benzene	6.5	0.266 ± 0.008 (- 81%) *	0.306 ± 0.024 (- 47%)	69
	10	0.226 ± 0.009 (- 84%)	0.141 ± 0.010 (- 76%)	75
	20	0.155 ± 0.004 (- 89%)	0.090 ± 0.003 (- 84%)	1350
Toluene	5	0.317 ± 0.012 (- 77%)	0.310 ± 0.007 (- 46%)	125
	10	0.225 ± 0.006 (- 84%)	0.221 ± 0.004 (- 62%)	44
	20	0.054 ± 0.004 (- 96%)	0.047 ± 0.007 (- 92%)	133
<i>m</i> -Xylene	5	0.328 ± 0.002 (- 76%)	0.320 ± 0.002 (- 45%)	96
	10	0.219 ± 0.009 (- 84%)	0.201 ± 0.020 (- 65%)	69
	20	0.010 ± 0.002 (- 99%)	0.009 ± 0.001 (- 98%)	192

\* Percentages of decrease for nitrification specific rates were calculated by using the values obtained in the control culture as references.

### Figure legends

**Figure 1.** Effect of initial concentration for benzene, toluene, and *m*-xylene on the nitrifying activity. Each point was determined after 16 h. (a) Effect on  $\text{NH}_4^+$ -N consumption efficiency, (b) Effect on nitrifying yield.

**Figure 2.** Toxic effect of benzene, toluene, and *m*-xylene on the nitrifying sludge. Each inoculum previously exposed to different concentrations of BTX compounds for 16 h was reused in batch cultures without BTX compounds. (a) Effect on  $\text{NH}_4^+$ -N consumption efficiency, (b) Effect on nitrifying yield.

**Figure 3.** Removal kinetics of BTX compounds in nitrifying cultures at initial concentrations of 6.5 mg C/l for benzene and 5 mg C/l for toluene and *m*-xylene.

**Figure 4.** Removal kinetics of BTX compounds in nitrifying cultures for an initial concentration of 20 mg C/l.

**Figure 5.** Kinetic profiles of the toluene transformation in a nitrifying culture for an initial concentration of 5 mg toluene-C/l.

**Figure 6.** Kinetic profiles of the *m*-xylene transformation in a nitrifying culture for an initial concentration of 5 mg *m*-xylene-C/l.

**Table 1.** Nitrification specific rates and nitrite accumulation in the nitrifying cultures in the absence and presence of BTX compounds.

## ANEXO III

### **Batch nitrifying cultures in presence of mixtures of benzene, toluene, and *m*-xylene**

A. Zepeda, A. -C. Texier\* & J. Gomez

Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa, Div. CBS, Depto de Biotecnología, Av. San Rafael Atlixco 186, C.P. 09340, México D.F.

\* Author for correspondence (Fax: +52 55 58046407; E-mail: actx@xanum.uam.mx).

#### **Abstract**

Benzene, toluene, and *m*-xylene compounds in individual ( $5.0 \pm 0.5$  mg C/l) and mixed solutions ( $2.5 \pm 0.2$  mg C/l for each one) in nitrifying batch cultures induced a decrease in the specific rates of  $\text{NH}_4^+$  consumption ( $81 \pm 6\%$ ) and  $\text{NO}_3^-$  production (39-79%). After 24 h, 50% of the mixed compounds was converted to acetate. The following order of biotransformation was found: *m*-xylene > toluene > benzene. Transformation rate of *m*-xylene was  $0.051 \pm 0.005$  g C/g protein-N.h in individual and mixed solutions. When *m*-xylene was added, benzene was oxidized at a faster rate ( $0.051 \pm 0.005$  g C/g protein-N.h) while toluene at a slower rate ( $0.012 \pm 0.002$  g C/g protein-N.h).

