



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**ANÁLISIS ECOFISIOLÓGICO DE LA
DESNITRIFICACIÓN EN PRESENCIA DE
ACETATO Y TOLUENO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

SERGIO MARTÍNEZ HERNÁNDEZ

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. FLOR DE MARÍA CUERVO LÓPEZ

MÉXICO D.F.

DICIEMBRE 2007

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Padrón de Posgrados de Excelencia del **CONACyT** y además contó con apoyo del mismo Consejo, con los convenios: 400200-5-33668-U y SEP-2003-CO2-43144.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Fisiología Microbiana W-004 del Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

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

**Análisis ecofisiológico de la desnitrificación en presencia de
acetato y tolueno**

Que presentó

Sergio Martínez Hernández

Comité Tutorial:

Directora: Dra. Flor de María Cuervo López

Co-director: Dr. Hugo C. Ramírez Saad

Asesora: Dra. Eugenia J. Olguín Palacios

Asesor: Dr. Jorge Gómez Hernández

H. Jurado:

Presidenta: Dra. Florina Ramírez Vives

Secretario: Dr. Humberto González Márquez

Vocal: Dra. Eugenia J. Olguín Palacios

Vocal: Dr. Eric Houbron Marty

*A mis Padres Gregoria y Abel
por todo su esfuerzo realizado
para alcanzar este objetivo*

*A Esdras y Elizabeth
por todo su amor y por ser
mi estímulo para seguir adelante*

Agradecimientos

A la Dra. Flor de María Cuervo López, y al Dr. Jorge Gómez Hernández por la dirección de este trabajo, por incursionarme en el interesante mundo de la fisiología microbiana. Gracias, por sus ideas, sus largas jornadas de discusión y análisis, sus consejos y principalmente por su amistad.

A mis asesores la Dra. Eugenia J. Olguín Palacios y Dr. Hugo C. Ramírez Saad, que por sus ideas y dedicación hicieron posible darle forma a esta tesis.

Al comité tutorial, Dra. Florina Ramírez Vives, Humberto González Márquez y Dr. Eric Houbbron Marty por la revisión de la tesis y sus acertados comentarios.

A mis compañeros y amigos del laboratorio, Citlali, Emir, Edna, Anne, David, Ricardo, Arturo, Omar, Emmanuel, Julio y Raúl por su apoyo en las jornadas de trabajo. Por supuesto al Profesor Felipe Martínez por brindarme su amistad y confianza.

A Aida, Ildelfonso y Mónica, por incursionarme en las técnicas de biología molecular.

A Gladys, Tony, Luz, Oswaldo, Sergio y César por su amistad durante esta aventura de posgrado.

A mis suegros Ana Bautista y Alejandro Rodríguez por el apoyo que me han brindado en los últimos años.

A mis Hermanos, Lena, Yola y Angel por los grandes momentos que hemos compartido.

CONTENIDO

Resumen.....	i
Abstract.....	iii
1. Panorama ambiental.....	1
1.1 El deterioro ambiental.....	1
1.2 La Contaminación del agua.....	2
2. Introducción.....	6
2.1 El nitrógeno.....	6
2.1.1 Métodos fisicoquímicos de eliminación de compuestos nitrogenados.....	7
2.1.2 Métodos biológicos de eliminación de compuestos nitrogenados.....	8
2.1.3 Nitrificación.....	9
2.1.4 Desnitrificación.....	10
2.1.4.1 Microbiología de la desnitrificación.....	10
2.1.4.2 Bioquímica de la desnitrificación.....	11
2.1.4.3 Factores que afectan la desnitrificación.....	15
2.2 El Tolueno.....	19
2.2.1 Características fisicoquímicas del tolueno.....	20
2.2.2 Efectos nocivos del tolueno.....	21
2.2.3 Métodos fisicoquímicos para la eliminación del tolueno.....	23
2.2.4 Procesos biológicos para la eliminación del tolueno.....	24
2.2.4.1 Procesos aerobios.....	24
2.2.4.2 Procesos anóxicos.....	27
2.3 Eliminación de tolueno por desnitrificación.....	31
2.3.1 Desnitrificación con tolueno como única fuente orgánica y en mezcla con otros substratos.....	31
2.3.2 Uso de herramientas moleculares en la eliminación de tolueno.....	35
3. Justificación.....	39
4. Objetivos.....	40
5. Material y Métodos.....	41

5.1 Materiales.....	41
5.1.1 Diseño y operación del reactor UASB.....	41
5.1.2 Botellas serológicas.....	42
5.1.3 Inóculo.....	43
5.1.4 Medio de cultivo.....	43
5.2 Metodología.....	43
5.2.1Cultivo continuo.....	43
5.2.1.1 Ensayos abióticos.....	43
5.2.1.2 Ensayos en continuo con tolueno.....	44
5.2.2 Cultivo en lote.....	45
5.2.2.1 Ensayos control.....	45
5.2.2.2 Ensayos en lote con tolueno.....	45
5.3 Métodos analíticos.....	47
5.3.1Compuestos nitrogenados.....	47
5.3.1.1 Medición de nitrato y nitrito.....	47
5.3.1.2 Medición de nitrógeno molecular y óxido nitroso.....	48
5.3.2 Compuestos carbonados.....	49
5.3.2.1 Medición de carbono total y orgánico.....	49
5.3.2.2 Medición de acetato.....	50
5.3.2.3 Medición de bióxido de carbono y metano.....	51
5.3.2.4 Medición de tolueno.....	51
5.3.2.5 Medición de sólidos suspendidos volátiles.....	52
5.3.3 Análisis molecular.....	53
5.3.3.1 Lisis celular y extracción de ácidos nucleicos.....	53
5.3.3.2 Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE).....	53
5.3.3.3 PCR en tiempo real.....	54
6. Resultados y discusión.....	56
6.1 Estudio de la mineralización de tolueno por desnitrificación en un reactor de lecho de lodos anaerobios con flujo ascendente (UASB).	56
6.2 El acetato mejora la velocidad específica de consumo de tolueno bajo condiciones desnitrificantes.....	65

6.3 Eliminación de tolueno bajo condiciones desnitrificantes: efecto del acetato sobre la velocidad de eliminación y los cambios genotípicos.....	89
7. Conclusiones generales y recomendaciones.....	109
8. Bibliografía.....	112

LISTA DE FIGURAS

Figura 2. 1 Ciclo del nitrógeno.....	6
Figura 2.2 Modelo propuesto para la ruta desnitrificante en <i>Pseudomonas stutzeri</i>	12
Figura 2.3. Cinco rutas aerobias que emplean microorganismos del género <i>Pseudomonas</i> para la oxidación de tolueno	26
Figura 2.4 Ruta propuesta de la oxidación anaerobia del tolueno.....	29
Figura 2.5 Mecanismo de reacción propuesto para la enzima benzilsuccinato sintasa....	30
Figura 2.6 Mecanismo de reacción propuesto para la oxidación de benzoil-CoA bajo condiciones anaerobias.....	31
Figura 5.1 Esquema del reactor desnitrificante UASB.....	42
Figura 5.2 Curva de calibración para la determinación de nitrato.....	48
Figura 5.3 Curva de calibración para la determinación de carbono total.....	50
Figura 5.4 Curva de calibración para la determinación de acetato.....	51
Figura 5.5 Curva de calibración para la determinación de tolueno.....	52
Figura 5.6 Curva de calibración usada para PCR en tiempo real. Los datos muestran la estandarización del gene <i>bssA</i> usando DNA de <i>Thauera aromatica</i> cepa T1.....	55

LISTA DE TABLAS

Tabla 2.1 Algunos géneros que incluyen bacterias desnitrificantes.....	11
Tabla 2.2 Características fisicoquímicas de los BTEX.....	21
Tabla 2.3 Estequiometría y energía libre generada por la oxidación de tolueno en procesos anóxicos.....	28
Tabla 5.1 Composición química del medio de cultivo.....	43
Tabla 5.2 Velocidades de carga de carbono ensayadas en el reactor UASB2 en cultivo continuo.....	45
Tabla 5.3 Velocidades de carga de carbono ensayadas en el reactor UASB3 en cultivo continuo.....	45
Tabla 5.4 Concentraciones de carbono usadas durante la primera serie de experimentos en lote.....	46
Tabla 5.5 Concentraciones de carbono usadas durante la segunda serie de experimentos en lote.....	46
Tabla 5.6 Iniciadores y sondas empleados en la cuantificación de los genes 16S DNAr y <i>bssA</i> por PCR en tiempo real.....	54

RESUMEN

El presente trabajo pretende contribuir al estudio de la eliminación de tolueno mediante la desnitrificación, así como al entendimiento de las interacciones entre las respuestas fisiológicas dentro de un consorcio desnitrificante y la estructura de la comunidad microbiana presente. Se puso énfasis en estudiar la influencia de una fuente fácilmente oxidable sobre la eliminación de dicho hidrocarburo, la cual fue evaluada a través de variables de respuesta fisiológicas tales como eficiencias de consumo, rendimientos de producto y velocidades específicas de consumo de sustrato. Para lograr entender con mayor profundidad las interacciones entre las respuestas fisiológicas y la estructura microbiana el trabajo se apoyó en algunos métodos de biología molecular como el de electroforesis en gel con gradiente desnaturante (DGGE) y el de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-RT). El trabajo se dividió en tres partes, en cada una de estas se utilizó un consorcio desnitrificante fisiológicamente estable que no presentaba un contacto previo con hidrocarburos.

En una primera parte se examinó en cultivo continuo el efecto del acetato como una fuente fácilmente oxidable sobre la mineralización de tolueno por desnitrificación. En los ensayos se usó un reactor UASB que primero se alimentó con acetato a una velocidad de carga de 250 mg C-acetato/l-d y una carga de nitrógeno de nitrato de 171 mg N-NO₃⁻/l-d. Posteriormente 5 velocidades de carga de tolueno (mg C-tolueno/l-d) fueron evaluadas (25, 50, 75 100 y 125), manteniendo constante la velocidad de carga de carbono total de 250 mg C/l-d y una relación C/N de 1.4. En estos ensayos la velocidad de carga de acetato fue disminuyendo gradualmente pero sin eliminarse totalmente del sistema.

En una segunda parte, también se evaluó en cultivo continuo y en lote el efecto del acetato sobre el consumo del tolueno. En este caso, para los ensayos en continuo se eliminó totalmente el acetato de la alimentación, evaluando velocidades de carga de acetato-C/tolueno-C entre 100/0 y 0/100 mg C/l-d. Además, en estos ensayos se estudió la estructura de las poblaciones microbianas mediante la técnica molecular de DGGE. En los ensayos en lote se evaluaron distintas concentraciones de tolueno (10-70 mg C/l) en ausencia y presencia de acetato (10-70 mg C/l).

La tercera parte del trabajo se realizó en cultivo en lote donde se evaluaron concentraciones de tolueno (en ausencia y presencia de acetato) distintas a las evaluadas

en los ensayos antes mencionados. Además de que en estos ensayos, aunado a las variables de respuesta fisiológicas, se analizó mediante la técnica de PCR-RT, la presencia de genes catabólicos del tolueno como el *bssA* que codifica para la enzima benzilsuccinato sintasa, así como de genes constitutivos como el 16S DNAr.

Los resultados de la primera parte mostraron eficiencias de consumo de acetato y tolueno mayores que 95% y de nitrato superiores a 87%. Los rendimientos de carbono (Y_{HCO_3}) alcanzaron valores de 0.71, mientras que los de nitrógeno (Y_{N_2}) oscilaron alrededor de 0.88. Los resultados muestran que el proceso desnitrificante no se vio afectado aún a velocidades de carga de tolueno ensayadas de 125 mg C/l-d.

En la segunda parte del trabajo, para el caso de los ensayos en continuo se encontró que conforme la velocidad de carga de acetato disminuyó gradualmente hasta eliminarse totalmente en el cultivo, las eficiencias de consumo de carbono y nitrógeno también descendieron de 91 a 61% y de 99 a 65%, respectivamente. Los Y_{HCO_3} y Y_{N_2} también decrecieron desde 0.82 a 0.46 y 0.82 a 0.47, respectivamente. El análisis del perfil de bandas obtenido mediante la técnica de DGGE reveló un mayor número de poblaciones microbianas en los ensayos con las mezclas acetato/tolueno, aunque no se encontró algún predominio de éstas, descartando alguna presión selectiva debido al incremento del tolueno en el cultivo. En los ensayos en lote se observó que la velocidad específica de consumo de tolueno (q_T) incrementó con la presencia de acetato, ya que mientras la q_T con 15 mg C-tolueno/l fue de 0.006 mg C/mg SSV-d, la q_T a la misma concentración de tolueno, pero en presencia de 65 mg C-acetato/l, fue de 0.013 mg C/mg SSV-d, es decir, la velocidad específica de consumo de tolueno fue duplicada en presencia de acetato.

Los ensayos en lote realizados en la tercera parte del estudio también mostraron un efecto coadyuvante del acetato sobre la velocidad específica de consumo de tolueno. El análisis de PCR-RT mostró que el mayor número de copias del gen *bssA* se encontró en los ensayos que presentaban tolueno, comparado con los de sólo acetato. Sin embargo, para el caso del gen 16S DNAr se presentó un efecto contrario, encontrando un mayor número de copias en los ensayos que presentaban acetato, lo que podría indicar que mientras el tolueno promovió el crecimiento de bacterias que albergan el gen *bssA*, el acetato promovió el crecimiento de bacterias totales, lo que provocó un incremento en la velocidad específica de consumo de tolueno.

ABSTRACT

A contribution to the knowledge of denitrifying process in presence of toluene is presented. The effect of an easily degradable substrate such as acetate on toluene mineralization under denitrifying conditions was evaluated by means of consumption efficiencies, yield products and substrate specific consumption rates. Molecular techniques such as denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and real-time PCR analysis were used in order to determinate whether a relationship between the structure of the community and toluene consumption exists. A stabilized denitrifying sludge without previous exposition to hydrocarbons was used as inoculum. The work was divided into three parts.

At first, in order to examine the effect of acetate on toluene mineralization, an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor in steady state was set up. Initially, the reactor was fed with a carbon loading rate of 250 mg acetate- C/l-d as electron source. Nitrate loading rate (mg NO_3^- -N /l-d) was adjusted to obtain a constant C/N ratio of 1.4. Later, acetate-C loading rate (mg acetate-C/l-d) was gradually substituted by toluene-C at five toluene-C loading rates (TLR, mg toluene-C/l-d), 25, 50, 75, 100 and 125. Total carbon loading rate and C/N were maintained constant at 250 mg C/l-d and 1.4, respectively.

In the second part, continuous and batch cultures were carried out. In continuous assays, an UASB reactor was fed with different carbon loading rates (mg C/l-d) of acetate-C/toluene-C: 100/0, 75/25, 50/50 and 0/100. In these assays, the analysis of the dynamics of denitrifying community profile by DGGE, was studied. In batch assays, different acetate-C/toluene-C ratios (10/70, 30/50, 50/30 and 65/20 mg C/l), were evaluated. Assays with only toluene (mg C/l: 20, 30, 50 and 70) were done as control.

In the third part, the oxidation of 15 mg of toluene-C/l in presence or absence of 90 mg of acetate-C/l was evaluated in batch culture. In these assays the number of *bssA* and 16S rDNA gene copies were quantified using real time quantitative PCR analysis.

The results found in the first part showed that when acetate-C was the only electron source a dissimilative denitrifying process resulted as indicated by bicarbonate yield (Y_{HCO_3} , mg HCO_3^- produced/mg carbon consumed) of 0.74 ± 0.005 and denitrifying yield (Y_{N_2} , mg N_2 produced/mg NO_3^- -N consumed) of 0.89 ± 0.042 . The addition of different TLR did not affect the biological process as consumption carbon efficiency (CCE) values

remained up to $95\% \pm 3.5$ and Y_{HCO_3} and Y_{N_2} values were higher than 0.71 ± 0.03 and 0.88 ± 0.01 , respectively.

In the second part it was found that as the acetate loading rate decreased in the culture, the carbon and nitrate consumption efficiency also decreased from 91 to 51% and from 99 to 65%. Y_{HCO_3} and Y_{N_2} values also decreased from 0.82 to 0.46 and 0.82 to 0.47. The analysis of the dynamics of denitrifying community profile by DGGE indicated that there was no prevalence of a certain microbial population in the assays with different acetate-C/toluene-C ratios. The results in batch assays indicated that the specific consumption rate of toluene (q_T) was two times higher at 20 mg toluene-C/l in presence of 65 mg acetate-C/l as compared to assays with 20 mg toluene-C as solely electron source. Therefore, the presence of acetate improved the q_T .

The results in the third part corroborated that the specific consumption rate of toluene improved in the presence of acetate. Real time quantitative PCR analysis showed that the highest number of *bssA* gene copies occurred in presence of toluene, whereas the highest number of 16S rDNA gene copies was observed in assays with acetate. These results suggest that acetate enhanced the bacteria growth leading to an increase in toluene consumption rate.

1. PANORAMA AMBIENTAL

1.1 El deterioro ambiental

La población humana se duplicó en tan sólo 40 años, pasando de 3 billones de habitantes en 1960 a 6.3 billones en 2003 (Cohen y col., 2003). Este crecimiento acelerado refleja entre otras causas el progreso humano en la medicina, así como en la capacidad para transformar los recursos naturales en productos empleados para su sustento. No obstante, la explotación irracional de los recursos naturales ha desencadenado un deterioro notable en el ambiente, llegando en la actualidad a alcanzar niveles tan grandes que no solamente se ve afectada la naturaleza, sino también la existencia de la humanidad.

Entre las variables que reflejan el impacto adverso de la actividad humana en el ambiente, se encuentran las relacionadas con la contaminación del agua, el cambio climático, la alteración en los ciclos biogeoquímicos de los elementos y la pérdida de la biodiversidad, por mencionar los más importantes.

Respecto a la problemática del agua, se estima que en los países en desarrollo, alrededor del 90% de las aguas residuales son descargadas directamente en ríos, lagos y mares sin ningún tratamiento. Como resultado, se estima que cada año mueren 5 millones de personas por enfermedades transmitidas por el agua tales como cólera, diarrea, etc. (Freeman, 2001). Aunado a los daños generados a la salud humana, la contaminación del agua también ha causado un alarmante deterioro en la biodiversidad acuática.