**Key words:** benzene, kinetics, nitrification, toluene, *m*-xylene

## Introduction

Nitrification followed by denitrification is a widely used process for biological nitrogen removal from effluents. Nitrification is the process of oxidation of  $\text{NH}_3$  to  $\text{NO}_2^-$  and  $\text{NO}_3^-$  by lithoautotrophic ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria (Prosser 1989). The nitrifying bacteria are sensitive to the presence of organic compounds (Pantea-Kiser *et al.* 1990, Texier & Gomez 2002). Benzene, toluene, and xylenes (BTX) are organic compounds which have been found as contaminants in groundwater, soils and atmosphere. Because of their toxicity, they have been classified as priority pollutants by the Environmental Protection Agency (Yadav & Reddy 1993). Biodegradation of BTX compounds by heterotrophic bacteria has been reported (Chang *et al.* 1993, Elmén *et al.* 1997, Chang *et al.* 2001). However, very little is known about the inhibitory influence of these compounds on lithoautotrophic nitrifying microorganisms. It has been reported that benzene significantly inhibited the nitrifying activity of a sludge produced in steady-state nitrification as the  $\text{NH}_4^+$ -N oxidation to  $\text{NO}_3^-$ -N decreased (Zepeda *et al.* 2003).

Many studies on the degradation of multiple substrates have revealed a number of substrate interaction patterns including no interaction, inhibition, induction, cometabolism (Chang *et al.* 1993, Deeb & Alvarez-Cohen 1999). In general, these investigations focused on the heterotrophic biodegradation of hydrocarbons coupled with cell growth and employed biomass previously acclimatized to BTX compounds. Nevertheless, little is known on the interactions between different BTX compounds during their biotransformation by nitrifying bacteria.

The aim of this study was to evaluate in batch cultures the effect of benzene, toluene, and *m*-xylene in individual and mixed solutions on a nitrifying sludge produced in steady-state nitrification. Kinetic profiles were established for  $\text{NH}_4^+$ -N,  $\text{NO}_2^-$ -N,  $\text{NO}_3^-$ -N, and BTX compounds, and the specific rates were calculated. The biotransformation of BTX compounds and the potential component interactions caused by the concurrent presence of multiple BTX compounds in the nitrifying batch cultures were investigated.



## **Materials and methods**

### *Inoculum and culture medium composition*

The sludge used for inoculating batch reactors was obtained from a continuous stirred nitrifying culture. Steady-state operating conditions of the continuous reactor and composition of the culture media used for continuous and batch cultures were previously described by Zepeda *et al.* (2003).

### *Batch cultures*

All experiments were performed in 120 ml serum bottles. Oxygen was bubbled through 50 ml of medium used for batch cultures for 5 min. After inoculation, the bottles were sealed with rubber caps and aluminum rings. The initial microbial protein and  $\text{NH}_4^+$ -N concentrations were  $150 \pm 10$  mg/l and  $100 \pm 10$  mg/l, respectively. Oxygen was again injected for 5 min into the bottle's 70 ml headspace. Benzene, toluene, and *m*-xylene were added to the microbial suspension using a 10  $\mu\text{l}$  syringe to fix the initial concentration at  $5.0 \pm 0.5$  mg C/l for individual solutions and  $2.5 \pm 0.2$  mg C/l for each compound of the mixtures. The following mixtures were prepared: benzene-toluene (BT), benzene-*m*-xylene (BX), toluene-*m*-xylene (TX), and benzene-toluene-*m*-xylene (BTX). The cultures were shaken at 200 rpm at 30°C. The initial pH value was 8.5. For kinetic studies, culture samples were withdrawn at different times through 24 h and filtered (0.45  $\mu\text{m}$ ) for analysis of ammonia, nitrite, nitrate, and BTX compounds. The volumetric rates of  $\text{NH}_4^+$ -N consumption and  $\text{NO}_3^-$ -N production were estimated from the kinetic curves and expressed as mg N/L.h. With the microbial protein concentration known and assuming that 16% of total microbial protein is nitrogen, the nitrification specific rates were calculated and expressed as g N/g microbial protein-N.h. The specific rates of BTX compounds disappearance were estimated by using the same calculation method and adjusted by considering the possible differences between the controls data. All batch cultures were carried out in triplicate. Possible loss of BTX compounds due to volatilization and adsorption on bacterial sludge was monitored by using abiotic and sterile controls.

### *Analytical methods*

Concentrations of BTX compounds (headspace and liquid phases) and acetate in the bottles were analyzed by gas chromatography (Varian Star model 3400) using a flame ionization detector. HPLC was also used to measure the BTX compounds and their possible intermediates formed during the cultures. Nitrite and nitrate were analyzed by capillary electrophoresis (Waters Capillary Ion Analyzer). Ammonium nitrogen was analyzed by a selective electrode (Phoenix Electrode Co., USA). Lowry's method was employed to measure microbial protein concentration. All analytical methods formerly mentioned were previously detailed by Zepeda *et al.* (2003). Analytical methods had a variation coefficient less than 10%.