El humano también ha contribuido en la alteración de los ciclos biogeoquímicos de los elementos. La alteración del ciclo del carbono, se ve reflejada en la generación de CO₂ (considerado el principal constituyente de los gases invernaderos), ya que sus niveles han aumentado en casi un 30%, pasando de 280 ppm por volumen (ppmv) a finales del siglo 18, a 358 ppmv en 1994 (Schimel y col., 1996). La principal fuente de CO₂ deriva de la quema excesiva de combustibles fósiles como el petróleo, el carbón y el gas. Los cambios en el uso del suelo, donde se involucra la tala y quema inmoderada de áreas forestales también han contribuido de forma considerable con las emisiones de CO₂ hacia la atmósfera (Schimel y col., 1996). Las emisiones antropogénicas de CO₂ han superado la capacidad de los océanos para absorberlo, provocando con esto su inevitable acumulación en la atmósfera (Falkowski y col., 2000). Otro ciclo que ha sido alterado de forma drástica es el del nitrógeno, ya que mientras la fijación biológica de este elemento a nivel

global oscila entre 90 y 130 Tg (teragramos) por año, la fijación antropogénica se estima en una producción anual de 150 Tg (Galloway, 1998). La producción de fertilizantes es el principal causante del nitrógeno antropogénico, otras causas de fijación son la quema de combustibles fósiles y el cultivo de productos agrícolas como las legumbres (Fields, 2004). Entre los efectos adversos que generan la alteración de este ciclo se encuentran la acumulación de diversos intermediarios del ciclo como el nitrato, óxido nítrico y óxido nitroso. Se sabe que el nitrato es de los principales contribuyentes de la eutroficación en cuerpos de agua. Respecto a la salud humana, la ingesta de nitrato puede causar enfermedades como la metahemoglobinemia infantil, además que su consumo se ha relacionado estrechamente con la presencia de cáncer gástrico (Yang y col., 1998; Knobeloch y col., 2000; Ward y col. 2005). El óxido nitroso es uno de los principales causantes del efecto invernadero, ya que es una molécula que absorbe 200 veces más radiación que el bióxido de carbono, además de que su vida media en la atmósfera oscila en los 100 años, por ser un gas químicamente muy estable (Smil, 1997).

El panorama ambiental ante el advenimiento de este nuevo milenio no es nada alentador, el estilo de vida que ha llevado el humano ha generado consecuencias globales que ponen en riesgo el desarrollo de las futuras generaciones. Es urgente que los estados ejecuten a la brevedad, estrategias que permitan un desarrollo sostenible del ambiente; también es prioritario la implementación de sistemas de bioremediación que contrarresten los daños que han sufrido los distintos ecosistemas del planeta.

1.2 La contaminación del agua

El agua es quizá la sustancia más importante y versátil que se encuentra en la naturaleza, esto se debe a las propiedades que su estructura química le confiere, convirtiéndola en una de las sustancias más importantes para la vida en el planeta.

Aunque el agua es abundante en nuestro planeta, sólo una pequeña porción está disponible para las necesidades de los seres vivos. Se estima que del total de agua que existe en la tierra, el 97% forma parte de los océanos, 2% es agua dulce en estado sólido que se encuentra principalmente en los casquetes polares y el restante 1% es agua dulce que se encuentra en ríos y lagunas, así como en los mantos freáticos (Álvarez y Figueroa, 1996). Del 1% utilizable por el humano, se estima que alrededor del 80% es destinado

para el sector agrícola, mientras que el uso para el consumo urbano comprende alrededor del 7% (Vernier, 1992).

Según informes de la Organización de las Naciones Unidas (UN, por sus siglas en inglés), en el inicio del nuevo milenio, al menos una quinta parte de la población humana carece de agua potable y más de la mitad carece de servicios adecuados de sanidad del agua (UN, 1999). De continuar esta tendencia, se prevé que para el año 2025 al menos 3,500 billones de habitantes (la mitad de la población) vivirá en áreas sin agua suficiente para la agricultura, industria y necesidades humanas (Freeman, 2001).

Por otro lado, la acelerada explosión demográfica provoca año con año una demanda de agua cada vez mayor, generando a su vez una enorme cantidad de aguas residuales, que en la mayoría de los casos son regresadas a los cuerpos de agua sin ningún tipo de tratamiento. Por ejemplo, se estima que en los países en desarrollo, las descargas de aguas residuales sin tratar en cuerpos de agua alcanzan el 90% (Tibbetts, 2000). Esto indudablemente genera serios problemas de disponibilidad de agua, de salud y contaminación ambiental.

Los tipos de contaminantes en el agua pueden ser diversos, no obstante los podemos clasificar en tres grupos: microorganismos, materia orgánica y compuestos inorgánicos. En cuanto a la contaminación por microorganismos, una alta proporción de enfermedades como la tifoidea, cólera, disenterías y otras enfermedades infecciosas, son transmitidas por éstos. Entre los contaminantes orgánicos podemos mencionar a los hidrocarburos, grasas y aceites, entre muchos otros. Los contaminantes inorgánicos son diversas sales, como por ejemplo, sulfatos, sulfitos, nitritos, nitratos, carbonatos, etc.

Un caso alarmante de contaminación inorgánica por nitratos es el referente a la “zona muerta” una zona hipóxica ubicada en el norte del golfo de México (Alexander y col., 2000; McIsaac y col., 2002; Rabalais y col., 2002; Criss y Davisson, 2004). El incremento en las descargas de nitrato (por arrastre de fertilizantes nitrogenados) sobre el río Mississippi en la última mitad del siglo veinte, ha causado eutroficación y una zona hipóxica sobre aguas poco profundas de las costas de Louisiana, E. U., en el norte del Golfo de México, en donde desemboca dicho río. La zona muerta, denominada así por la mortalidad de la comunidad béntica y el fracaso en la obtención de productos pesqueros, ha alcanzado niveles de oxígeno disuelto menores a 2 mg/l y se ha estimado en una

extensión máxima de 20,700 km² (Rabalais y col., 2002; Criss y Davisson, 2004). El nitrato también se ha encontrado entre los contaminantes químicos más comunes de los acuíferos en el mundo (Spalding y Exner, 1993). Por ejemplo, se estima que en E. U. alrededor del 22% de los pozos destinados para uso doméstico en áreas agrícolas exceden los niveles máximos de nitrógeno de nitrato permitidos por la Agencia de Protección al Ambiente (EPA por sus siglas en inglés) que se han fijado en 10 mg N-NO₃⁻ /l (equivalente a 45 mg de NO₃⁻/l) (Ward y col., 2005). Se estima que en Europa, un tercio del total de mantos acuíferos exceden los niveles máximos de nitrato permisibles por la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2004), los cuales se han establecido en 11 mg N-NO₃⁻ /l (equivalente a 49 mg de NO₃⁻/l) (European Environmental Agency, 2003). En otros países como China, Turkia, Senegal y México, se han encontrado concentraciones de nitrato en mantos acuíferos superiores a 68 mg/l (WHO, 2004). En México, Muñoz y col. (2004), analizaron el agua subterránea del valle de Huamantla en Tlaxcala, encontrando niveles de nitrato por arriba de la concentración permitida por la WHO. En mantos acuíferos del Valle del Mezquital en Hidalgo, en donde la gran mayoría de los cultivos agrícolas son regados con las aguas residuales provenientes de la ciudad de México, los niveles de nitrato encontrados rebasan los 80 mg/l (Antón y Díaz, 2000). En el sureste de nuestro país también se ha encontrado contaminación por nitrato. Pacheco y col., (2001) encontraron que en pozos de agua potable del estado de Yucatán, los niveles de nitrato alcanzaron entre 7 y 156 mg/l.

Respecto a la contaminación del agua por compuestos orgánicos, podemos mencionar la generada por los hidrocarburos monoaromáticos como el benceno, tolueno, etilbenceno y los isómeros del xileno, mejor conocidos como BTEX. La fuente principal de estos compuestos es el petróleo crudo; otra fracción importante deriva de la destilación del alquitrán de hulla (Morrison y Boyd, 1988). Su contaminación hacia suelos y acuíferos tiene lugar cuando son derramados desde tuberías, refinerías, vehículos transportadores de combustibles y tanques destinados para el almacenamiento de combustibles. Como ejemplo, se tiene que en los Estados Unidos, de los 1.4 millones de tanques subterráneos que existen para el almacenamiento de combustibles, el 35% presenta problemas de fugas (Evans y col., 1992). En México, los datos sobre derrames de hidrocarburos para el año 2001 fueron estimados en 6552 toneladas (PEMEX, 2002). Los BTEX son compuestos

prioritarios de eliminación debido al efecto adverso que tiene sobre el ambiente y la salud humana. Se ha encontrado que sus efectos dañinos en humanos pueden ir desde alteraciones sobre el sistema nervioso central hasta provocar cáncer (Dean, 1985; Fornazzari y col., 2003).

Existen diversas alternativas de eliminación de compuestos nitrogenados y compuestos orgánicos como los BTEX, entre estas, se pueden mencionar los procesos fisicoquímicos como volatilización, absorción y oxidación química, entre otros. Sin embargo, su uso se ve limitado por sus altos costos y por los problemas de manejo y operación, además de que algunos métodos sólo trasladan el contaminante de un ambiente a otro. Los procesos biológicos se han caracterizado por ser procesos económicamente rentables, además de eliminar completamente los compuestos y transformarlos en compuestos inocuos al ambiente. Dentro de los tratamientos biológicos destaca la desnitrificación, un proceso anóxico donde es posible la eliminación simultánea de compuestos orgánicos y nitrogenados.

El presente trabajo pretende contribuir al estudio de la eliminación de tolueno mediante la desnitrificación. Se puso énfasis en estudiar la influencia de una fuente fácilmente oxidable sobre la eliminación de dicho hidrocarburo, la cual fue evaluada a través de variables de respuesta fisiológicas tales como eficiencias de consumo, rendimientos de producto y velocidades específicas de consumo de sustrato. El estudio se llevó a cabo con cultivos en continuo y en lote. El trabajo también se apoyó en algunos métodos de biología molecular con el objeto de relacionar los aspectos fisiológicos con la estructura de la comunidad microbiana.

El trabajo está dividido en seis secciones donde se presenta una introducción, la justificación del trabajo, los objetivos perseguidos, la metodología empleada, los resultados obtenidos, las conclusiones generales y recomendaciones. La sección de resultados se divide en tres partes, en cada una se incluye un resumen de los principales resultados obtenidos, así como el artículo de investigación generado.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 El nitrógeno

El nitrógeno es un constituyente importante para los seres vivos, ya que es requerido para la síntesis de moléculas orgánicas esenciales como son ADN, ARN y proteínas. No obstante que el nitrógeno molecular N_2 , es el constituyente principal del aire (78%), este no se encuentra biodisponible para la mayoría de los seres vivos, ya que sólo ciertos grupos de bacterias pueden metabolizarlo. La razón reside en el fuerte enlace triple que presentan los átomos de N en la moléculade N_2 , haciéndolo un compuesto de baja reactividad. Por lo tanto, para que el N_2 pueda ser usado por los seres vivos, primero debe ser convertido a una forma química disponible como el amonio (NH_4^+), el nitrato (NO_3^-) o en nitrógeno orgánico, como la urea ($[NH_3]_2CO$).

El nitrógeno es un elemento versátil que existe en formas orgánicas e inorgánicas, debido a sus diferentes estados de oxidación que van desde -3 como el NH_4^+ hasta el estado más oxidado (+ 5) como lo es NO_3^- . El movimiento del nitrógeno dentro de la atmósfera, biosfera y geosfera en sus diferentes formas puede ilustrarse con su ciclo (Figura 2.1). Los procesos principales que componen el ciclo son cinco: fijación de nitrógeno, asimilación del nitrógeno (crecimiento de organismos), mineralización del nitrógeno, nitrificación y desnitrificación. De manera general este elemento entra a la biosfera por el proceso de fijación y es regresado a la atmósfera mediante la desnitrificación.

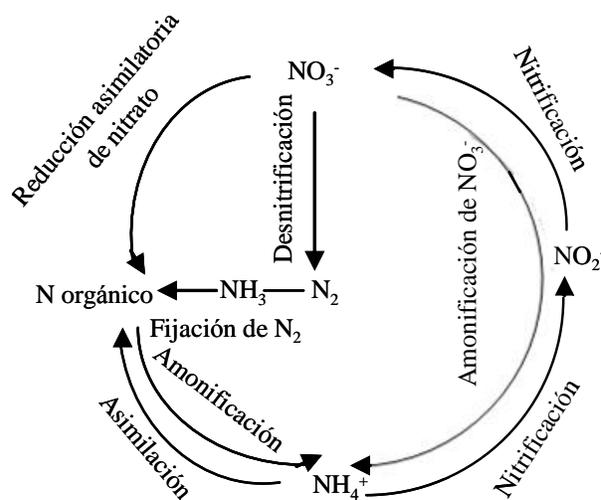


Figura 2. 1 Ciclo del nitrógeno

La fijación es un proceso en el que el nitrógeno molecular es convertido en amonio. Asimismo, la descomposición de la materia orgánica conduce a la formación de amonio por el proceso de amonificación. El amonio producido es incorporado a la materia orgánica en forma de proteínas y otros compuestos de nitrógeno orgánico. El amonio, a su vez, puede retornar a formas orgánicas o puede ser oxidado por microorganismos aerobios para formar nitrato (nitrificación). El nitrógeno en forma de nitrato, puede ser asimilado por los microorganismos o ser reducido mediante dos formas desasimilativas. Una vía ocurre mediante la reducción desasimilativa de nitrato a amonio y la otra, que es realizada por bacterias desnitrificantes, implica la reducción de nitrato hasta nitrógeno molecular, cerrando de esta forma el ciclo (Prescott y col., 1999).

Se puede observar que los microorganismos establecen un equilibrio entre los distintos compuestos nitrogenados presentes en el ambiente y a su vez obtienen la energía necesaria para llevar a cabo sus necesidades metabólicas. Sin embargo, la actividad humana ha duplicado la cantidad de nitrógeno presente en el globo terrestre dañando al ambiente (Bremmen, 2002). El descubrimiento de la fijación no biológica del nitrógeno trajo un enorme crecimiento en la producción agrícola, pero también ha generado efectos negativos. Gran parte de los fertilizantes nitrogenados aplicados a los cultivos no son asimilados por la plantas, sino que son arrastrados por la lluvia o el agua de riego desembocando en cuerpos de agua superficiales o mantos freáticos. El incremento de los compuestos nitrogenados provoca eutrofización en los cuerpos de agua y daños en la salud de los consumidores, como la metahemoglobinemia infantil, enfermedad donde se inhibe la fijación y transporte de oxígeno en la sangre e incluso, puede desarrollar cáncer por la formación de nitrosaminas (Mirvish, 1985). Por otro lado, si el óxido nítrico y el óxido nitroso son transferidos a la atmósfera pueden contribuir con el efecto invernadero (Soares, 2000). Lo anterior ha llevado a desarrollar métodos fisicoquímicos y a profundizar en el estudio de los métodos biológicos involucrados en la eliminación de los compuestos nitrogenados.

2.1.1 Métodos fisicoquímicos de eliminación de compuestos nitrogenados

Los principales procesos fisicoquímicos usados para la eliminación de nitrógeno en aguas residuales son el arrastre con aire, el rompimiento por cloración y el intercambio

selectivo de iones (Weston, 1984). Sin embargo, su uso está limitado por sus altos costos y por los problemas de manejo y operación, además de que algunos métodos sólo trasladan el contaminante de un ambiente a otro.

En el arrastre con aire, el nitrógeno es separado por la volatilización del gas amoníaco. El sistema es simple pero tiene algunas desventajas. La eficiencia del proceso de remoción depende de valores altos de pH (10.5 a 11.5) y además resulta costoso por el manejo y operación que implica la inyección de aire (Metcalf y Eddy, 1991). El método de rompimiento por cloración consiste en la adición de cloro a las aguas residuales para oxidar el nitrógeno disuelto en forma de amonio hasta nitrógeno molecular. Un problema que se puede presentar con este proceso es la alta concentración de cloro que queda presente en las aguas residuales y que resulta tóxico para los organismos acuáticos (Weston, 1984). En el proceso de eliminación de compuestos nitrogenados por intercambio de iones se pueden emplear resinas sintéticas o naturales como la zeolita. Cuando los sitios de intercambio han sido saturados, la resina debe regenerarse por la adición de algunos productos químicos, por ejemplo el hidróxido de sodio. El intercambio iónico tiene una aplicación limitada debido principalmente a la vida media del intercambiador iónico y al complejo sistema de regeneración del mismo (Metcalf y Eddy, 1991).

2.1.2 Métodos biológicos de eliminación de compuestos nitrogenados.

Los dos procesos principales en la eliminación de compuestos nitrogenados de las aguas residuales involucran a la nitrificación y la desnitrificación. En el primero, microorganismos aerobios llevan a cabo la oxidación de amonio a nitrato, mientras que en la desnitrificación, realizada predominantemente por bacterias anóxicas, el nitrato es reducido hasta nitrógeno molecular. No obstante, se han propuesto nuevos mecanismos biológicos para la eliminación de compuestos nitrogenados. Entre estos procesos se encuentra la oxidación anaerobia de amonio a nitrógeno molecular (ANAMMOX), empleando nitrito como aceptor de electrones (Strous y col., 1999); el proceso SHARON (single reactor high activity ammonium removal over nitrite), que fue desarrollado para la eliminación de amonio mediante una nitrificación parcial (Hellings y col., 1998; Jetten y col. 2002) y una posterior desnitrificación del nitrito (Van Loosdrecht, 2004); y, el

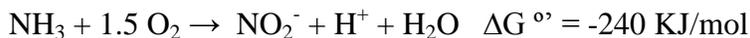
proceso CANON (completely autotrophic nitrogen removal over nitrite), que consiste en el acoplamiento de una nitrificación parcial y el proceso ANNAMOX en un solo reactor aireado intermitentemente. Aunque estos tres procesos pudieran funcionar adecuadamente, también presentan muchos requerimientos, principalmente en su control. Por ejemplo, se recomienda que debe tener un control estricto sobre la concentración de oxígeno, la temperatura y el pH durante la nitrificación parcial a fin de evitar la generación de nitrato (Van de Graaf y col., 1996); se requiere de la adición de varios metales como cofactores enzimáticos; los procesos presentan una alta sensibilidad a la carga de nitrógeno y presencia de materia orgánica (Van Loosdrecht, 2004). Finalmente, aunado a lo anterior, los gastos energéticos que se requieren, así como la posible necesidad de implementar una combinación de dos o tres de estos procesos, a fin de obtener una completa eliminación de compuestos nitrogenados de aguas residuales, representan una seria desventaja en su utilización.

2.1.3 Nitrificación

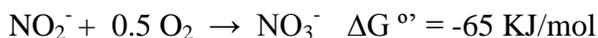
La nitrificación es un proceso aerobio litoautótrofo donde se lleva a cabo la oxidación de amonio hasta nitrato. Las bacterias que catalizan este proceso, son Gram negativas y están ampliamente distribuidas en agua y suelo. Estos microorganismos pertenecen a la familia Nitrobacteriaceae y están divididos en dos grupos: las amonio oxidantes, donde se encuentra los géneros *Nitrosomonas*, *Nitrosospira*, *Nitrosococcus* y *Nitrosolobus* y las nitrito oxidantes, donde se encuentran géneros como *Nitrobacter*, *Nitrospira* y *Nitrococcus* (Parés y Juárez, 1997).

La nitrificación se realiza en dos etapas. En la primera, las bacterias amonio oxidantes catalizan la oxidación de amonio a nitrito, generando hidroxilamina como un intermediario; en la segunda, el nitrito es oxidado a nitrato por la bacterias nitrito oxidantes (Poughon y col., 2001).