### **Results and discussion**

#### *Nitrification kinetic studies in the presence of mixtures of benzene, toluene, and m-xylene*

First, it was verified that the nitrification process in the continuous culture used for inoculating batch reactors kept in steady-state with an ammonium consumption efficiency close to 100% and a conversion of consumed  $\text{NH}_4^+$ -N to  $\text{NO}_3^-$ -N of 98% (Zepeda *et al.* 2003).

Tests with abiotic blanks were conducted before evaluating the effect of BTX compounds on the nitrifying sludge to ensure that any possible loss of BTX compounds from the bottles due to volatilization was negligible. Under these conditions, the ratio of BTX concentration in the headspace and liquid phase showed constant values of 20% and 80%, respectively, indicating that there was no loss of BTX. Control nitrifying cultures without BTX compounds showed that the nitrification process proceeded successfully under batch experimental conditions. After 16 h, a high  $\text{NH}_4^+$ -N consumption efficiency (100%) coupled with a high conversion of ammonium to nitrate (91%) was attained and nitrite concentration remained negligible.

Kinetic profiles were established for  $\text{NH}_4^+$ -N,  $\text{NO}_2^-$ -N, and  $\text{NO}_3^-$ -N when benzene, toluene, and *m*-xylene were present in single solutions and binary and ternary mixtures in the batch cultures. Specific rates of  $\text{NH}_4^+$ -N consumption and  $\text{NO}_3^-$ -N production were calculated and compared with the results obtained in control cultures without BTX compounds (Table 1). BT, BX, TX, and BTX mixtures provoked a significant decrease in the values for nitrification specific rates with percentages of decrease of 72, 86, 85, and 90% for  $\text{NH}_4^+$ -N consumption and 39, 65, 70, and 79% for  $\text{NO}_3^-$ -N production, respectively. In individual solutions, the

percentages of decrease for specific rates were  $78 \pm 2\%$  for  $\text{NH}_4^+$ -N consumption and  $46 \pm 1\%$  for  $\text{NO}_3^-$ -N production while they were  $83 \pm 8\%$  for  $\text{NH}_4^+$ -N consumption and  $63 \pm 17\%$  for  $\text{NO}_3^-$ -N production when BTX were mixed. Results suggested that, in general, the inhibitory effect of BTX compounds on the nitrifying process was higher when they were present in mixtures than in individual solutions. In all cases, after 24 h of culture, ammonium consumption efficiency and conversion of consumed  $\text{NH}_4^+$ -N into  $\text{NO}_3^-$ -N were close to 100% and there was no significant accumulation of nitrite in the medium. It can also be observed that the percentages of decrease in the specific rates of  $\text{NH}_4^+$ -N consumption were higher than those of  $\text{NO}_3^-$ -N production. These results suggested that benzene, toluene, and *m*-xylene in individual and mixed solutions inhibited significantly the activity of the ammonia-oxidizing bacteria. According to McCarty (1999), some hydrocarbons could compete with the ammonia to link with the active site of the enzyme ammonia monooxygenase. This enzyme is believed to be responsible for the  $\text{NH}_3$  oxidation to hydroxylamine in *Nitrosomonas europaea* cultures (Arp *et al.* 2002).

#### *BTX compounds transformation in nitrifying cultures*

First, it was verified that possible loss of BTX compounds due to adsorption on the sludge was negligible under the batch experimental conditions. The consumption kinetics of binary and ternary mixtures of BTX compounds were established in the nitrifying batch cultures (Figure 1 and 2). It was found that the three compounds in binary and ternary mixtures disappeared completely from the culture medium over 24 h. After this time, no aromatic intermediate was detected by HPLC in the cultures and around 50% of the BTX compounds ( $5.0 \pm 0.5$  mg C/l) was converted to acetate ( $2.4 \pm 0.5$  mg C/l). These results confirmed that the lithoautotrophic nitrifying consortium was able to transform BTX compounds, as previously reported for benzene by Zepeda *et al.* (2003).

Table 2 presented the specific rates of consumption for benzene, toluene, and *m*-xylene in individual, binary, and ternary solutions. Individually, *m*-xylene was transformed fastest, followed by toluene, and benzene. In binary and ternary mixtures, transformation of BTX compounds followed the same order: *m*-xylene > toluene > benzene. The absence of functional group may confer to benzene higher stability while the presence of methyl groups may

promote the mechanisms of biotransformation for toluene and *m*-xylene (O'Connor & Young 1996). No significant difference was observed in the consumption rates of *m*-xylene between the cultures that contained *m*-xylene alone and those that contained benzene and/or toluene with an average specific rate of  $0.051 \pm 0.005$  g *m*-xylene-C/g protein-N.h. However, results demonstrated differences in the specific rates of transformation for toluene and benzene in single and mixed component experiments. Thus, both positive and negative component interactions were observed. When *m*-xylene was present, benzene was oxidized at a faster rate (+ 50%) than in individual solution while toluene was oxidized at a slower rate (- 73%). The presence of *m*-xylene in binary mixtures had different effect on the rate of transformation of benzene and toluene. The presence of toluene with benzene in binary mixtures had a negative effect on benzene transformation rate (- 85%) while toluene transformation rate was enhanced in the presence of benzene (+ 22%).

The results revealed various component interactions in the biotransformation of mixed BTX compounds in nitrifying cultures, including simultaneous transformation, no interaction, inhibition and enhancement effects. These interactions were found to be different from those previously reported in the literature. For example, the fact that *m*-xylene was transformed the fastest among the BTX compounds is not consistent with that previously reported (Alvarez & Vogel 1991, Deeb & Alvarez-Cohen 1999). However, these investigations are not strictly comparable with our work, as they were conducted to evaluate the substrate interactions during the biodegradation of BTX compounds by microbial isolates and consortium which were previously acclimatized to BTX compounds. The use of distinct microorganisms implicates different interactions between mixed compounds. The results reported in our study were obtained from a nitrifying consortium in steady-state nitrification without previous acclimatization to aromatic compounds. Further work is required to understand the different BTX interactions in nitrifying cultures.

## Conclusions

In nitrifying cultures, binary and ternary mixtures of benzene, toluene, and *m*-xylene provoked a significant decrease in the values of specific rates for  $\text{NH}_4^+$ -N consumption (from 72 to 90%) and  $\text{NO}_3^-$ -N production (from 39 to 79%). The inhibitory effect of BTX compounds on the nitrifying process seemed to be higher when they were present in mixtures than individually. In all cases, after 24 h of culture, both ammonium consumption efficiency and conversion rate of  $\text{NH}_4^+$ -N to  $\text{NO}_3^-$ -N were close to 100%. In mixtures, after 24 h, no aromatic compound was detected in the cultures and around 50% of the BTX compounds ( $5.0 \pm 0.5$  mg C/l) was converted to acetate ( $2.4 \pm 0.5$  mg C/l). These results suggest that this type of consortium coupled with a denitrification process may have promising applications for complete removal of nitrogen and mixed BTX compounds from wastewaters.

Individually as in BTX mixtures, the nitrifying consortium presented the following sequence of biotransformation: *m*-xylene > toluene > benzene. However, in mixtures, significant differences in the values for specific rates of BTX compounds removal were found. These results revealed several component interactions in the biotransformation of mixed benzene, toluene, and *m*-xylene by the nitrifying sludge produced in steady-state nitrification. These interactions included simultaneous transformation, no interaction, and inhibition and enhancement effects. This work emphasizes the importance for considering the possible component interactions in the biotransformation of mixed BTX compounds in nitrification systems.

## Acknowledgement

This research was supported by CONACYT (400200-5-33668-U. 160302).