Primera etapa:



Segunda etapa:



Entre las principales enzimas involucradas en el proceso se encuentran monooxigenasas (unidas a membrana), hidroxilamina óxido reductasa y la nitrito oxidasa (Madigan y col., 1998). Se ha observado que estas enzimas, y en general el proceso nitrificante, es afectado por factores como el pH, la relación amonio: amoníaco, las concentraciones de oxígeno, nitrito y materia orgánica (Hanaki y col., 1990; Eilersen y col., 1994). Aunque en relación a la materia orgánica, se ha encontrado que es posible llevar a cabo la nitrificación en presencia de compuestos aromáticos como el fenol benceno, tolueno y *p*-cresol (Texier y Gomez 2002; Zepeda y col. 2003).

2.1.4 Desnitrificación

El nitrógeno fijado en la biosfera, es decir, el nitrógeno orgánico, es regresado a la atmósfera en forma de nitrógeno molecular por las bacterias desnitrificantes. La desnitrificación es un proceso anóxico donde el nitrato es reducido a nitrógeno molecular mediante una sucesión de etapas que son catalizadas por enzimas específicas. De manera general el proceso se puede esquematizar de la siguiente manera:



Debido a que la desnitrificación es un proceso reductivo, se requiere la presencia de una fuente de electrones, que puede ser proporcionada por diversos substratos orgánicos (desnitrificación organotrófica). De lo anterior reside el atractivo y la ventaja del uso de la desnitrificación como un proceso biológico en el tratamientos de aguas residuales sobre otros sistemas, ya que es posible la eliminación simultánea de nitrógeno y una amplia variedad de compuestos orgánicos (desde luego que también inorgánicos), que van desde los fácilmente oxidables como los ácidos grasos, hasta compuestos de difícil oxidación, como los derivados del petróleo.

2.1.4.1 Microbiología de la desnitrificación

Las bacterias desnitrificantes involucran microorganismos Grampositivos y Gramnegativos. Estos microorganismos son cosmopolitas ya que están ampliamente distribuidos en la naturaleza y han sido aislados de diversos ambientes como bosques

tropicales, zonas industriales y playas marinas, entre otros (Fries y col., 1994). Estos microorganismos están distribuidos en diversos grupos taxonómicos, algunos de ellos se muestran en la Tabla 2.1 (Payne, 1981; Mateju, 1992).

Tabla 2.1 Algunos géneros que incluyen bacterias desnitrificantes.

Familia	Género	Morfología	Características fisiológicas
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	bacilos, Gramnegativos	organótrofos y litótrofos
Alcaligenaceae	<i>Alcaligenes</i>	bacilos, Gramnegativos	organótrofos y litótrofos
Rhodobacteriaceae	<i>Paracoccus</i>	cocos, Gramnegativos	organótrofos y litótrofos
Hydrogenophilaceae	<i>Thiobacillus</i>	bacilos, Gramnegativos	litótrofos
Bradyrhizobiaceae	<i>Rhodopseudomonas</i>	bacilos, Gramnegativos	fotótrofos
Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	bacilos, Grampositivos	fermentativos

Se ha encontrado que los microorganismos emplean diversas fuentes energéticas, ya que algunas especies son fotosintéticas como es el caso de *Rhodopseudomonas sphaeroides*, otras como *Thiobacillus desnitrificans* puede utilizar hidrógeno o compuestos reducidos de azufre como fuente de energía (litótrofos) y muchas otras pueden utilizar diversas fuentes orgánicas (Parés y Juárez, 1997). Entre las fuentes orgánicas que pueden consumir, se encuentran el glicerol (Akunna y col., 1993), la glucosa (Cuervo-López y col., 1999), ácidos grasos volátiles (Rijn y col., 1996), etanol (Pérez, 1998), polyvinil alcohol (Watanabe y col., 1995), e incluso compuestos difíciles de oxidar como los derivados del petróleo (Spormanm y Widdel, 2000).

La reacción de la desnitrificación organotrófica, se puede esquematizar de la siguiente manera:



2.1.4.2 Bioquímica de la desnitrificación

La desnitrificación es un proceso óxido reductivo secuencial en donde cada una de las etapas es catalizada por una enzima distinta (Zumft, 1997). Estas etapas, así como las enzimas que intervienen en cada una de ellas, se esquematizan en la Figura 2.2.

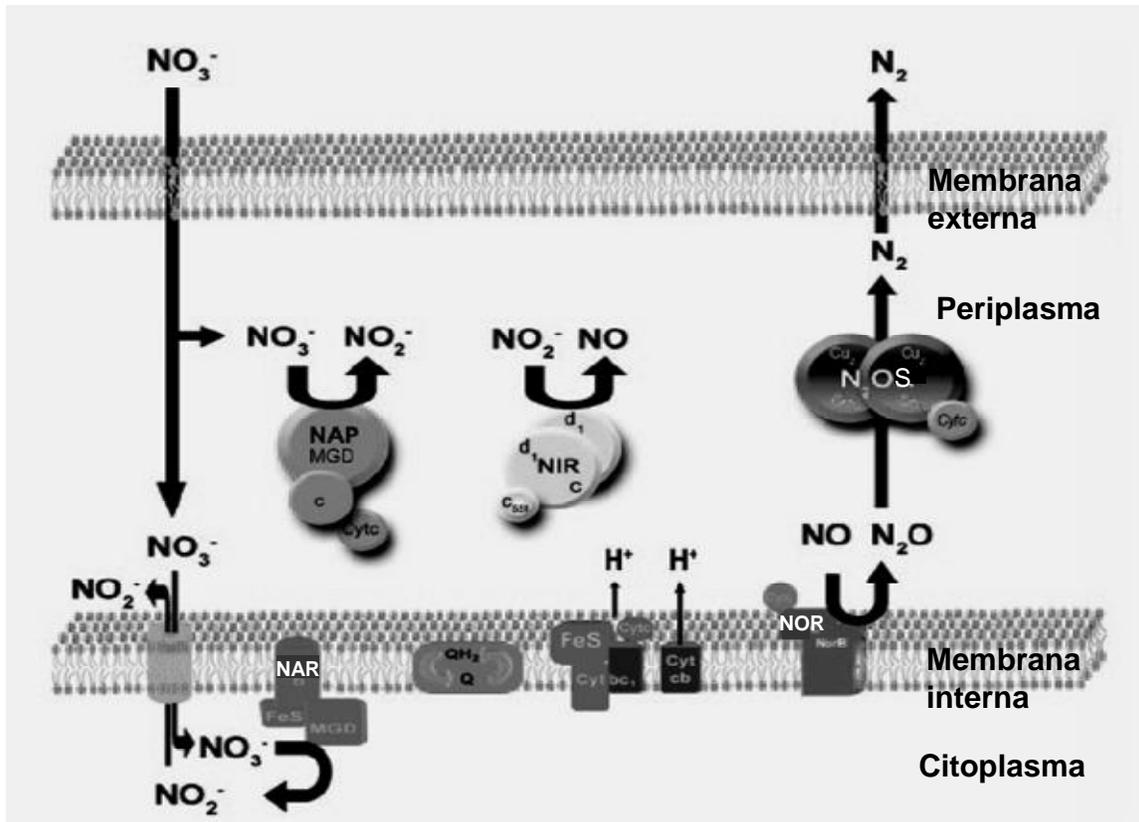


Figura 2.2 Modelo propuesto para la ruta desnitrificadora en *Pseudomonas stutzeri* (Lalucat y col., 2006).

Las enzimas involucradas son las siguientes: NO_3^- reductasa (NAR), NO_2^- reductasa (NIR), NO reductasa (NOR), N_2O reductasa (NOS). También se muestra la presencia de la NO_3^- reductasa periplásmica (NAP). Abreviaciones: b, hemo B; c, hemo C; C551, citocromo C551; CuA y CuZ centros de cobre A y Z respectivamente; Cyt C, citocromo no específico aceptando electrones de bc1; Cyt bc1, complejo citocromo bc1; d1, hemo D1; FeS, centro hierro-azufre; MGD, cofactor molibdeno; Q, QH_2 , ciclo quinona, (Lalucat y col., 2006).

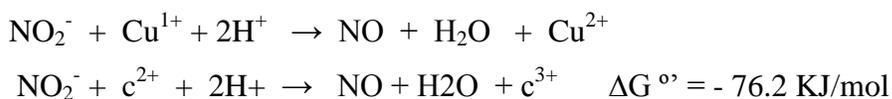
La primera reacción, que consiste en la reducción de nitrato a nitrito, es catalizada por la enzima nitrato reductasa (NAR). Se han descrito 4 clases de NAR, dos asimilatorias aisladas desde el citoplasma de células bacterianas y eucariotas y dos respiratorias encontradas en bacterias. Una de ellas está unida a la membrana interna (NAR) y otra

encontrada en el periplasma (NAP) (Moura y Moura, 2001). La reacción de la NAR se podría esquematizar de la siguiente manera (Jetten y col., 1997).



En *Pseudomonas denitrificans* se ha encontrado que la NAR unida a la membrana, utiliza la ubiquinona como donador de electrones y está constituida por tres subunidades (120, 60 y 20 kDa). La otra enzima NAR, que se encuentra en el periplasma, consta de dos subunidades (94 y 19 kDa) y su donador de electrones es desconocido (Bell y col., 1990). Ambas enzimas tienen un cofactor molibdoterina en su centro activo (Moura y Moura, 2001). Los estudios muestran que la enzima unida a la membrana sólo se expresa bajo condiciones anóxicas, mientras que la otra, puede ser sintetizada y activada aún en presencia de oxígeno (Siddiqui y col., 1993). Se ha propuesto que el mecanismo de reacción tiene lugar en el centro molibdeno, donde éste cambia de un estado redox de Mo (IV) a Mo (VI) (Jetten y col., 1997). La enzima en su estado reducido (Mo IV), puede coordinar el nitrato con el molibdeno, entonces el enlace N-O es debilitado y el nitrito, como producto, es liberado (Moura y Moura, 2001).

La reducción de nitrito a óxido nítrico, está dada por la enzima nitrito reductasa (Nir). La reacción es la siguiente:



Se han identificado dos clases de nitrito reductasas, una contiene cobre (Nir-Cu) y la otra contiene un citocromo hemo (Nir-cd₁). Las dos enzimas son funcional y fisiológicamente similares, aunque por razones desconocidas son mutuamente excluyentes (Glockner y col., 1993). También se ha identificado un tipo de nitrito reductasa (multihemo c) que reduce nitrito a amonio, así como óxido nítrico a hidroxilamina (Costa y col., 1990). Referente a la enzima Nir-Cu los estudios muestran que está constituida por un homotrímero, con subunidades de 36 kDa, y dos átomos de cobre por monómero. La otra enzima que contiene citocromo cd₁, consiste de un homodímero de 64 kDa por

subunidad, donde cada monómero contiene un hemo c y un hemo d₁. El mecanismo propuesto de la nitrito reductasa cd1 involucra la unión de nitrito al hemo ferroso d₁, formación de óxido nítrico y desplazamiento como producto de hemo férrico (Fulop y col., 1995; Cutruzzola, 1999). Estudios de difracción de rayos X sobre la estructura reducida de citocromo cd1 muestran que el nitrito y el óxido nítrico se unen al hierro del hemo d1 por el átomo de nitrógeno (Moura y Moura, 2001).

La tercera etapa es catalizada por la enzima óxido nítrico reductasa (Nor) y consiste en la reducción del óxido nítrico al óxido nitroso:



En *Paracoccus denitrificans*, la Nor es una enzima unida a la membrana interna, que consiste de dos subunidades. La subunidad de 16 kDa, transporta un hemo c y la otra, de 53 kDa, contiene un hemo b. Esta etapa es relativamente rápida, estudios con *Thiosphaera pantotropha*, mostraron que esta reacción fue diez veces más rápida que la reducción del óxido nitroso (Kroneck y col., 1992). La razón probable es la toxicidad del óxido nítrico sobre bacterias, hongos, virus e incluso en las propias bacterias desnitrificantes (Braun y Zumft, 1991).

La última etapa del proceso respiratorio desnitrificante consiste en la reducción del óxido nitroso a nitrógeno molecular, catalizada por la óxido nitroso reductasa (Nos) que se encuentra a nivel de periplasma. El mecanismo de reacción de esta enzima se puede esquematizar con la siguiente reacción:



La enzima purificada es un homodímero de aproximadamente 70 kDa. Cada subunidad contiene 4 átomos de cobre que están organizados en dos diferentes centros dinucleares, CuA y CuZ. Se ha propuesto que el centro CuA es el sitio de entrada de electrones, mientras que el centro CuZ se piensa que es el sitio de reducción del óxido nitroso (Jetten y col., 1997). Estudios recientes sobre la estructura tridimensional de CuZ muestran en el

centro un átomo de azufre unido con 4 cuatro átomos de cobre (CuI al CuIV) organizados en un tetrahedro distorsionado (Brown y col., 2000).

2.1.4.3 Factores que afectan la desnitrificación

Como se puede observar, la respiración desnitrificante es un proceso complejo realizado por una serie de enzimas que se encargan de catalizar cada una de las reacciones. Los mecanismos de acción son regulados fuertemente por la presencia de oxígeno y por la concentración de sustrato. Otros factores ambientales que también influyen en el desarrollo de un proceso desnitrificante eficaz, son la relación C/N, la fuente de electrones (tipo y concentración) y seguramente el tipo y la concentración de los microorganismos.

El oxígeno tiene un efecto inhibitorio reversible para la mayoría de las enzimas desnitrificantes. Los estudios muestran que son inmediata o gradualmente inactivadas por la presencia de oxígeno, posiblemente debido a una competencia por los electrones, más que una inactivación de la propia enzima. También se ha observado que las últimas enzimas de la secuencia desnitrificante son más sensibles que las primeras. Diversos trabajos mostraron que a bajas concentraciones de oxígeno se presenta una notable fracción molar de óxido nitroso (Knowles, 1982). Estos resultados contrastan con otros estudios realizados en *Flexibacter canadensis*, en donde se observó que la enzima nitrito reductasa es más sensible al oxígeno que otras enzimas, como la óxido nítrico y la óxido nitroso reductasa (Knowles y Niven, 1994). Otros estudios, realizados en *Pseudomonas nautica*, mostraron que, en presencia de oxígeno, la enzima nitrato reductasa (Nar) es menos sensible que las enzimas nitrito reductasa y la óxido nitroso reductasa. Se encontró que la Nar fue completamente inhibida a partir de 4.05 mg O₂/l, mientras que la Nir y la Nos lo fueron a partir de 2.15 y 0.25 mg O₂/l, respectivamente (Bonin y col., 1989).

Por otro lado, se ha observado que la inducción de las enzimas desnitrificantes está ampliamente influenciada por la presencia de los sustratos nitrogenados. Estudios realizados en *Pseudomonas aeruginosa* mostraron que la expresión de la enzima nitrito reductasa estuvo en función de la concentración de nitrato. Estos autores encontraron niveles bajos de expresión de la enzima nitrito reductasa en ausencia de nitrato cuando fue sometida a condiciones aerobias y anaerobias. Sin embargo, se obtuvieron niveles

altos de la Nir en presencia de nitrato, aún bajo condiciones aerobias (Zennaro y col., 1993).

Otro factor importante que puede orientar la desnitrificación hacia un proceso desasimilativo es la relación carbono/nitrógeno (C/N). Se ha observado que esta variable está relacionada con la acumulación de compuestos involucrados en la desnitrificación, e incluso puede orientar la desasimilación reductiva de nitrato a amonio (DNRA). En términos generales, el establecimiento experimental del valor de la C/N, radica en su valor estequiométrico. Se pueden distinguir tres zonas: 1) C/N menor a la estequiométrica, genera una desnitrificación incompleta; 2) C/N estequiométrica, donde la desnitrificación es completa y 3) C/N mayor a la estequiométrica, implica una desnitrificación completa y materia orgánica residual (Cuervo-López, 2003). Al respecto, Akunna y col. (1994), empleando glucosa como fuente de carbono y variando la C/N (1.3 y 5.6), muestran que a medida que la relación C/N desciende, la generación de amonio decrece. En otro trabajo, presentado por Oh y Silverstein (1999), trabajando con reactores desnitrificantes de lote secuenciado, con acetato como fuente de carbono, se observó que con una relación C/N de 1:1, se presentó una acumulación de nitrito del 30%. Estos resultados contrastan con otros trabajos en donde se observó ambos sustratos fueron consumidos y transformados en su totalidad a productos como CO₂ y N₂ (Cuervo-López y col., 1999; Cervantes y col., 2001; Peña-Calva y col., 2004). Cuando la relación C/N fue de 2:1 y 3:1, el nitrato fue consumido sin presentarse acumulación de nitrito. Sin embargo, en la última relación mencionada se observa una notable concentración de acetato no consumido. Tal tendencia es de esperarse, ya que se presentó un exceso de fuente de electrones, si consideramos que la relación C/N estequiométrica de la desnitrificación en presencia de acetato es de 1.07 (Mateju y col., 1992).

Por otro lado, algunos estudios han mostrado que el tipo de fuente de carbono puede influenciar sobre la vía metabólica a seguir. Akunna y col. (1993), probaron diferentes sustratos orgánicos tales como glucosa, glicerol, acetato, lactato y metanol en presencia de nitrito y nitrato como fuente nitrogenada. Los resultados mostraron que con glucosa y glicerol se favoreció un proceso fermentativo, así como la desasimilación reductiva de nitrato a amonio, mientras que con los últimos tres sustratos orgánicos predominó la desnitrificación. Una variable importante que tendría que considerarse en este estudio es

la relación C/N, quizás en los ensayos con glucosa, la fuente orgánica estaba en exceso, favoreciendo así un proceso fermentativo.

La fuente de electrones también parece influir en la acumulación de algunos intermediarios nitrogenados como el nitrito. Estudios realizados por Rijn y col. (1996), con *Pseudomonas stutzeri*, mostraron mayor acumulación de nitrito cuando se empleó acetato como fuente de energía, que cuando se usó butirato. También observaron que el butirato fue consumido más lentamente que el acetato, por lo que arguyen que en presencia de nitrato y nitrito, los electrones del acetato fluyen preferentemente hacia la nitrato reductasa, mientras que los electrones generados por el butirato reducen más rápidamente la nitrito reductasa que la nitrato reductasa. Estas hipótesis deben tomarse con reserva ya que los K_m para dichas enzimas, así como los K_s de los microorganismos para ambos sustratos pueden resultar diferentes, así como también el transporte de estos a nivel de membrana. Aunado a esto, otros estudios han mostrado que durante la desnitrificación con acetato como fuente de electrones, no hay presencia de nitrito en el medio de cultivo (Cuervo-López, 1999; Peña-Calva, 2004).