## References

- Alvarez PJ, Vogel TM (1991) Substrate interactions of benzene, toluene, and *para*-xylene during microbial degradation by pure cultures and mixed culture aquifer slurries. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (10): 2981-2985.
- Arp DJ, Sayavedra-Soto LA, Hommes NG (2002) Molecular biology and biochemistry of ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea*. *Arch. Microbiol.* 178: 250-255.
- Chang MK, Voice TC, Criddle CS (1993) Kinetics of competitive inhibition and cometabolism in the biodegradation of benzene, toluene, and *p*-xylene by two *Pseudomonas* isolates. *Biotechnol. Bioeng.* 41 (11): 1057-1065.
- Chang SW, La HJ, Lee SJ (2001) Microbial degradation of benzene, toluene, ethylbenzene and xylene isomers (BTEX) contaminated groundwater in Korea. *Water Sci. Tech.* 44 (7): 165-171.
- Deeb RA, Alvarez-Cohen L (1999) Temperature effects and substrate interactions during the aerobic biotransformation of BTEX mixtures by toluene-enriched consortia and *Rhodococcus rhodochromus*. *Biotechnol. Bioeng.* 62 (5): 526-536.
- Elmén J, Pan W, Leung SY, Magyarosy A, Keasling JD (1997) Kinetics of toluene degradation by a nitrate-reducing bacterium isolated from a groundwater aquifer. *Biotechnol. Bioeng.* 55 (1): 82-90.
- McCarty GW (1999) Review article: Modes of action of nitrification inhibitors. *Biol. Fertil. Soils* 29: 1-9.
- O'Connor OW, Young LY (1996) Effects of six different functional groups and their position on the bacterial metabolism of monosubstituted phenols under anaerobic conditions. *Environ. Sci. Technol.* 30: 1419-1428.
- Pantea-Kiser L, Wukasz RF, Alleman JE (1990) Effect of inhibitory compounds on biological nitrification. *Proceedings of the 44<sup>th</sup> Purdue Industrial Waste Conference*, Purdue University, West Lafayette, CRC Press: Boca Raton, FL, May 9-11 1989; pp. 465-474.
- Prosser JI (1989) Autotrophic nitrification in bacteria. *Adv. Microbiol. Physiol.* 30: 125-181.
- Texier A-C, Gomez J (2002) Tolerance of nitrifying sludge to *p*-cresol. *Biotechnol. Lett.* 24: 321-324.

Yadav JS, Reddy CA (1993) Degradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes (BTEX) by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 756-762.

Zepeda A, Texier A-C, Gomez J (2003) Benzene transformation in nitrifying batch cultures. *Biotechnol. Prog.* 19 (3): 789-793.

### **Table captions**

*Table 1.* Specific rates of the nitrification cultures in the absence (control) and presence of benzene, toluene, and *m*-xylene at  $5.0 \pm 0.5$  mg C/l for single solutions and  $2.5 \pm 0.2$  mg C/l for each compound of the mixtures.

*Table 2.* Specific rates of biotransformation for benzene, toluene, and *m*-xylene in individual, binary, and ternary solutions in nitrifying cultures.



Table 1. Specific rates of the nitrification cultures in the absence (control) and presence of benzene, toluene, and *m*-xylene at  $5.0 \pm 0.5$  mg C/l for single solutions and  $2.5 \pm 0.2$  mg C/l for each compound of the mixtures.

	Specific rates			
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N consumption		NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N production	
	g N/g protein-N.h	Decrease (%)*	g N/g protein-N.h	Decrease (%)*
<b>Control</b>	1.389 ± 0.079	-	0.577 ± 0.030	-
<b>Single solutions</b>				
Benzene	0.266 ± 0.008	81	0.306 ± 0.024	47
Toluene	0.317 ± 0.012	77	0.310 ± 0.007	46
<i>m</i> -Xylene	0.328 ± 0.002	76	0.320 ± 0.002	45
<b>Mixed solutions**</b>				
BT	0.389 ± 0.002	72	0.352 ± 0.006	39
BX	0.194 ± 0.003	86	0.202 ± 0.006	65
TX	0.208 ± 0.007	85	0.173 ± 0.002	70
BTX	0.139 ± 0.012	90	0.121 ± 0.012	79

Notes: \*Percentages of decrease for nitrification specific rates were calculated by using the values obtained in the control culture without BTX compounds as references. \*\*BT, Benzene-Toluene; BX, Benzene-*m*-Xylene; TX, Toluene-*m*-Xylene; BTX, Benzene-Toluene-*m*-Xylene.

Table 2. Specific rates of biotransformation for benzene, toluene, and *m*-xylene in individual, binary, and ternary solutions in nitrifying cultures.