Otro parámetro importante, que parece afectar el proceso en particular la termodinámica de la desnitrificación, es el pH. Esta variable también puede afectar la velocidad de reacción de las enzimas desnitrificantes. Al respecto, Thomsen y col. (1994), en estudios en lote con *Paracoccus denitrificans* señalan diferencias muy marcadas entre valores de pH ácidos y básicos. Encontraron que, a un pH de 5.5, la velocidad de reacción de las enzimas desnitrificantes se vuelve lenta, observando la acumulación transitoria de intermediarios como el nitrito y el óxido nitroso. Sin embargo, a un pH de 8.5, la presencia de tales intermediarios no fue significativa, encontrándose nitrógeno molecular inmediatamente después de que el nitrato empezó a consumirse. Por su parte Pérez (1998), trabajando con reactores continuos desnitrificantes (alimentados con acetato, lactato y etanol), encontró que a valores de pH entre 6 y 9, se lograron rendimientos desnitrificantes de 0.95, sin observar intermediarios nitrogenados, por el contrario, a pH 5, no hubo desnitrificación.

Respecto a la temperatura, se ha encontrado que las velocidades de desnitrificación disminuyen significativamente a 5° C, mientras que a 20° C las velocidades no se ven

afectadas. Las temperaturas recomendables para mantener velocidades desnitrificantes adecuadas, oscilan entre 20 y 35° C (Cuervo-López, 2003).

Finalmente, los parámetros cinéticos también son un factor importante que afecta los procesos biológicos. Por ejemplo, si las concentraciones celulares o de sustrato (o el tipo de sustrato) son diferentes, la velocidad de consumo variará si se considera que:

$$dS/dt = q_s[X]$$

Donde q_s (1/tiempo) es la velocidad específica de consumo y X la concentración microbiana. Asimismo, la expresión puede ser de la manera siguiente:

$$-dS/dt = q_s [S]$$

En donde se evidencia que la cinética es de orden uno y que depende de la concentración de sustrato. Para que las Ecuaciones anteriores describan de modo más explícito el proceso, q_s puede ser sustituida por la ecuación de Monod

$$q_s = q_{\max} [S] / K_s + [S]$$

Donde K_s es la constante de afinidad del cultivo por el sustrato S . Si se sustituye la Ecuación anterior en la Ecuación que expresa que la velocidad del consumo de sustrato depende de la concentración del mismo, se tiene lo siguiente:

$$r = -dS/dt = (q_{\max} [S] / K_s + [S]) [X]$$

Donde la velocidad volumétrica r de la Ecuación claramente señala la dependencia del cultivo en función de la concentración de la biomasa, del sustrato y de la afinidad por el sustrato (o por el tipo de sustrato).

Otro factor importante en el estudio de los procesos biológicos es el referente a la conversión del sustrato consumido ya sea hacia la formación de biomasa o a la generación de productos. Tales factores pueden ser expresados por los coeficientes de rendimiento en la formación de biomasa ($Y_{x/s}$) o de formación de producto ($Y_{p/s}$). Los valores de tales rendimientos pueden ser obtenidos empleando las siguientes Ecuaciones:

$$Y_{x/s} = \Delta X / S_c$$

$$Y_{p/s} = \Delta P / S_c$$

Donde: ΔX representa el incremento de la concentración de biomasa en el cultivo, ΔP es el incremento en la formación del producto y S_c indica la concentración del sustrato consumido a lo largo de proceso.

Así, la suma de los rendimientos muestra el destino final de los sustratos consumidos e indican la posible predominancia de una ruta metabólica sobre otra. Por ejemplo, si los valores de $Y_{p/s}$ tienen valores cercanos a 1, entonces la formación de biomasa es casi nula y puede decirse que el proceso es prácticamente desasimilativo.

2.2 El tolueno

El tolueno, también conocido como metilbenceno, fenilmetano o metacida, es un hidrocarburo monoaromático, que junto con el benceno, etilbenceno e isómeros del xileno, constituyen el grupo de los hidrocarburos monoaromáticos comúnmente denominados como BTEX.

La fuente principal del tolueno es el petróleo crudo, otra fracción importante deriva de la destilación del alquitrán de hulla, producto líquido generado de los hidrocarburos que se producen durante la coquificación del carbón (Morrison y Boyd, 1988). Algunos hallazgos también sugieren que el tolueno puede ser formado por vías biológicas. Jutter y Henatsch (1986), detectaron un incremento en las concentraciones de tolueno en zonas anóxicas de lagos prístinos, arguyendo que la fenilalanina pudo ser su principal precursor de este hidrocarburo. Recientemente, Mrowiec y col., (2005) reportaron la biosíntesis de tolueno durante la digestión anaerobia de lodos provenientes de una planta de tratamiento de aguas residuales domésticas.

El tolueno es usado como aditivo antidetonante en diversos productos del petróleo, tales como la gasolina y el diesel. Se estima que en una gasolina común el tolueno representa del 5 al 7% (Inoue, 1983). También es ampliamente usado como solvente orgánico representando hasta el 80% en pinturas, 62% en tintas, 56% en thinners y 51% en adhesivos (Inoue, 1983; Kumai y col., 1983). El tolueno, también es utilizado como materia prima para la fabricación de productos farmacéuticos, colorantes, polímeros, entre otros. Aunado a esto, el tolueno forma parte de la formulación de productos

agroquímicos (Phelps y Young, 2001). Se estima que la producción anual de tolueno, tan sólo en los Estados Unidos, alcanzó los 2.9 billones de toneladas en 1993 (Agencia de Protección al Ambiente de los Estados Unidos, EPA 2006). En México, se estima que la producción de tolueno se incrementa año con año, ya que mientras que en 1985 la producción fue de 220,084 toneladas, para 1987 fue de 313,745. Gran parte de esta producción es destinada para las 4,500 empresas que utilizan tolueno en nuestro país (NOM-047-SSA1-1993).

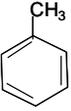
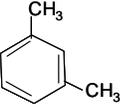
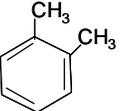
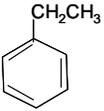
El tolueno es producido en cantidades considerables ya que tiene una amplia variedad de usos. Sin embargo, se convierte en un problema de contaminación ambiental cuando es derramado desde tuberías, refinerías y tanques destinados para el almacenamiento de combustibles. Como ejemplo, en los Estados Unidos, de los 1.4 millones de tanques subterráneos que existen para el almacenamiento de combustibles, el 35% presenta problemas de fugas. En México, los datos sobre derrames de hidrocarburos para el año 2001 fueron estimados en 6,552 toneladas (PEMEX, 2000).

2.2.1 Características fisicoquímicas del tolueno

En la Tabla 2.2 se presentan algunas propiedades fisicoquímicas del tolueno y demás hidrocarburos monoaromáticos (Christensen y Elton, 1996). El tolueno, así como el resto de los BTEX son compuestos no polares, razón por lo que son poco solubles en agua. Si consideramos que la solubilidad de los compuestos en agua generalmente es inversamente proporcional a su peso molecular, podemos considerar que el benceno y el tolueno son de los BTEX más hidrosolubles, por lo que se consideran prioritarios de eliminación ya que además de su toxicidad, son los compuestos que migran más rápidamente en los cuerpos de agua. El coeficiente de partición octanol/agua de los BTEX indica que presentan mayor solubilidad en solventes no polares, es decir son hidrofóbicos, lo que puede influir significativamente sobre el transporte a nivel de membrana en los sistemas biológicos (Sikema y col., 1995). La ley de Henry, que describe el movimiento de los compuestos entre las fases agua y atmósfera, nos indica que el tolueno se encuentra entre los BTEX que tienden a mantenerse en la fase acuosa. Otra característica que presentan los BTEX, es que son compuestos relativamente

resistentes a la oxidación biológica, lo que parece estar relacionado con la estabilidad química que le confiere el anillo aromático (Gibson y Harwood, 2002).

Tabla 2.2 Características fisicoquímicas de los BTEX (Christensen y Elton, 1996).

	Benceno	tolueno	<i>m</i> -xileno	<i>o</i> -xileno	<i>p</i> -xileno	etilbenceno
Estructura Química						
Fórmula química	C ₆ H ₆	C ₇ H ₈	C ₈ H ₁₀	C ₈ H ₁₀	C ₈ H ₁₀	C ₈ H ₁₀
Peso molecular (g/mol)	78	92	106	106	106	106
Solubilidad en agua (mg/l)	1700	515	-	175	198	152
Presión de vapor (a 20° C) (mg Hg)	95.2	28.4	-	6.6	-	9.5
Densidad específica (a 20° C)	0.87	0.86	0.86	0.88	0.86	0.86
Coefficiente de partición octanol-agua a 20° C	2.13	2.69	3.2	2.77	3.15	3.15
Constante de la ley de Henry (a 25° C) (kPa m ³ /mol)	0.55	0.67	0.70	0.50	0.71	0.80
Polaridad	no polar	no polar	no polar	no polar	no polar	no polar

2.2.2 Efectos nocivos del tolueno

Aunque el tolueno no está catalogado como un compuesto cancerígeno (Dean, 1985), sí es considerado como un contaminante prioritario por la US-EPA, ya que provoca diversos efectos nocivos en la salud humana. Se ha encontrado que la inhalación persistente del tolueno puede provocar daños a nivel del cerebelo y tallo cerebral (Fornazzari y col., 2003). Los estudios también indican que el abuso crónico de solventes

como el thinner, causa severos deterioros en diversos sistemas del cuerpo humano, incluyendo el cardiovascular, respiratorio, renal, hepático y sistema inmune (Fornazzari y col., 2003). La sobre exposición ocupacional con tolueno se ha relacionado con la irritación de las membranas mucosas, así como con alteraciones en el sistema endócrino (Snyder, 1987). Casos de estudio con mujeres expuestas al tolueno se han relacionado con el incremento en abortos espontáneos, así como alteraciones en su ciclo menstrual (Lindbohm y col., 1990; Ng y col., 1992).

Debido a lo anterior, los niveles máximos permisibles de tolueno en agua potable son de 1 mg/l (US-EPA, 2006). Para el caso de las normas mexicanas, la Secretaría de Salud estableció los niveles máximos permisibles en 0.7 mg/l de tolueno en agua para uso y consumo humano (NOM-047-SSA1-1993). Tales concentraciones fueron establecidas considerando que por debajo de éstas, el tolueno no causa efectos potenciales en la salud humana.

Los efectos negativos del tolueno también se han observado sobre los microorganismos, al alterar de forma drástica la estructura y función de las propiedades de la membrana. El trabajo de Sikkema y col., (1995) muestra que este hidrocarburo altera de forma considerable la parte lípida de la membrana ya que las disuelve, lo que tendrá repercusiones en el transporte celular. También afecta a las proteínas, desnaturalizándolas lo que seguramente afectará los sistemas de transporte. Los efectos del tolueno también se observan en la pérdida de la fuerza protón motriz y ocasiona daños notables en macromoléculas como RNA y proteínas (Heipieper y de Bont, 1994). Los efectos negativos del tolueno en los microorganismos han sido mitigados por diversos mecanismos de tolerancia. *Pseudomonas putida* S12 desarrolló un sistema de bombeo de solventes que es dependiente de energía (Isken y de Bont, 1996). Este mecanismo mantiene al tolueno y otros solventes orgánicos fuera de la célula. La caracterización de genes e identificación molecular de esta posible bomba de expulsión, muestra una gran similitud con genes que codifican para proteínas que se conocen están involucradas sistemas de expulsión de drogas (por ejemplo resistencia a antibióticos), que es dependiente de una fuerza protón motriz (Kieboom y col., 1998). Otro mecanismo de defensa fue observado por Kobayashi y col. (2000), en *Pseudomonas putida* IH 2000. Cuando esta cepa es crecida en altas concentraciones de tolueno, la membrana externa

secreta vesículas compuestas principalmente de fosfolípidos y lipopolisacáridos en las que se adhiere este hidrocarburo, manteniéndolo así fuera de la célula.

2.2.3 Métodos fisicoquímicos para la eliminación del tolueno

El agua o suelos contaminados por BTEX pueden ser tratados por métodos fisicoquímicos convencionales tales como volatilización, inyección de aire, adsorción y oxidación química. A continuación se describen brevemente dichos tratamientos. El proceso de volatilización consiste en la aplicación de calor al sitio contaminado por lo que el contaminante se transfiere únicamente del agua a la atmósfera (Berger y Mackay, 1994; Sebastiao y Guedes-Soares, 1995; Panday y col., 1997). La inyección de aire en la zona contaminada, con lo cual se logra el arrastre del contaminante del sitio afectado, aunque algunos autores sugieren que, como resultado de la adición de oxígeno, los microorganismos aerobios incrementan su consumo (Christensen y Elton, 1996). En el proceso de adsorción, puede ser usado el carbón activado que adsorbe el contaminante, y posteriormente, colectado. La efectividad de este proceso está relacionada con la magnitud del área superficial de carbón activado y las propiedades que muestra el contaminante tratado. Este tipo de tratamiento normalmente es usado para eliminar bajas concentraciones de contaminantes (Christensen y Elton, 1996). En los métodos químicos se usan agentes oxidantes, los dos compuestos más utilizados son el peróxido de hidrógeno y el permanganato de potasio (Jacobs y Testa, 2003). El peróxido de hidrógeno puede actuar por dos vías, sea produciendo un radical libre, o mediante la oxidación química directa. En ocasiones el peróxido de hidrógeno suele adicionarse junto con sales de hierro generando la denominada reacción de Fenton, que genera un mayor poder oxidante del peróxido (Jacobs y Testa, 2003). Otra alternativa para la destrucción de los BTEX es mediante el empleo de irradiación ultrasónica (Thoma y col. 2006). Los métodos químicos, cuando son aplicados *in situ*, deben ir acompañados de la medición de otros parámetros como son: medición de pH, alcalinidad, contenido de hierro, compuestos orgánicos totales, porosidad y permeabilidad, entre otros, con la finalidad de controlar mejor el proceso.

Como puede observarse, aunque la mayoría de los tratamientos mencionados, son eficientes, pero tienen la gran desventaja de simplemente transferir el contaminante de un medio a otro, además de ser costosos por la energía requerida para su aplicación.

2.2.4 Métodos biológicos para la eliminación de tolueno

2.2.4.1 Métodos aerobios

Ha sido ampliamente observado que todos los BTEX pueden ser metabolizados por los microorganismos en condiciones aerobias (Haigler y col., 1992; Duetz y col., 1994; Rozkov y col., 1998; León y col., 1999; Yerushalmi y col., 1999). Debido a esto, la mayoría de las plantas de tratamiento de aguas residuales relacionadas con la industria petroquímica emplean sistemas de aireación. Estos procesos a menudo incluyen sistemas de separación agua/aceite y la adición de productos químicos como coagulantes y floculantes (Chin, 1994). Sin embargo, además de los costos de inversión y operación requeridos para el suministro del oxígeno y la posible generación de sólidos volátiles que es otra forma de trasladar la contaminación, el empleo de procesos aireados puede favorecer el arrastre de los contaminantes orgánicos volátiles (Bischof y col., 1996). Algunos estudios han mostrado que, dependiendo del sistema de aireación empleado, más del 30% de estos compuestos orgánicos pueden ser arrastrados (Zytner y col., 1997).

Existe una amplia variedad de microorganismos aerobios capaces de consumir el tolueno, los más estudiados pertenecen al género *Pseudomonas*. Es en este modelo donde se han dilucidado algunos de los mecanismos bioquímicos de su oxidación a CO₂. Se ha encontrado que, durante la oxidación aerobia del tolueno, los microorganismos no sólo emplean al oxígeno como aceptor final de electrones, sino también como reactante para lograr desestabilizar el anillo aromático. De forma general, el metabolismo del tolueno, (así como de otros hidrocarburos monoaromáticos) se ha dividido en dos grandes rutas: periférica y central (Schink y col., 1992; Fuchs y col., 1994). En la ruta periférica, los compuestos son transformados en intermediarios centrales aromáticos, las enzimas que catalizan dicha transformación a menudo son codificadas por genes albergados en plásmidos conocidos como TOL y generalmente son inducidas por su substrato correspondiente. En la ruta central, el intermediario es desaromatizado y transformado a productos comunes como acetyl-CoA. Ambos tipos de reacciones son realizadas por una variedad de monooxigenasas y dioxigenasas que incorporan uno o dos átomos de oxígeno al anillo aromático. El ataque de ambas enzimas puede estar localizado entre dos átomos de carbono hidroxilado (ruta *orto*), o bien, adyacente al átomo de carbono hidroxilado (ruta *meta*) (Wilson y Bouwer, 1997).

Se han identificado cinco rutas de oxidación del tolueno en los microorganismos aerobios (Figura 1.1). La primera ruta fue hallada en el plásmido TOL de *Pseudomonas putida* PaW1 (Williams y Murray, 1974), en este trabajo se observó que la oxidación del tolueno se inicia por el ataque al grupo metil, lo que más tarde da lugar a la formación de catecol, que es posteriormente sometido a una ruptura *meta*. La segunda ruta identificada, en *Pseudomonas putida* F1, utiliza dioxigenasas para adicionar dos átomos de oxígeno al anillo aromático (Spain y Gibson, 1988). En *Pseudomonas cepacia* G4 se encontró la tercera ruta, en donde la oxidación de tolueno se inicia por una *orto*-monooxigenasa para formar *o*-cresol (Shields y col., 1989). La cuarta ruta ocurre en *Pseudomonas pickettii* PK01, donde se encontró que usa una *meta*-monooxigenasa para producir *m*-cresol (Olsen y col., 1994). La quinta ruta fue encontrada en *Pseudomonas mendocina* KR1, donde se demostró que el tolueno es atacado por una *para*-monooxigenasa para generar *p*-cresol (Whited y Gibson, 1991), que posteriormente es sometido a una ruptura *orto*.

A pesar de la variedad catabólica de los microorganismos aerobios, sólo se generan tres intermediarios comunes: el catecol, el protocatecuato y el gentisato. Tales compuestos son posteriormente transformados a intermediarios comunes como pueden ser el fumarato, piruvato o acetato, que a su vez sirven como substrato para algunas rutas oxidativas por ejemplo la del ciclo de Krebs o de la β -oxidación (Sims y Overcash, 1983), donde son asimilados por la célula u oxidados hasta CO_2 (Parés y Juárez, 1997). En la siguiente Ecuación se presenta el balance estequiométrico cuando el tolueno es oxidado a CO_2 en presencia de oxígeno.