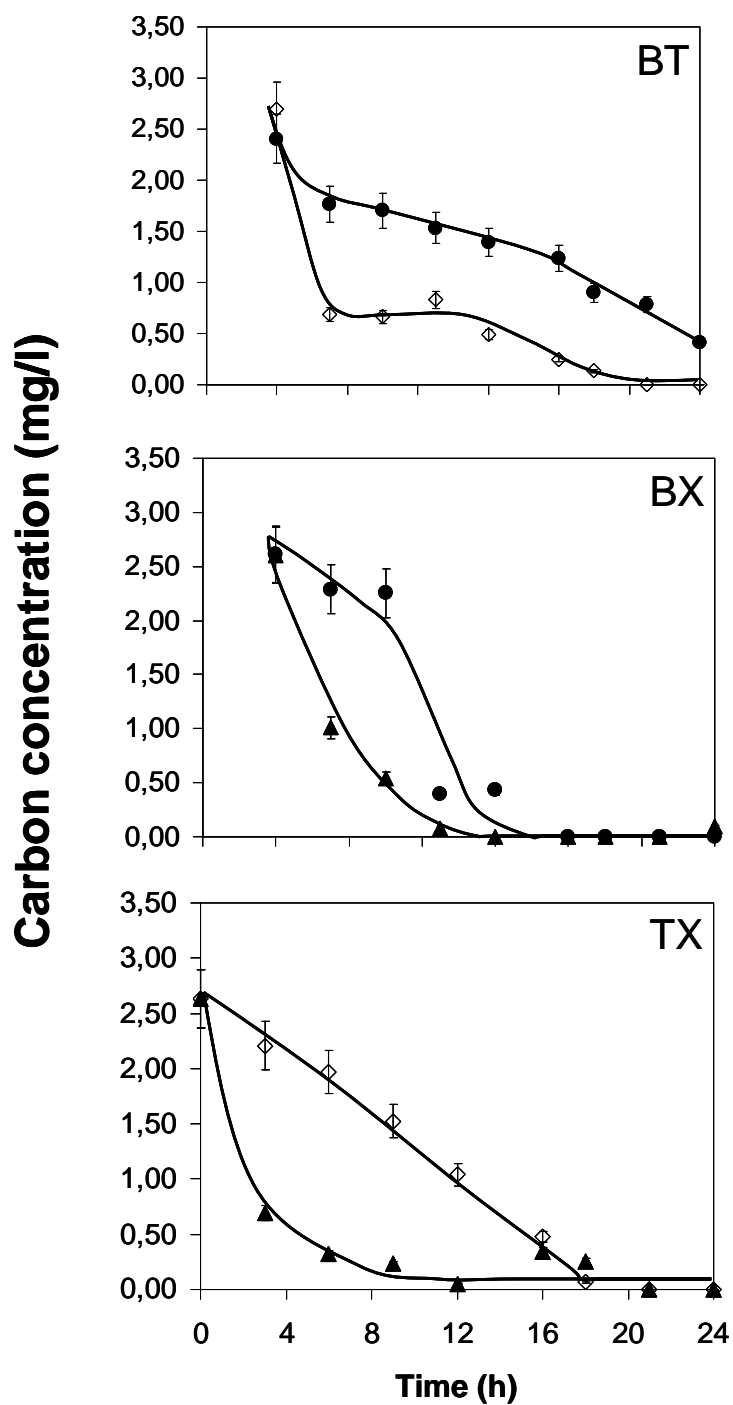
	<b>Specific rates</b> <b>(g C/g microbial protein-N.h)</b>
<b>Individual solutions*</b>	
Benzene	0.034 ± 0.003
Toluene	0.045 ± 0.003
<i>m</i> -Xylene	0.055 ± 0.001
<b>Binary mixtures**</b>	
Benzene	0.005 ± 0.001
Toluene	0.055 ± 0.005
Benzene	0.051 ± 0.005
<i>m</i> -Xylene	0.044 ± 0.005
Toluene	0.012 ± 0.002
<i>m</i> -Xylene	0.053 ± 0.005
<b>Ternary mixtures**</b>	
Benzene	0.017 ± 0.002
Toluene	0.039 ± 0.004
<i>m</i> -Xylene	0.050 ± 0.005

Notes: \*The initial concentration of BTX compounds in individual solutions was 5.0 ± 0.5 mg C/l. \*\*The initial concentration for each BTX compound of the mixtures was 2.5 ± 0.2 mg C/l.