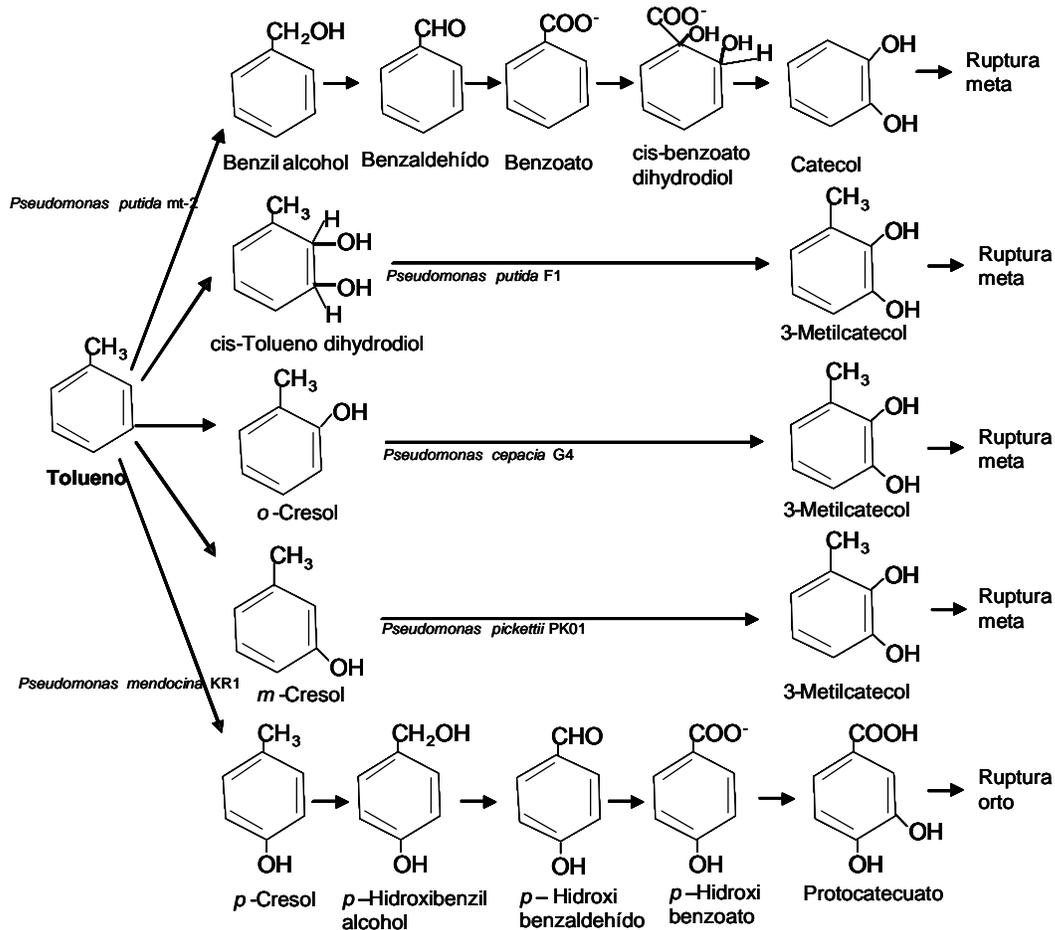


Figura 2.3 Cinco rutas aerobias que emplean microorganismos del género *Pseudomonas* para la oxidación de tolueno (Gulensoy y Álvarez, 1999).

El consumo de los BTEX bajo condiciones aerobias suele ser más rápido que en los procesos anóxicos. Esto podría estar relacionado con algunos parámetros cinéticos, como por ejemplo los valores de K_s que presentan los microorganismos para el consumo de tolueno en presencia de oxígeno comparado con otros aceptores de electrones, por ejemplo el nitrato. Se ha encontrado que bajo condiciones aerobias los valores de K_s oscilan entre 0.15 y 2.7 mg tolueno/l, mientras que algunos estudios bajo condiciones desnitrificantes muestran valores de K_s entre 8.6 y 13.8 mg tolueno/l (Chang y col., 1993; Álvarez y col., 1994; Kelly y col., 2000; Rogers y col., 2000, Reardon y col., 2002). Tales ensayos fueron realizados con concentraciones de tolueno que oscilaron entre 30 y

100 mg/l y concentraciones de inóculo entre 1.6 y 250 mg biomasa/l. Aunque cabe señalar que dichos valores no se deben generalizar ya que estos pueden depender entre otras causas del ambiente del cual provino el inóculo, así como del tipo de microorganismo empleado. Por ejemplo, en un estudio sobre la cinética de eliminación de tolueno bajo condiciones aerobias realizado en botellas serológicas inoculadas con material arenoso de acuífero se encontraron valores de K_s de 17.4 mg tolueno/l (Álvarez y col., 1991).

Estudios en lote bajo condiciones aerobias también muestran eficiencias de consumo de tolueno del 100%, no obstante gran parte del sustrato consumido es canalizado hacia la formación de biomasa, alcanzando rendimientos celulares cercanos a 0.5 (Chang y col., 1993; Reardon y col., 2000). La generación de biomasa, aunado al arrastre del sustrato por oxígeno, así como la baja solubilidad de este en agua, podría ser una desventaja en la aplicación de procesos depuradores aerobios. Esto ha motivado a considerar a los procesos anóxicos como alternativas viables en el tratamiento de sitios contaminados con hidrocarburos aromáticos.

2.2.4.2 Métodos anóxicos

Anteriormente se pensaba que la oxidación de los hidrocarburos monoaromáticos, incluyendo al tolueno, sólo era factible mediante condiciones aerobias. No fue hasta la década de 1980 con trabajos pioneros como los publicados por Kuhn y col., (1985), Vogel and Grbic-Galic (1986), Zeyer y Kunh (1987), Lovley y col., (1989) y otros mas, que fue mostrada la eliminación de BTEX por microorganismos anaerobios. Ahora se sabe que el tolueno puede ser oxidado bajo diferentes condiciones anóxicas, incluyendo metanogénicas (Grbic-galic y Vogel, 1987; Edwards y Grbic-Galic, 1994), sulfato reductoras (Beller y col., 1992; Edwards y col., 1992), hierro reductoras (Lovley y Lonergan, 1990; Lovley y col., 1994), y desnitrificantes (Biergert y Fuchs, 1995, Phelps y Young, 1999, Pelz y col., 2001).

La eliminación del tolueno bajo las diferentes condiciones anóxicas se ve favorecida entre otras causas, porque al ser un compuesto altamente reducido, la energía libre de Gibbs generada durante su oxidación es alta, y la cual podría ser utilizada para los requerimientos celulares o disiparse en forma de calor. En la Tabla 2.3, se muestran las

Ecuaciones con la estequiometría y la energía libre generada cuando los microorganismos emplean al tolueno como donador de electrones y aceptores de electrones distintos del oxígeno. Se puede observar que la energía libre generada bajo condiciones desnitrificantes es relativamente menor a la generada bajo condiciones aerobias mostrada anteriormente. No obstante, bajo ciertas condiciones (como manejar una relación C/N cercana a la estequiométrica) el proceso desnitrificante podría presentar la ventaja de ser un proceso desasimilativo, en cambio, bajo condiciones aerobias los rendimientos de biomasa pueden alcanzar valores hasta de 0.5. Como se dijo anteriormente, esto podría representar un problema si se persiguen fines prácticos.

Tabla 2.3 Estequiometría y energía libre generada por la oxidación de tolueno en procesos anóxicos (Heider y col., 1999).

Proceso anóxico	ΔG° = KJ/mol tolueno
Metanogénesis: $C_7H_8 + 7.5 H_2O \rightarrow 4.5 CH_4 + 2.5 HCO_3^- + 2.5 H^+$	- 131
Sulfato reducción: $C_7H_8 + 4.5 SO_4^{2-} + 3 H_2O \rightarrow 7 HCO_3^- + 2.5 H^+ + 4.5 HS^-$	- 205
Hierro reducción: $C_7H_8 + 94 Fe (OH)_3 \rightarrow 7 FeCO_3 + 29 Fe_3O_4 + 145 H_2O$	- 3398
Desnitrificación: $C_7H_8 + 7.2 NO_3^- + 0.2 H^+ \rightarrow 7 HCO_3^- + 3.6 N_2 + 0.6 H_2O$	- 3554

Los aspectos bioquímicos de la ruta de oxidación del tolueno bajo condiciones desnitrificantes inician con los trabajos de Altenschmidt y Fuchs, (1991, 1992). Ellos propusieron que el tolueno en una primera etapa sufría una hidroxilación en el grupo metilo, generando benzil alcohol, posteriormente benzaldehído y teniendo como intermediario aromático central al benzoil-CoA. La propuesta se basó en la acumulación de benzilalcohol y benzaldehído en células en suspensión cultivadas en presencia de tolueno, aunque cabe mencionar que estos experimentos fueron realizados a 5 °C (condiciones no fisiológicas), con el propósito de disminuir la actividad microbiana. Otra hipótesis, propuesta por Evans y col. (1991, 1992), postula que el grupo metilo del

tolueno sufre un ataque ya sea por succinyl-CoA o por Acetil CoA. El primer caso fue postulado por la presencia de bencilsuccinato y bencilfumarato en el cultivo, lo que llevo a los autores a considerar a dichos substratos como productos finales del metabolismo del tolueno (ahora se sabe que son intermediarios). En el caso del ataque por acetil-CoA se obtuvo como intermediario principal benzoil-CoA pasando por la formación de fenilpropionil-CoA. En ninguno de los dos casos se han podido purificar o medir las enzimas propuestas para sustentar tales hipótesis. Por otro lado, es muy probable que la acumulación de estos intermediarios encontrados por tales autores se debiera a una deficiencia de poder oxidante, ya que los estudios se realizaron con 1 mM de tolueno en presencia de 5 mM de nitrato y, de acuerdo con la estequiometría de la reacción, se requieren 7.2 mM de nitrato para oxidar todo el tolueno a bióxido de carbono.

Actualmente se sabe por estudios realizados *in vitro* en cepas desnitrificantes como *Thauera aromatica* y *Azoarcus sp*, que el tolueno es transformado a benzoil-CoA y su catabolismo inicia con una reacción de adición donde su grupo metilo se une al doble enlace del fumarato para formar bencilsuccinato (Biegert y col., 1996; Beller y Spormann, 1997 a, b; Leutwein y Heider, 1999; Heider y col. 1999). Las etapas propuestas, así como las enzimas que catalizan dichas reacciones se muestran en la Figura 2.2.

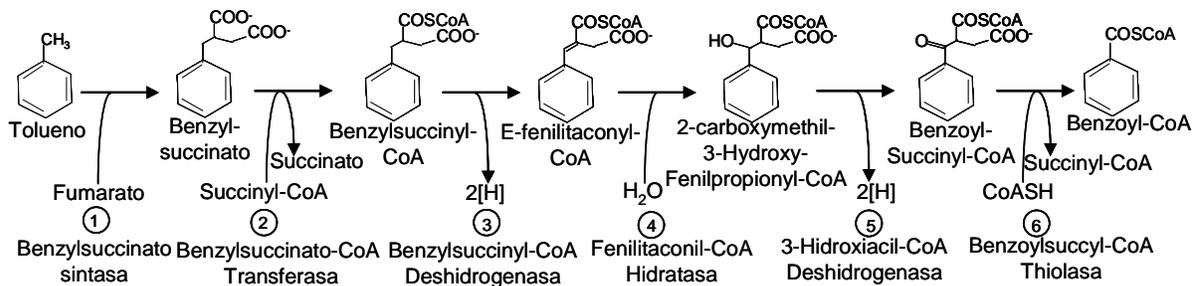


Figura 2.4 Ruta propuesta de la oxidación anaerobia del tolueno (Heider y col., 1998).

La primera reacción es catalizada por la enzima benzilsuccinato sintasa, que es inducida en presencia de tolueno y es altamente sensible al oxígeno, exhibiendo una vida media de 20 a 30 segundos (Leuthner y col., 1998). La enzima presenta un cofactor flavin redox-activo y tiene una masa de 220 kDa, su secuencia genética muestra una fuerte similitud

con enzimas que contienen radicales glicil (como la piruvato formato liasa de *E.coli*), que se ha relacionado con el centro activo de la enzima (Leuthner y col., 1998). Un mecanismo de reacción propuesto se muestra en la Figura 2.3. De manera general, se ha planteado que la forma activa de la enzima que contiene el radical glicil, sustrae un átomo de hidrógeno del tolueno para generar un radical benzil. Este radical se une posteriormente al doble enlace del fumarato generando un radical benzilsuccinil. Finalmente la enzima dona el átomo de hidrógeno sustraído al radical benzilsuccinil formando así benzilsuccinato y al mismo tiempo regenerando la enzima (Heider y col. 1998).

La evidencias experimentales muestran que este mecanismo es similar en diversos procesos anóxicos, ya que se ha encontrado también ocurre durante la oxidación del tolueno bajo condiciones sulfato reductoras (Beller y Sporman, 1997), hierro reductoras (Kane y col., 2002) y metanogénicas (Washer y Edwards, 2007). También, los estudios muestran que la adición de fumarato podría ser un mecanismo general de activación del anillo aromático bajo condiciones anaerobias, ya que se han encontrado reacciones similares durante la oxidación de otros hidrocarburos como los xilenos (Beller y Spormann, 1997; Beller y Spormann, 1999; Elshahed y col., 2001; Krieger y col., 1999), *m* y *p*-cresol (Muller y col., 1999; Muller y col., 2001), metil naftaleno (Annweiler y col., 2000), e incluso en la activación de algunos alcanos (Kropp y col., 2000; Rabus y col., 2001).

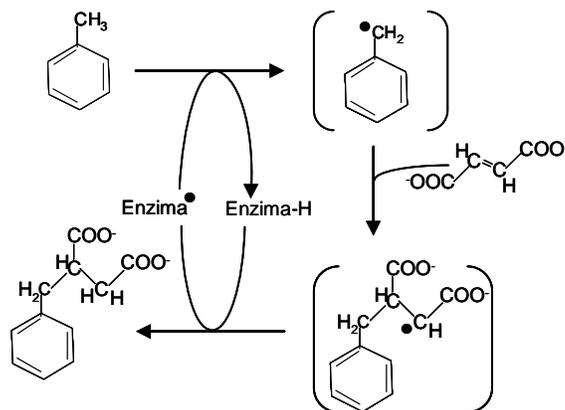


Figura 2.5 Mecanismo de reacción propuesto para la enzima benzilsuccinato sintasa

Se ha propuesto que la oxidación posterior de benzilsuccinato a benzoil-CoA procede mediante una vía análoga a la β -oxidación (Heider y col., 1998). Una vez que el tolueno es transformado a Benzoil-CoA, este a su vez sufre una serie de reacciones de oxidación-reducción para ser transformado en acetil-CoA y CO_2 (Figura 2.4).

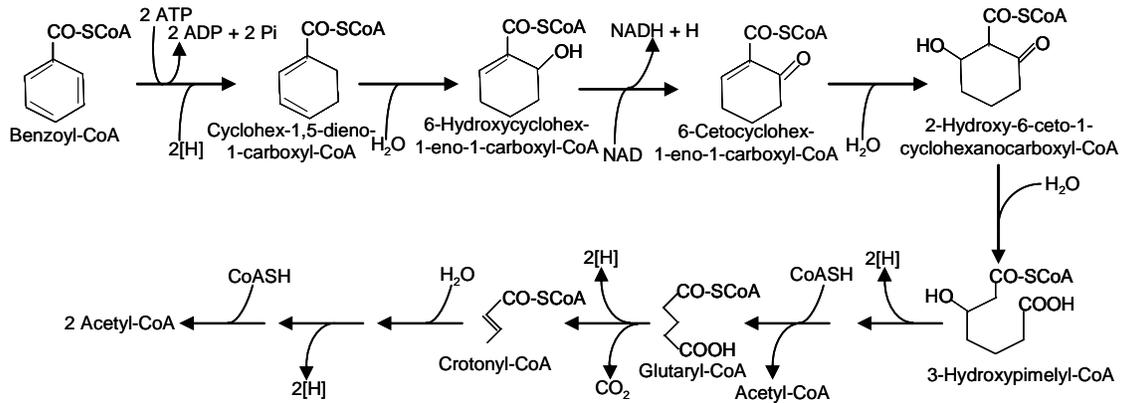
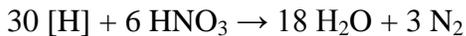


Figura 2.6 Mecanismo de reacción propuesto para la oxidación de benzoil-CoA bajo condiciones anaerobias.

Si el acetil-CoA es mineralizado a su vez en CO_2 , la oxidación de benzoil-CoA (derivado del tolueno) generará 7 moléculas de CO_2 . La estequiometría de la oxidación completa de benzoato bajo condiciones desnitrificantes puede ser descrita en dos ecuaciones que se muestran a continuación (Harwood y col., 1999).



2.3 Eliminación de tolueno por desnitrificación

2.3.1 Desnitrificación con tolueno como única fuente orgánica y en mezcla con otros sustratos.

Las primeras evidencias que mostraron que el tolueno podía ser metabolizado bajo condiciones desnitrificantes fueron publicadas por Zeyer y col., (1986). Desde entonces

una diversidad de estudios se han realizado revelando que el tolueno es de los hidrocarburos más fácilmente consumibles dentro del grupo de los alkyl bencenos (Rueter y col., 1944; Rabus y col., 1996), razón por la cual ha sido empleado como compuesto modelo para dilucidar aspectos microbiológicos, fisiológicos, bioquímicos y genéticos de la oxidación de hidrocarburos monoaromáticos en ausencia de oxígeno.

Los estudios han mostrado que los microorganismos desnitrificantes capaces de consumir tolueno están ampliamente distribuidos en la naturaleza, ya que se han aislado de diversos ambientes tales como suelos agrícolas, suelos de bosques prístinos, composta, mantos acuíferos, playas marinas y sitios contaminados por compuestos derivados del petróleo (Fries y col., 1994). De dichos ambientes se han logrado aislar y caracterizar algunas especies bacterianas importantes en el aporte de datos bioquímicos y genéticos tales como *Thauera aromatica* y *Azoarcus evansii*, que originalmente habían sido ubicadas dentro del género de *Pseudomonas* (Tschech y Fuchs, 1987; Dolfing y col., 1990; Anders y col., 1995; Song y col., 1998). Por otro lado, se han desarrollado estudios tratando de entender la conducta de distintas fuentes de inóculos desnitrificantes, cultivados en presencia de tolueno. Por ejemplo, Phelps y Young, (1999) condujeron estudios comparativos entre sedimentos de acuíferos contaminados por hidrocarburos y acuíferos prístinos, encontrando que los inóculos obtenidos de los sitios contaminados consumió más rápidamente el tolueno comparado con el obtenido de sitios no contaminados, incluso en algunos de estos últimos no se presentó consumo. Este tipo de evidencias ha llevado a algunos investigadores a proponer que para que el tolueno sea consumido es necesaria una adaptación previa de los microorganismos con el hidrocarburo. Sin embargo, estos resultados contrastan con otros trabajos donde se ha encontrado que consorcios desnitrificantes sin exposición previa a hidrocarburos son capaces de iniciar casi de forma inmediata el consumo de tolueno (Courseil y col., 1998; Peña-Calva y col., 2004).

Los trabajos pioneros de Zeyer (realizados en columnas en continuo inoculadas con sedimentos de acuífero contaminados con hidrocarburos) mostraron que el tolueno podía ser eliminado bajo condiciones desnitrificantes (Zeyer y col., 1986). Sin embargo, en dicho trabajo sólo se cuantificó la eliminación de tolueno y la formación de su producto en forma de CO₂, pero ni el consumo de nitrato, ni la cuantificación de nitrógeno

molecular no fueron medidos. Esta tendencia se ha presentado en varios trabajos donde sólo se mide el consumo de los sustratos sin mencionar los rendimientos de la formación de productos (Shocher y col., 1991; Hutchins y col., 1991; Evans y col., 1991, 1992; Álvarez y Vogel, 1995; Phelps y young, 1999; Shinoda y col., 2004, Da silva y col, 2005). Por otro lado, cabe mencionar que la mayoría de los trabajos se han realizado en cultivo en lote y aún son escasos los reportes sobre la conducta desnitrificante en presencia de tolueno en cultivo continuo.