### Figure captions

*Fig.1.* Consumption profiles of binary mixtures of benzene (B), toluene (T), and *m*-xylene (X) in nitrifying cultures at an initial concentration of  $2.5 \pm 0.2$  mg C/l for each compound.

*Fig. 2.* Consumption profiles of ternary mixtures of benzene (B), toluene (T), and *m*-xylene (X) in nitrifying cultures at an initial concentration of  $2.5 \pm 0.2$  mg C/l for each compound.



● Benzene-C ◇ Toluene-C ▲ *m*-Xylene-C

Fig.1. Consumption profiles of binary mixtures of benzene (B), toluene (T), and *m*-xylene (X) in nitrifying cultures at an initial concentration of  $2.5 \pm 0.2$  mg C/l for each compound.

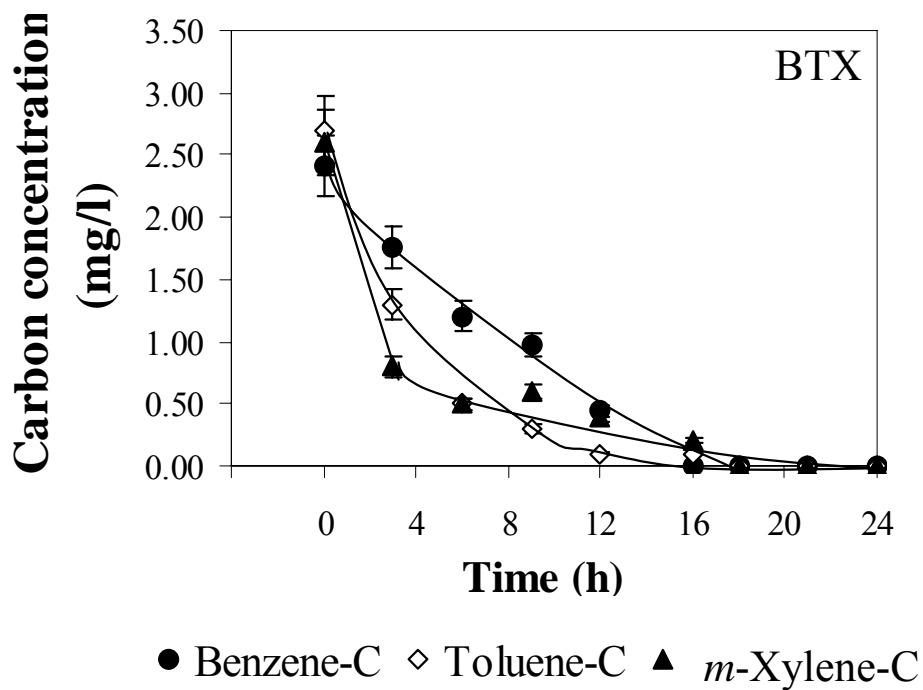


Fig. 2. Consumption profiles of ternary mixtures of benzene (B), toluene (T), and *m*-xylene (X) in nitrifying cultures at an initial concentration of  $2.5 \pm 0.2$  mg C/l for each compound.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00008

EFFECTO DEL BENCENO TOLUENO Y m-xileno SOBRE UN CULTIVO NITRIFICANTE.

En México, D.F., se presentaron a las 12:00 horas del día 14 del mes de junio del año 2005 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. LUC DENDOOVEN VANDERBEKEN
- DR. PEDRO JOSE ALVAREZ ALVARADO
- DR. ERIC PASCAL HOUBRON MARTY
- DRA. ANNE CLAIRE TEXIER VALENTIN

Bajo la Presidencia del primero 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: ALEJANDRO ZEPEDA PEDREGUERA



ALEJANDRO ZEPEDA PEDREGUERA  
FIRMA DEL ALUMNO

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

APROBAR

REVISÓ

LIC. CARMEN LLORENS FABREGAT  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

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

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. OSCAR ARMANDO MONROY  
HERMOSILLO

PRESIDENTE

DR. LUC DENDOOVEN VANDERBEKEN

VOCAL

DR. PEDRO JOSE ALVAREZ ALVARADO

VOCAL

DR. ERIC PASCAL HOUBRON MARTY

SECRETARIA

DRA. ANNE CLAIRE TEXIER  
VALENTIN