Datos cinéticos de consumo de tolueno fueron reportados por Elmen y col., (1997), que autores evaluaron la eliminación de tolueno bajo condiciones desnitrificantes empleando *Azoarcus tolulyticus*. Los resultados mostraron velocidades específicas de consumo de tolueno de 0.89 mg de tolueno/mg biomasa-d. También encontraron que a concentraciones mayores a 55 mg/l de tolueno, la velocidad específica de consumo de tolueno decreció. En otro trabajo, Álvarez y col., (1994) reportaron velocidades de consumo de 1.25 mg tolueno/mg biomasa-d, sin embargo, dicho valor fue generado de un sólo ensayo cinético, ya que no se probaron diferentes concentraciones iniciales del hidrocarburo. Peña-Calva y col., (2004), estudiaron la oxidación de tolueno empleando un consorcio desnitrificante sin contacto previo con hidrocarburos, encontrando velocidades específicas de consumo de tolueno de 0.025 mg C-tolueno/mg SSV-d a una concentración de 70 mg de C-tolueno/l. A concentraciones mayores de tolueno (80 y 100 mg C/l) se observó que la velocidad de consumo descendió en un 25 %. Estos resultados han podido evidenciar que, a concentraciones de tolueno mayores que 80 mg/l, la velocidad de consumo de tolueno disminuye. Aunque no se debe generalizar, ya que como bien se observa, la exposición previa del inóculo al hidrocarburo, así como el tipo de inóculo ya sea axénico o consorcio influye sobre los valores cinéticos.

Los trabajos citados anteriormente, han empleado al tolueno como única fuente orgánica, no obstante, en los ambientes contaminados es muy común encontrar a los compuestos diana en mezcla con muchos otros sustratos, los cuales pueden influir en la velocidad y magnitud de su eliminación. Por lo tanto, resulta de gran interés estudiar el consumo de tolueno en presencia de otros sustratos.

Los estudios del consumo de tolueno en interacción con otras fuentes orgánicas han sido en su mayoría bajo condiciones aerobias. Álvarez y col., (1998) encontraron que la

presencia de benzoato estimuló el consumo de tolueno bajo condiciones aerobias, lo que fue atribuido a la proliferación de microorganismos consumidores específicos, aunque no mostraron datos experimentales. Un efecto positivo, en la eliminación de tolueno, también fue encontrado en presencia de glucosa (Nahar y col., 2000). En otro estudio Chang y col. (1993) evaluaron el consumo de tolueno y *p*-xileno en cepas de *Pseudomonas*, encontrando un comportamiento cometabólico del xileno en presencia de tolueno. En este caso, el tolueno fue considerado como el substrato de crecimiento, tomando en cuenta el término de cometabolismo propuesto por Dalton, que lo define como “la transformación de un substrato que no es usado para el crecimiento, en presencia obligada de otro substrato que es usado para el crecimiento microbiano” (Dalton y Stirling, 1982). Un efecto similar fue observado con tricloroetileno en presencia de tolueno (Kelly y col., 2000). También se han encontrado efectos de inhibición competitiva de tolueno en presencia de fenol (Lovanh y Álvarez, 2004) o de represión catabólica por la presencia de succinato o acetato (Duetz y col., 1994; Lovanh y Álvarez, 2004). En contraste con este último trabajo, se encontró que el acetato provoca efectos positivos en el consumo de hidrocarburos, aunque no precisamente sobre el tolueno sino en compuestos policíclicos como naftaleno y fenantreno (Edihara y Bishop, 2002). Aunque en muchos de estos trabajos sólo mencionan que mejoró el consumo del hidrocarburo, no se cuantifica la magnitud de éste ni la descripción de productos finales. Los reportes de la eliminación anaerobia de tolueno en presencia de substratos orgánicos de fácil oxidación también han sido publicados, aunque en menor proporción que los aerobios. Edwards y Grbic-Galic (1994), encontraron que la eliminación de tolueno bajo condiciones metanogénicas es inhibida por la presencia de fuentes orgánicas alternas tales como acetato y glucosa. Su y Kafkewitz (1994), reportaron que una cepa de *Pseudomonas maltophilia* fue capaz de consumir simultáneamente tolueno y succinato bajo condiciones desnitrificantes. Sin embargo, no fueron determinados rendimientos de biomasa, ni de CO₂ o N₂. Por otro lado, no se presenta información sobre si un substrato más fácilmente oxidable, como el succinato, tuvo un efecto sobre el consumo de tolueno. En otro trabajo, Courseuil y col., (1998) observaron el efecto del etanol sobre el consumo microbiano de BTX bajo diferentes condiciones anóxicas tales como desnitrificantes, sulfato reductoras, hierro reductoras y metanogénicas. En todos los casos, el tolueno fue

eliminado, aunque su consumo inició después de que el etanol había sido consumido. El etanol tampoco afectó el consumo de tolueno bajo condiciones desnitrificantes, mientras que bajo condiciones sulfato reductoras la presencia de etanol tuvo un efecto positivo sobre el tolueno, ya que aumentó su velocidad de consumo. En contraste, se observó que bajo condiciones hierros reductoras y metanogénicas, el etanol afectó negativamente la velocidad de consumo del hidrocarburo. Los autores sugirieron que el efecto positivo del etanol sobre el consumo de tolueno encontrado bajo condiciones sulfato reductoras, pudo deberse a un crecimiento de microorganismos consumidores de tolueno durante el consumo del etanol, aunque no fueron mostradas evidencias experimentales para sustentarlo.

Estos trabajos ponen en evidencia que el consumo de tolueno se ve afectado por la presencia de fuentes orgánicas alternas. También se ha puesto de manifiesto que un tipo de substrato puede tener efectos distintos dependiendo del proceso en que se encuentre. Por otro lado, se ha podido observar que, en muchos de los trabajos publicados, el efecto de la fuente orgánica alterna sólo se mide mediante el consumo del hidrocarburo principal. Por lo tanto, profundizar en algunos aspectos, como por ejemplo, la evaluación del substrato alterno sobre las velocidades de consumo del hidrocarburo, así como el destino de éste, podría resultar de gran importancia en la implementación de tratamientos biológicos encaminados a su eliminación.

2.3.2 Uso de herramientas moleculares en la eliminación de tolueno

A fin de tener un mejor entendimiento de los roles y diversidad de las poblaciones bacterianas, la detección y seguimiento de la expresión de genes bacterianos mediante técnicas moleculares, se está convirtiendo en un aspecto integral de los sistemas de biorremediación. Al respecto, es frecuente preguntarse si un ecosistema funcionalmente estable implica necesariamente una comunidad persistente (Fernández y col., 1999), o si cambios ambientales, entre ellos el tipo y concentración de nutrientes, pueden determinar el tipo de poblaciones presentes en un consorcio, o en dado caso, si los cambios ambientales sólo modifican el metabolismo de la población microbiana.

Una variedad de métodos se han desarrollado para tratar de entender la diversidad y abundancia de microorganismos o secuencias genéticas de interés. Entre estos podemos

mencionar el método de electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE), que se basa en la separación de fragmentos de genes del mismo tamaño obtenidos por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El método es de gran utilidad para analizar la diversidad genética de un consorcio de poblaciones microbianas (Muyzer y col., 1993; Zoizumi y col., 2002). Otro método, que se ha desarrollado recientemente es el de PCR en tiempo real (RT-PCR), donde es posible cuantificar en tiempo real la expresión o presencia de genes microbianos. El método presenta bondades como son alta sensibilidad, una alta especificidad y su análisis es relativamente rápido en comparación con otros métodos de PCR (Beller y col., 2002).

Un ejemplo de la implementación de la técnica de DGGE sobre consorcios microbianos involucrados en la eliminación de hidrocarburos, fue reportado por Macnaughton y col., (1999). Estos autores investigaron la estructura de las comunidades microbianas de sitios contaminados y no contaminados por hidrocarburos del petróleo. El análisis de DGGE de los sitios no contaminados reveló un patrón de bandas donde se distinguía el predominio de ciertas poblaciones microbianas. Dicho perfil desapareció de los sitios contaminados, indicando que la estructura y diversidad de las poblaciones bacterianas había cambiado substancialmente. En otro trabajo publicado por Roling y col. (2001), relacionaron la estructura de la comunidad microbiana, el proceso reductivo y el grado de eliminación de contaminantes presentes en sitios contaminados. Los resultados mostraron la presencia, en el sitio contaminado, de dos procesos reductivos físicamente separados, encontrando por un lado la hierro reducción y por otro la desnitrificación. El análisis del DGGE reveló una estrecha relación entre el proceso reductivo dominante y el perfil de bandas presentes. Recientemente, An y col., (2004), estudiaron la eliminación de tolueno acoplada a la nitrato reducción empleando fuentes de inóculo de ecosistemas terrestres y marinos, utilizándose la técnica del DGGE para analizar la estructura microbiana. Los resultados arrojados mostraron que la velocidad de eliminación del tolueno se vio afectada por la presencia de hidrocarburos alternos. Por otro lado el análisis de DGGE permitió establecer diferencias entre la estructura de la comunidad microbiana de los ecosistemas terrestres y marinos.

Aunque los resultados generados en estos estudios muestran la capacidad del método para detectar diferencias entre consorcios sometidos a distintas condiciones, muchos de estos

se han realizado con un sólo tipo de sustrato. La implementación del método en el estudio del comportamiento de eliminación de una mezcla de compuestos orgánicos podría ser de gran utilidad en el conocimiento de la relación entre la eliminación de compuestos en mezclas y la estructura de la comunidad microbiana.

El uso del PCR en tiempo real sobre la expresión de genes involucrados en la actividad catabólica del tolueno, inició después de la elucidación de la ruta catabólica del mismo bajo condiciones anóxicas (Heider y col., 1998). Entre las reacciones enzimáticas involucradas en la ruta catabólica, destaca la de la benzilsuccinato sintasa, ya que es la responsable de la desactivación de anillo aromático del tolueno. Los trabajos pioneros sobre la cuantificación de genes que codifican para dicha enzima, así como la relación que guarda con el metabolismo anóxico del tolueno fueron publicados por Beller y col., (2002). Los autores usaron el método de RT-PCR para cuantificar los genes *bssA* (que codifican para la subunidad α de la enzima benzilsuccinato sintasa), así como el gen 16S DNAr para estimar el incremento total de bacterias involucradas en el proceso. El trabajo se realizó en microcosmos inoculados con 4 distintos sedimentos obtenidos de sitios contaminados con hidrocarburos, los cuales fueron sometidos a condiciones desnitrificantes y alimentados con 3 mg /l de tolueno y de 50 a 100 mg/l de etanol. En 3 de los sedimentos usados se presentó una correlación entre el incremento en el número de copias del gen *bssA* y un aumento en el consumo de tolueno por los microorganismos desnitrificantes. En estos también se observó que el etanol no tuvo ningún efecto sobre el consumo de tolueno. No obstante, en ensayos inoculados con un cuarto sedimento se encontró que el etanol tuvo un efecto positivo en el tiempo de consumo de tolueno reduciéndolo de 50 a 15 días. Sin embargo, problemas en el análisis molecular de muestras tomadas en estos experimentos no permitieron encontrar alguna relación entre el consumo de tolueno y la expresión de los genes cuantificados. Otro trabajo relacionado con la cuantificación del gen catabólico *bssA* y el consumo de tolueno, aunque realizado en condiciones metanogénicas, fue publicado por Da Silva y Álvarez, (2004). El trabajo se realizó en columnas que fueron empacadas con sedimentos de acuífero e inoculadas con consorcios microbianos que habían sido expuestos a hidrocarburos aromáticos. En los resultados se encontró que el mayor número de copias del gen *bssA* ocurrió en los ensayos que exhibieron una mayor velocidad de consumo de tolueno. Los resultados

encontrados sugieren que este gen podría ser un biomarcador útil en el análisis de muestras ambientales donde se involucra la eliminación del tolueno.

3. JUSTIFICACIÓN

La contaminación del agua por hidrocarburos aromáticos y compuestos nitrogenados es un problema prioritario de salud humana y ambiental. Se han desarrollado diversos métodos fisicoquímicos para su eliminación entre los que se encuentran la volatilización, la adsorción y la oxidación química. Si bien estos métodos alcanzan altas eficiencias de eliminación, su uso se ve limitado por sus altos costos y por los problemas de manejo y operación, además de que algunos sólo trasladan el contaminante de un ambiente a otro. Una alternativa viable son los procesos biológicos, destacando entre estos la desnitrificación, donde es posible la eliminación simultánea de carbono y nitrógeno. Si bien existen varios estudios sobre la eliminación de tolueno muchos de ellos se han realizado en lote, además los trabajos en continuo son escasos y muchos de ellos se han realizado con tolueno como única fuente de carbono. Asimismo, en muchos trabajos sólo se determina el consumo de los sustratos, mientras que variables de respuesta como rendimiento de productos o velocidades específicas de consumo de sustratos, muchas veces no son consideradas. Por otro lado, con el desarrollo de las técnicas de biología molecular, han surgido nuevos enfoques, que empleados como herramientas de análisis podrían aportar más datos en el conocimiento de la fisiología del proceso desnitrificante. En consecuencia, el presente trabajo tiene la finalidad de proporcionar información fisiológica sobre la desnitrificación en cultivo en lote y en continuo, empleando al tolueno como fuente de carbono y energía, haciendo la evaluación a través de variables de respuesta como son eficiencias de consumo, rendimiento de productos y velocidades específicas de consumo de sustrato. Se hizo énfasis en el estudio de la influencia de una fuente fácilmente oxidable sobre la eliminación de dicho hidrocarburo. El trabajo también se apoyó en algunos métodos de biología molecular con el objeto de relacionar los aspectos fisiológicos con la estructura de la comunidad microbiana.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar y entender el efecto de una fuente fácilmente oxidable como el acetato, sobre la mineralización de tolueno bajo condiciones desnitrificantes, así como elucidar las interacciones entre las respuestas fisiológicas del consorcio con su estructura en términos de comunidades microbianas.

4.2 Objetivos específicos

Evaluar y entender en cultivo continuo, el proceso desnitrificante en presencia de diferentes velocidades de carga de tolueno como única fuente de energía y en mezcla con acetato como fuente orgánica alterna fácilmente oxidable.

Analizar y cuantificar, la relación entre la fisiología del proceso desnitrificante y la estructura de la comunidad microbiana mediante la técnica molecular de DGGE.

Evaluar y entender a través de estudios cinéticos, en cultivo en lote, el efecto del acetato sobre la velocidad específica de consumo de tolueno en la mineralización de tolueno bajo condiciones desnitrificantes.

Estudiar bajo las condiciones de cultivo en lote antes mencionadas, la relación entre la fisiología desnitrificante y la cuantificación del gen catabólico del tolueno *bssA* para obtener evidencias entre población y metabolismo.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 MATERIALES

5.1.1 Diseño y operación del reactor UASB.

Los experimentos en cultivo continuo se realizaron en reactores anaerobios de lecho de lodos con flujo ascendente (UASB: Upflow Anaerobic Sludge Blanket). Se construyeron 3 reactores de vidrio con las siguientes características: 50 cm de largo y 6.6 cm de diámetro interno. La parte superior de los reactores presentaba un estrechamiento con la finalidad de dirigir el biogas generado a la campana separadora de líquido-gas-biomasa (Figura 5.1).

Los reactores fueron mantenidos a una temperatura de 30° C mediante un calentador Termo Haake (mod. B3) que conduce agua a temperatura constante hasta la chaqueta del reactor. El flujo a tratar en los reactores fue adicionado por una bomba Masterflex con velocidad fija de 2 rpm (Cole parmer, mod. 7543-02). La bomba fue controlada por un temporizador, para mantener un tiempo de residencia hidráulico (TRH) de 2 días. Los reactores fueron operados sin control de pH. Como se observa en la Figura 5.1, el recipiente de alimentación con la fuente de carbono (acetato y/o tolueno) fue mantenido a una temperatura de $5 \pm 2^\circ$ C mediante un refrigerante, con el fin de evitar la pérdida del compuesto por volatilización. Para la medición del biogas, la campana separadora líquido-gas-biomasa del reactor, estaba conectada a una columna de vidrio invertida con una solución saturada de cloruro de sodio a pH 3, para evitar que el CO₂ producido se disolviera en el líquido.

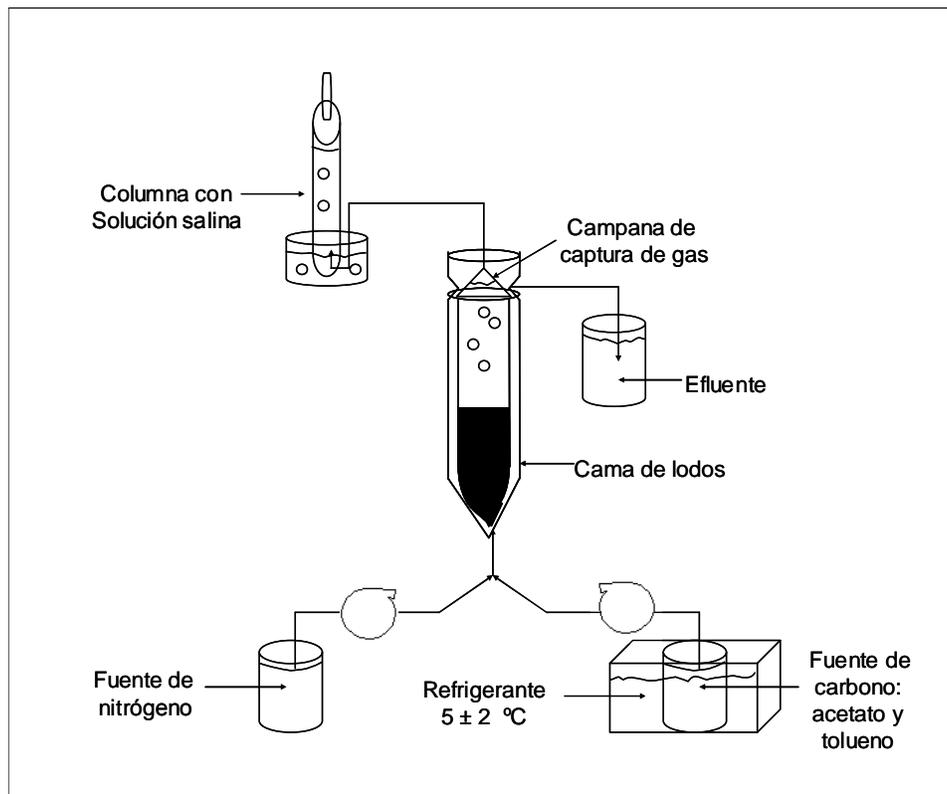


Figura 5.1 Esquema del reactor desnitificante UASB

5.1.2 Botellas serológicas

Los ensayos cinéticos en lote se realizaron en botellas serológicas de 60 ml. Cada botella fue una unidad experimental independiente y después de su muestreo se descartó. Cada botella se inoculó con $1 \pm 0.1 \text{ g SSV/l}$, después se adicionó medio de cultivo hasta alcanzar un volumen de trabajo de 50 ml manteniendo un espacio de cabeza de 10 ml. Las botellas fueron cerradas con tapones de hule y selladas con arillos metálicos para mantener condiciones herméticas. Para desplazar el nitrógeno y el oxígeno del espacio de cabeza, se utilizó una corriente de helio por 5 minutos. Al inicio de cada ensayo, se tomó una muestra gaseosa de $100 \mu\text{l}$ para la cuantificación de CO_2 , N_2 y N_2O y otra de $0.2 \mu\text{l}$ para la determinación de tolueno. Las botellas fueron incubadas a $30 \text{ } ^\circ\text{C}$ con una agitación de 150 rpm. Cada ensayo cinético se realizó por duplicado.

5.1.3 Inóculo

Como inóculo para los reactores UASB, se utilizaron lodos anaerobios provenientes del reactor UASB de la planta de tratamiento de aguas residuales de la Universidad Autónoma Metropolitana. Previo a la inoculación de los reactores, los lodos se lavaron con una solución fisiológica de cloruro de sodio (8.5 g/l). La concentración inicial de sólidos suspendidos volátiles en ambos reactores fue de 4.5 g/l. Para el caso de los ensayos en lote, se utilizaron como inóculo los lodos estabilizados en estado estacionario desnitrificante provenientes de uno de los reactores UASB. Estos lodos también fueron lavados previamente a su utilización.

5.1.4 Medio de cultivo

Para los ensayos en continuo y en lote se utilizó un medio de cultivo heterotrófico cuya composición se muestra en la Tabla 5.1. Para el caso del cultivo continuo el medio fue alimentado en dos soluciones (solución 1 y 2) por separado, con el fin de evitar contaminación. En la solución 1, se disolvió la fuente de carbono y electrones (acetato y/o tolueno) y en la solución 2, la fuente de nitrógeno (NaNO₃).

Tabla 5.1 Composición química del medio de cultivo

Solución 1	(g/l)	Solución 2	(g/l)
KH ₂ PO ₄	2.0	FeCl ₃	0.1
CaCl ₂ 2(H ₂ O)	0.3	CuSO ₄ 5(H ₂ O)	0.06
NaMoO ₄	0.06	Fuente de nitrógeno	
MgSO ₄	0.4		
Fuente de carbono y electrones			

5.2 Metodología

5.2.1 Cultivo continuo

5.2.1.1 Ensayos abióticos

Se realizaron ensayos abióticos para verificar la posible pérdida de tolueno en los reactores UASB. Para lo anterior el tolueno fue medido en diversos puntos de la unidad experimental: reservorio del influente, el cual contenía la fuente de carbono y energía

(fase gas y líquida); tuberías de alimentación, reactor UASB (medio de cultivo y espacio de cabeza) y en la columna de captura de gases.

5.2.1.2 Ensayos en continuo con tolueno

Para estos ensayos, los tres reactores se alimentaron inicialmente con acetato y nitrato hasta que los lodos se estabilizaron en estado estacionario desnitrificante. Posteriormente, uno de ellos (UASB1) permaneció bajo estas condiciones con la finalidad de obtener inóculo para los ensayos en lote, mientras que en los dos reactores restantes (UASB2 y UASB3) se realizaron ensayos con la mezcla acetato/tolueno.

El reactor UASB1, utilizado para producir inóculo, se mantuvo alimentado con una velocidad de carga carbonada de 100 mg C-acetato/l-d y una velocidad de carga nitrogenada de 71 mg N-NO₃⁻/l-d. El reactor UASB2, fue alimentado con 250 mg C-acetato/l-d y una velocidad de carga nitrogenada de 178 mg N-NO₃⁻/l-d. Estas velocidades fueron establecidas con la finalidad de mantener una relación carbono/nitrógeno (C/N) cercana a la estequiométrica (1.4). Una vez alcanzado el estado estacionario en el reactor, se procedió a evaluar diferentes velocidades de carga de tolueno (25, 50, 75, 100 y 125 mg C/l-d), sustituyendo de forma gradual la velocidad de carga de acetato pero sin eliminarlo totalmente de la alimentación (Tabla 5.2).

El reactor UASB3 se alimentó con 100 mg C-acetato/l-d, y una velocidad de carga nitrogenada de 71 mg N-NO₃⁻/l-d. Cuando se alcanzó el estado estacionario en el reactor, se procedió a evaluar otras velocidades de carga de carbono de tolueno: 25, 50 y 100 mg C-tolueno/l-d, sustituyendo de forma gradual la velocidad de carga de acetato hasta eliminarlo de la alimentación (Tabla 5.3). Durante cada etapa evaluada en esta serie de experimentos se tomaron muestras de lodos en régimen estacionario para el análisis de la dinámica de las poblaciones microbianas mediante la técnica molecular de electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE). El perfil de bandas obtenido fue analizado para determinar el índice de diversidad estructural (H) y equitatividad (J) de la comunidad microbiana (Shannon y Weaver, 1963). Dichos índices fueron estimados basados en la intensidad de las bandas cuyos valores fueron obtenidos mediante un programa de analizador de imágenes (NIH-Image J).

Tabla 5.2 Velocidades de carga de carbono ensayadas en el reactor UASB2 en cultivo continuo.

Ensayos	Velocidad de carga de carbono (mg/l-d)	
	C-acetato	C-tolueno
1	250	0
2	225	25
3	200	50
4	175	75
5	150	100
6	125	125

Tabla 5.3 Velocidades de carga de carbono ensayadas en el reactor UASB3 en cultivo continuo.

Ensayos	Velocidad de carga de carbono (mg/l-d)	
	C-acetato	C-tolueno
1	100	0
2	75	25
3	50	50
4	0	100

5.2.2 Cultivo en lote

5.2.2.1 Ensayos control

Se corrieron dos ensayos control con la finalidad de observar si existía consumo de las fuentes carbonadas o nitrogenadas adicionadas por separado. Un experimento control contenía el inóculo, medio mineral y la fuente de nitrógeno, pero sin la fuente de electrones. En otro control, se puso el lodo desnitrificante, medio mineral y la fuente de electrones, pero sin la fuente de nitrógeno.

5.2.2.2 Ensayos en lote con tolueno

Se realizaron dos series de ensayos en lote en periodos cronológicamente distintos. En la primera serie de experimentos se manejaron distintas proporciones acetato/tolueno pero manteniendo una concentración de carbono constante y relación C/N de 1.4, similar a los ensayos realizados en continuo. Las proporciones se ilustran en la Tabla 5.4. Cabe señalar que se corrieron los respectivos controles adicionando acetato o tolueno como únicas

fuentes de carbono y energía. La fuente de nitrógeno fue nitrato a una concentración de 57 mg N-NO₃⁻/l.

Tabla 5.4 Concentraciones de carbono usadas durante la primera serie de experimentos en lote.

Ensayos en lote	Concentración de carbono (mg /l)	
	C-acetato	C-tolueno
1	10	70
2	30	50
3	50	30
4	65	20

En la segunda serie de experimentos, a una concentración de carbono de tolueno constante se le adicionó una concentración de acetato. Los ensayos se ilustran en la Tabla 5.5. En estos ensayos se realizó el análisis molecular del lodo desnitrificante mediante la técnica de PCR cuantitativo en tiempo real (RTQ-PCR, por sus siglas en inglés) Para esto, se tomaron muestras de lodo al tiempo inicial y final de cada uno de estos ensayos y se cuantificó el gen 16S DNAr y el gen catabólico del tolueno *bssA*, que está involucrado en la primera etapa de eliminación del tolueno bajo condiciones anóxicas (Heider y col., 1998; Beller y col., 2002).

Tabla 5.5 Concentraciones de carbono usadas durante la segunda fase de experimentos en lote.

Ensayos en lote	Concentración de carbono (mg /l)	
	C-acetato	C-tolueno
1	90	0
2	0	15
3	90	15

5.3 Métodos analíticos

5.3.1 Compuestos nitrogenados

5.3.1.1 Medición de nitrato (NO_3^-) y nitrito (NO_2^-)

La detección y cuantificación de nitrato y nitrito se realizó por electroforesis capilar (Li, 1993; Wang y col., 1995; Gómez y col., 1996). El método se basa en la migración electroforética de iones al aplicar un voltaje a través de un capilar, provocando una migración diferencial de los componentes de la muestra cargada eléctricamente hacia el electrodo respectivo. Dependiendo de la polaridad de la energía suministrada y la composición del electrolito, el analito pasa a través del detector. El equipo utilizado fue un analizador capilar de iones (CIA 4000, Waters) que consta de un capilar de sílice fundida de 60 cm de largo y 75 μm de diámetro interno, con un suministro de corriente de 35 μA y un voltaje de 20 KV. Los tiempos de toma de muestra y de corrida fueron de 4 segundos y 4 minutos respectivamente. Se utilizó un tiempo de 2 minutos de purga entre muestra y muestra para reemplazar el electrolito del capilar por electrolito nuevo. La absorbancia fue medida con una lámpara de luz ultravioleta a una longitud de onda de 214 nm. El análisis electroforético fue realizado a 25° C.

Solución de electrolito: El electrolito empleado para la generación de un campo eléctrico fue sulfato de sodio, el cual se prepara de la siguiente forma: A 10 ml de una solución de Na_2SO_4 0.1 M, adicionar 3 ml de la solución OFM anion-BT(Waters), mezclar y aforar a 100 ml con agua desionizada.

Para comprobar la respuesta del equipo, se analizaron diferentes concentraciones de nitrato y nitrito. De los datos obtenidos se construyó una curva de calibración con valores del área bajo la curva contra la concentración de nitrato y nitrito, encontrándose que la respuesta del método es lineal. En la Figura 5.2, se muestra un ejemplo de una curva de calibración para valores medios de diferentes concentraciones de nitrato. La curva estándar para nitrito no se muestra, sin embargo su tendencia fue similar a la del nitrato.

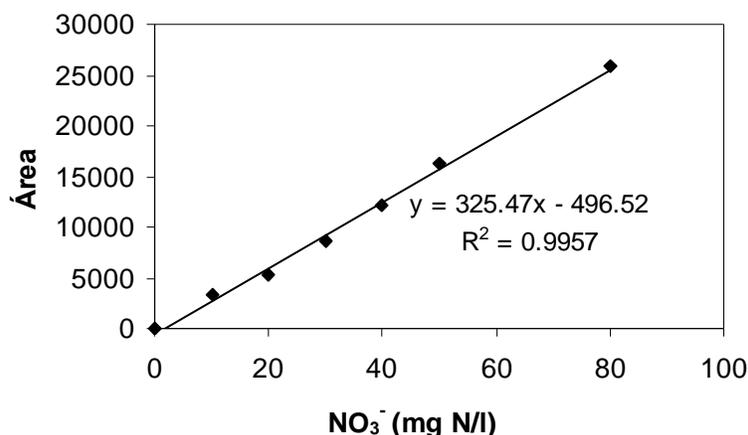


Figura 5.2. Curva de calibración para la determinación de nitrato

Para el análisis de las muestras, en un vial Eppendorf se depositaron 0.5 ml de muestra (influyente y efluente) previamente filtrada por una membrana de nylon de 13 mm de diámetro y tamaño de poro de 0.45 μm . Cada cuatro muestras se midió una solución de concentración conocida para determinar el estado de calibración del equipo, que a su vez sirve como estándar de referencia para determinar la concentración en la muestras. Las muestras se analizaron por duplicado.

5.3.1.2 Medición de nitrógeno molecular (N_2) y óxido nitroso (N_2O)

La cuantificación de nitrógeno molecular y óxido nitroso presentes en el gas generado, se realizó por cromatografía de gases. Para el análisis se empleó un cromatógrafo de gases Varian 3350 con un detector de conductividad térmica (TCD) (Schomburg, 1990). La columna fue de acero inoxidable de 1.20 m de largo y 1/8'' de diámetro, empacada con porapak Q de malla 80-100. Como gas acarreador se utilizó helio a un flujo de 16 ml/min. La temperatura del detector fue de 110° C, del inyector de 100° C, del filamento de 133° C y de la columna de 35° C.

La muestra del gas producido en el reactor se obtuvo en la parte superior de la columna colectora de gas, mediante una jeringa de 1 ml. El volumen de inyección fue de 0.1 ml. El volumen de gas generado se calculó considerando la presión atmosférica de la ciudad de México (0.8 atm) y la temperatura del sistema (30° C). Se calculó la producción volumétrica de N_2 , el número de moles (mol N_2 /l.d) y por último se convirtieron a unidades de velocidad de carga (mg N_2 /l.d).

Los valores de velocidad de carga de estos gases fueron calculados de acuerdo a condiciones estándar, esto es, a 1 atm, 273° K y 22.4 l/mol. El volumen estándar de gas se calculó considerando que la presión de la Ciudad de México es de 0.8 atm. De acuerdo a lo anterior se tiene la siguiente ecuación:

$$V_2 = P_2 T_1 V_1 / P_1 T_2$$

Donde: V_2 , volumen estándar; P_1 , 1 atm; T_1 , 273° K; V_1 , volumen experimental; P_2 , 0.8 ATM y T_2 , 303° K (30° C temperatura experimental)

Obtenido el volumen estándar, se determinó la concentración molar, para finalmente calcular la velocidad de carga.

5.3.2 Compuestos carbonados

5.3.2.1 Medición de carbono total y orgánico

La cuantificación de carbono orgánico e inorgánico se realizó por medio de un analizador de carbono orgánico total modelo TOC- 5000 (Shimadzu). El equipo analiza por separado el carbono total y el inorgánico. El sistema cuenta con un inyector que toma la muestra y la envía por medio de una corriente de aire de alta pureza, a un tubo de combustión que tiene una temperatura de 680° C. En el tubo de combustión el carbono es oxidado a CO_2 y transportado a un vaso de reacción de carbono inorgánico. Posteriormente es secado y enfriado por medio de un deshumificador, para finalmente pasar a un celda con un analizador de infrarrojo de gas, donde el CO_2 es detectado. El CO_2 cuantificado genera como señal un pico, cuya área es calculada por un procesador de datos. El área obtenida es proporcional a la concentración de carbono en la muestra y es calculada con base en una curva de calibración elaborada previamente.

Para cuantificar el carbono orgánico, la muestra es acidificada antes de su inyección al equipo y posteriormente sometida a burbujeo con el gas acarreador, donde los compuestos de carbono inorgánico, como el carbonato y el bicarbonato se eliminan en forma de CO_2 . Por último la muestra es analizada de forma similar al proceso antes mencionado. Para medir el carbono, se usaron 10 ml de muestra, la cual fue centrifugada y posteriormente filtrada con una membrana de nylon de 45 μm de tamaño de poro. Las muestras se analizan por duplicado. Sin embargo si el coeficiente de variación es mayor al 2%, el equipo realiza de forma automática una tercera medición y toma en

consideración las dos más cercanas. En la Figura 5.3, se muestra un ejemplo de una curva de calibración para valores promedio de diferentes concentraciones de carbono total, preparada a partir de una solución patrón de biftalato hidrógeno de potasio.

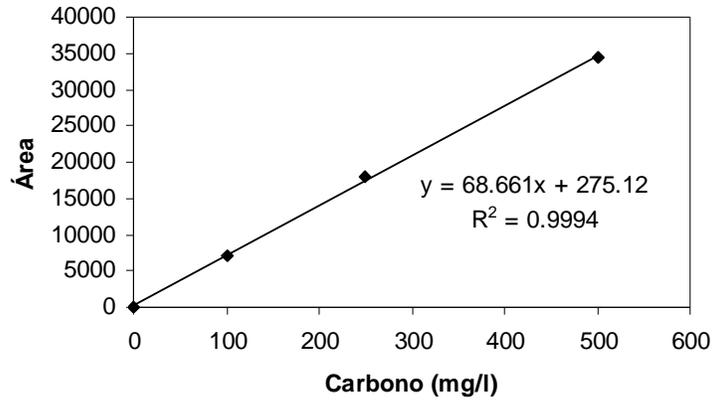


Figura 5.3 Curva de calibración para la determinación de carbono total

5.3.2.2 Medición de acetato

El acetato se cuantificó mediante un cromatógrafo de gases Varian Star 3400, con detector de ionización de flama (FID). Se utilizó una columna AT1000 de 10 m x 0.053 mm de diámetro y una película de 1.2 μm . La temperatura del horno fue de 120° C, del inyector 130° C y del detector 150° C. El gas acarreador fue nitrógeno a un flujo de 4.5 ml/min. Para la medición de acetato, se utilizaron 0.95 ml de muestra filtrada previamente con una membrana de nylon con tamaño de poro de 0.45 μm a la que se le adicionaron 0.05 ml de HCl al 50% con el fin de acidificarla y tener el ácido acético sin disociar. La curva de calibración para diferentes concentraciones de ácido acético se muestra en la Figura 5.4, donde se observa un comportamiento lineal a las concentraciones utilizadas.

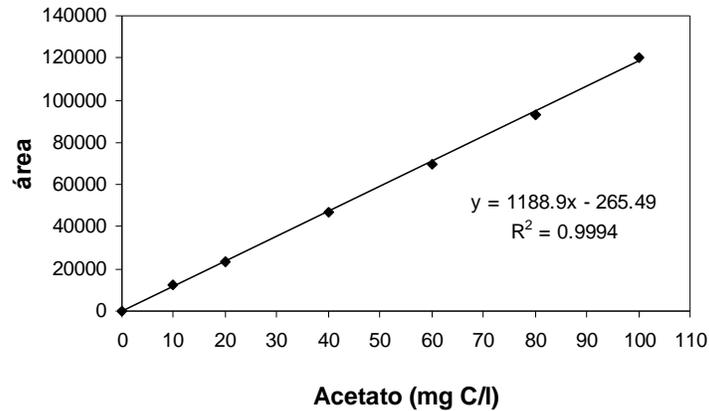


Figura 5.4 Curva de calibración para la cuantificación de acetato

5.3.2.3 Medición de bióxido de carbono (CO₂) y metano (CH₄)

El bióxido de carbono (CO₂) y el metano (CH₄) se midieron por cromatografía de gases (detector de conductividad térmica) y se determinaron en la misma corrida junto con el nitrógeno (N₂) y el óxido nitroso (N₂O). Los cálculos de velocidad de carga de estos gases, se hicieron de acuerdo a las mismas consideraciones hechas para cuantificar la velocidad de carga de N₂ y N₂O (ver sección 5.3.1.2).

5.3.2.4 Medición de tolueno

El tolueno en la fase líquida y gaseosa se determinó por cromatografía de gases, usando un cromatógrafo Varian Star modelo 3400 con detector de ionización de flama (FID). El equipo cuenta con una columna capilar de 30 m de longitud x 0.53 mm de diámetro interno con una fase estacionaria carbowax/BTR (Quadrex, Woodbrige, USA). La temperatura de la columna fue de 60° C, del detector de 235° C y del inyector de 250° C. El gas acarreador fue nitrógeno a un flujo de 4 ml/min.

Para la medición de tolueno en la fase líquida, las muestras se filtraron con una membrana de nylon de 45 µm de tamaño de poro. Posteriormente se inyectó un volumen de 0.2 µl en el cromatógrafo de gases. En la fase gas, se determinó tomando una muestra de gas en el espacio de cabeza del recipiente del influente y del efluente, así como en el espacio de cabeza del reactor y en la columna colectora de gases.

En la Figura 5.5, se muestra una curva estándar a diferentes concentraciones de tolueno en la fase líquida.

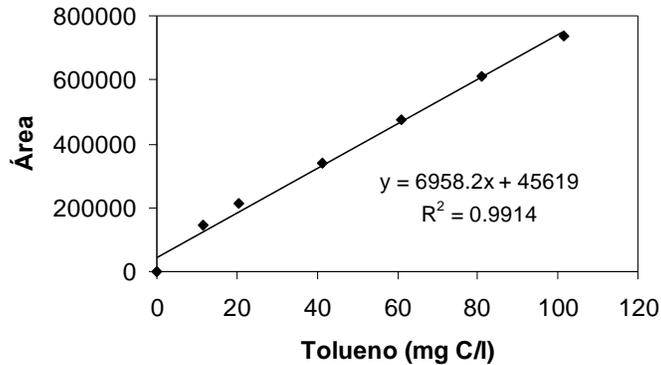


Figura 5.5 Curva de calibración para la determinación de tolueno en la fase líquida

5.3.2.5 Medición de los sólidos suspendidos

La medición de los sólidos suspendidos se realizó siguiendo el método estándar establecido por APHA (1985). Para la determinación de los sólidos suspendidos totales, la muestra es secada y evaporada a 110° C durante una hora. Posteriormente, para cuantificar los sólidos suspendidos fijos, la muestra es calcinada durante una hora a 550° C. La cantidad de sólidos suspendidos volátiles presentes en la muestra es obtenida por diferencia entre los sólidos suspendidos totales y los sólidos suspendidos fijos y es considerada como la biomasa presente en el lodo.

La concentración de sólidos suspendidos totales (g SST/l) se calcula de la siguiente manera:

$$g \text{ SST/l} = (B - A) / V$$

Donde A = peso de crisol (g); B = peso de crisol + muestra (g) a 110° C; V = volumen de la muestra (l).

Para los sólidos suspendidos fijos (g SSF/l), la fórmula es la siguiente:

$$g \text{ SSF/l} = (C - A) / V$$

Donde: A = peso de crisol (g); C = peso de crisol + muestra sometida a 550° C; volumen de la muestra (l).

Por último, los sólidos suspendidos volátiles (g SSV/l) son obtenidos por diferencia:

$$g \text{ SSV/l} = \text{SST} - \text{SSF}$$

5.3.3 Análisis molecular

5.3.3.1 Lisis celular y extracción de ácidos nucleicos

En los ensayos en continuo la lisis celular se realizó tomando una muestra de 1.5 ml de lodos en régimen estacionario de cada proporción C-acetato/C-tolueno ensayada, los cuales se sometieron al método mecánico de bead beating en presencia de fenol. Para la extracción de ácidos nucleicos se empleó una mezcla de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (24:25:1 v/v), posteriormente se precipitaron los ácidos nucleicos empleando acetato de potasio (3.5 M) y etanol a una temperatura de - 20 °C. El tamaño del ADN se analizó por electroforesis en gel de agarosa (1%) que contenía 1 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml) y se visualizó en un transluminador de UV.

La extracción de ácidos nucleicos para los ensayos en lote se realizó empleando un kit comercial, siguiendo las instrucciones del fabricante (Mo Bio).

5.3.3.2 Electroforesis en gel con gradiente desnaturante (DGGE)

Los fragmentos usados para esta técnica fueron segmentos de las regiones V6-V8 (aproximadamente 0.4 kb) del gen ADN r 16S obtenido por PCR de las muestras del ADN extraído. Para la amplificación de las regiones V6-V8 se usaron iniciadores universales de eubacterias, los cebadores fueron el GC 968f y el 1401r (Sigma Genosys). La presencia de una abrazadera rica en GC en uno de los dos iniciadores, fue requerida para mejorar la separación de las bandas en el gel. La reacción de PCR fue realizada a un volumen total de 25 µl, con la mezcla siguiente: 15.8 µl de agua estéril, 2.5 µl de buffer de PCR (10X, 100 Tris/HCL pH 9, 500 mM of KCl), 3.0 µl de MgCl₂ (25 mM), 0.5 µl de desoxirribonucleótidos trifosfato (0.2 mM de cada uno), 0.1 µl de cada primer (0.2 µM), 0.2 µl de Taq DNA polimerasa (Promega) y 1 µl de DNA extraído. Las condiciones de PCR consistieron de una etapa de pre-desnaturalización de 5 minutos a 94 °C, seguida de 35 ciclos, 94 °C, 30 s; 55 °C, 20 s y 68 °C, 40 s, para desnaturación, anillamiento y elongación respectivamente (Felske, 1996).

La DGGE se realizó en un gel de poliacrilamida (6% P/V, y bis-acrilamida 0.2% P/V), conteniendo el agente desnaturante (urea y formamida) y el buffer TAE 1X (2 M Tris/HCl, 1 M de ácido acético y 50 mM de EDTA). La electroforesis se corrió a 60 °C, primero a un voltaje de 200 V por 5 minutos y después a 84 V durante 950 minutos.

Después de la electroforesis, el perfil de bandas en el gel se visualizó mediante una tinción con plata (Sanguinetti y col., 1994).

Los índices ecológicos de diversidad (H) y equitatividad (J) fueron derivados de la siguiente ecuación $H = -\sum P_i \ln P_i$ and $J = H/\ln S$. El término P_i se refiere a la abundancia relativa de la banda en un carril y fue calculado como sigue: $P_i = n_i/N$, donde n_i , es la intensidad de una banda individual y N es la suma de intensidades de la bandas en un carril. S representa el número total de bandas en la muestra.

Como se mencionó anteriormente los índices se basaron en el perfil de bandas del gel obtenido por DGGE. Cada banda dentro de un carril fue considerada como un fragmento de una población diferente, mientras que las bandas con migración similar dentro de los diferentes carriles fueron consideradas como fragmentos de una misma población. La relación entre la superficie de la banda y la intensidad media en píxeles de dicha superficie fue considerada como la intensidad de la banda y fue calculada usando un programa analizador de imágenes (Image J), desarrollado por the National Institutes of Health.

5.3.3.3 PCR en tiempo real

La cuantificación de los genes 16S DNA ribosomal y del gen catabólico del tolueno *bssA*, se realizó por RTQ-PCR usando iniciadores y sondas descritas en la Tabla 5. 6. Un ejemplo de una curva de calibración para el gen *bssA* obtenido de *Thauera aromatica* cepa T1 se muestra en la Figura 5.6.

Tabla 5.6 Iniciadores y sondas empleados en la cuantificación de los genes 16S DNAr y *bssA* por PCR en tiempo real.

Gen	iniciador f [*]	iniciador reversa	sonda ^c
<i>bssA</i> ^a	5'ACGACGGYGGCATTCTC3'	5' CGATGATSG	FAM-5' CTCTGGTCTCTCTG
16S DNAr ^b	5'CGGTGAATACGTTTCYCGG3'	GYACCGACA3' 5'GGWTACCTTG	CACCTGGACACC3'TAMRA FAM-5'CTTGACACACCG
		TTACGACTT3'	CCCGTC3'-BHQ-1

^a los iniciadores f^{*} (por forward, en inglés) y reversa, así como también la sonda fueron diseñados por Beller y col. (2002). ^b los iniciadores forward y reversa, así como también la sonda fueron diseñados por Suzuki y col. (2000). ^c el fluorescente usado para el

reportero fue FAM (6-carboxyfluoresceína) o TET (tetra-6-carboxyfluoresceína) y la fluorescencia ocupada para el apagador (quencher) fue TAMRA (6-carboxytetrametil rhodamina) o Black Hole quencher-1.

La reacción de PCR contenía 0.5 μM de cada iniciador, 0.25 μM de la sonda, 1x de TaqMan (universal PCR Master mix, Applied Biosystems), 2.0 μl de DNA y agua libre de nucleasa (AMRESO-E476) a un volumen final de 25 μl . El análisis de RTQ-PCR fue conducido con un ABI PRISM 7000 (sequence detection system, Applied Biosystems) con las siguientes condiciones de temperatura: 50 $^{\circ}\text{C}$ por 2 minutos, seguido por 95 $^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos y 40 ciclos a 95 $^{\circ}\text{C}$ por 15 segundos y 60 $^{\circ}\text{C}$ por 1 minuto.

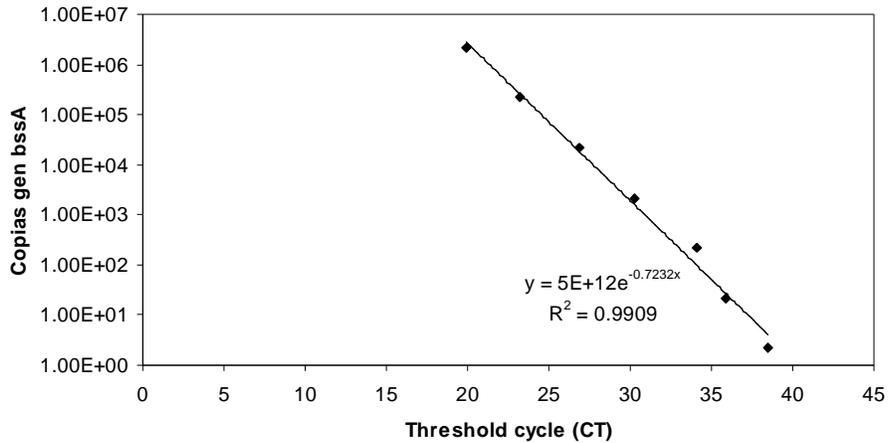


Figura 5.6 Curva de calibración usada para PCR en tiempo real. Los datos muestran la estandarización del gene *bssA* usando DNA de *Thauera aromatica* cepa T1.

6. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1 Estudio de la mineralización de tolueno por desnitrificación en un reactor de lecho de lodos anaerobios con flujo ascendente (UASB).

Resumen del artículo publicado: Martínez, S., Cuervo-López, F. M. and Gomez, J. (2007). Toluene mineralization by denitrification in an up flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. *Bioresource Technology* (98): 1717-1723.

En este trabajo se evaluó el efecto de una fuente fácilmente oxidable como el acetato sobre el consumo de tolueno por desnitrificación. La experimentación se dividió en dos etapas, en la primera se inoculó un reactor UASB con lodos sin exposición previa a hidrocarburos, el cual fue alimentado con una velocidad de carga de carbono (VCC) de acetato de 250 mg C/l-d. La velocidad de carga de N-Nitrato (mg N-NO₃⁻/l-d) fue ajustada para tener una relación C/N constante de 1.4. En la segunda etapa, manteniendo constante la relación C/N y la VCC total de 250 mg C/l-d, se ensayaron 5 VCC de tolueno: 25, 50, 75, 100 y 125 mg C/l-d, sustituyendo de forma gradual la VCC de acetato por tolueno.

Los resultados encontrados en la primera fase mostraron eficiencias de consumo de C-acetato mayores que $98 \pm 0.7\%$ y de N-nitrato superiores a $96 \pm 0.4\%$. Bajo estas condiciones los rendimientos de HCO₃⁻ oscilaron alrededor de 0.74 ± 0.01 , mientras que los de N₂ alcanzaron valores de 0.89 ± 0.04 . Los resultados obtenidos indicaron que el reactor operó en un estado estacionario desnitrificante y muestran la presencia de un proceso principalmente desasimilativo, donde la mayor parte de los substratos consumidos fueron canalizados hacia la generación de productos como bicarbonato y nitrógeno molecular. En la segunda fase, cuando se adicionaron diferentes VCC de tolueno se encontraron eficiencias de consumo de carbono por arriba de $95.9 \pm 3.6\%$ y los de nitrato alcanzaron valores de $87 \pm 0.5\%$. Por su parte rendimientos de bicarbonato oscilaron alrededor de 0.7 ± 0.03 y los de nitrógeno molecular en 0.87 ± 0.01 . Los resultados indican que la adición del tolueno no afectó significativamente el proceso respiratorio desnitrificante, ya que se mantuvieron altas eficiencias de consumo y los rendimientos de producto fueron cercanos a 1. Parte de los resultados obtenidos pueden

ser atribuidos a las bajas concentraciones de tolueno en el reactor que siempre fueron menores que 8 mg/l. Bajo las condiciones experimentales probadas se encontró que la mineralización del tolueno por desnitrificación fue eficientemente lograda en cultivo continuo.

Los detalles metodológicos de este trabajo, así como la discusión de mismo pueden ser revisados en el siguiente artículo de investigación.

Toluene mineralization by denitrification in an up flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor

S. Martínez, F.M. Cuervo-López *, J. Gomez

Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa C.P. 09340 Iztapalapa, DF, Mexico

Received 12 July 2005; received in revised form 6 July 2006; accepted 6 July 2006
Available online 9 October 2006

Abstract

In order to examine the effect of easily degradable substrate such as acetate on toluene mineralization by denitrification, an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor in steady state was set up. The experimentation was carried out in two stages. Initially, the reactor was fed with a carbon loading rate of 250 mg acetate-C L⁻¹ d⁻¹ as electron source. Nitrate loading rate (mg NO₃⁻-N L⁻¹ d⁻¹) was adjusted to obtain a constant C/N ratio of 1.4. In the second stage, five toluene-C loading rates (TLR, mg toluene-C L⁻¹ d⁻¹), 25, 50, 75, 100 and 125, were assessed while total carbon loading rate and C/N were maintained constant at 250 mg C L⁻¹ d⁻¹ and 1.4, respectively. In so doing, acetate-C loading rate (mg acetate-C L⁻¹ d⁻¹) was gradually substituted by toluene-C. When acetate-C was the only electron source a dissimilative denitrifying process resulted as indicated by bicarbonate yield $Y_{\text{HCO}_3^-}$ (mg HCO₃⁻ produced/mg carbon consumed) of 0.74 ± 0.005 and denitrifying yield (Y_{N_2} , mg N₂ produced/mg NO₃⁻-N consumed) of 0.89 ± 0.042. The addition of different TLR did not affect the biological process as consumption carbon efficiency (CCE) values remained up to 95% ± 3.5 and $Y_{\text{HCO}_3^-}$ and Y_{N_2} values were higher than 0.71 ± 0.03 and 0.88 ± 0.01, respectively. Toluene mineralization by denitrification in continuous culture was successfully achieved. A simple UASB denitrifying reactor system has promising applications for complete conversion of nitrate, toluene and acetate into N₂ and CO₂ with a minimal sludge production.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Continuous culture; Denitrification; Toluene mineralization

1. Introduction

Benzene, toluene, etilbenzene and isomers of xylene (BTEX), are volatile compounds which contaminate soils, water and groundwater. Toluene is particularly important in this respect due to its relatively high solubility in water causing toxic effects in humans on the central nervous system (Fornazzari et al., 2003). Although toluene is not completely categorized as carcinogenic, its presence with other compounds might increase the carcinogenesis (Dean, 1978).

Toluene can be consumed in batch cultures under several conditions, such as in aerobic systems (Hutchins,

1991; Duetz et al., 1994), methanogenic (Edwards and Grbic-Galic, 1994), iron-reducing (Lovley and Lonergan, 1990), sulphate-reducing (Edwards et al., 1992) and denitrifying (Phelps and Young, 1999) conditions. In most of these works the mineralization of toluene (oxidation to CO₂ or HCO₃⁻) and reduction of electron acceptor has not been clearly determined. Nevertheless, there are reports of toluene mineralization under denitrifying conditions as indicated by Zeyer et al. (1986), Kuhn et al. (1988), Peña-Calva et al. (2004).

Research focusing on the consumption of toluene under aerobic and anaerobic conditions by continuous culture is reported in the literature (Ruiz-Aguilar et al., 2002). The most important limitations for toluene biodegradation under aerobic conditions seem to be the transfer rate of toluene and oxygen (Lee et al., 1993). Under aerobic conditions toluene is generally assimilated into biomass.

* Corresponding author. Fax: +525 580 464 07.
E-mail address: fmcl@xanum.uam.mx (F.M. Cuervo-López).

However, a synthetic multi-substrate medium with toluene as a minor source of organic carbon ($3.5 \text{ mg toluene} \cdot \text{C L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) was reported to be consumed under methanogenic conditions in a plug-flow reactor (Ghosh et al., 1996). However, it was not possible to conclude that the aromatic compound was completely mineralized. A continuously fed laboratory aquifer column has been proposed to mineralize toluene at a loading rate of $28 \text{ mg toluene} \cdot \text{C L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ under denitrifying conditions (Zeyer et al., 1986). Using denitrifying sediment previously adapted to *m*-xylene, they found that 75% of the toluene-C fed was converted to CO_2 while the rest of the toluene carbon was probably incorporated into biomass.

It has been observed that the addition of readily available carbon (Nahar et al., 2000) can enhance the tolerance of activated sludge to high concentrations of toluene. During batch denitrification, strains of *Pseudomonas maltophilia* metabolized a mixture of succinate and toluene simultaneously (Su and Kafkewitz, 1994). However, it was not clear that toluene was mineralized under these conditions.

Considering that acetate has been easily mineralized by denitrification in continuous and batch culture (Cuervo-López et al., 1999; Peña-Calva et al., 2004) it is possible to propose that acetate could also enhance the consumption and mineralization of toluene in continuous culture. Therefore, the purposes of this work were two-fold: (1) To contribute in the knowledge about mineralization of high loadings rates of toluene in a continuous culture under denitrifying conditions and; (2) To evaluate the effect of different loading rates of toluene and acetate on the respiratory process of a denitrifying sludge by means of substrate consumption efficiencies, yield products and mass balances in an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor.

2. Methods

2.1. UASB reactor

A continuously fed UASB reactor of 1.4 L (operational volume) with a head space volume of 0.11 L was set up. Polytetrafluorethylene tubing (Cole-Parmer) was used to feed the reactor. The reactor was operated at 30°C . The gas produced was collected by displacement in a column filled with saline water. The diagrammatic sketch of the experimental unit is shown in Fig. 1.

2.2. Inoculum and culture medium

As inoculum 3.5 g VSS L^{-1} of denitrifying sludge was used with two synthetic media (medium 1, M1; medium 2, M2). M1 contained the nitrogen source ($356 \pm 11 \text{ mg NO}_3^- \cdot \text{N L}^{-1}$) while the M2 contained the electron source (acetate, acetate and toluene, respectively). Composition of the mineral media was as follows (g L^{-1}): M1: FeCl_3 , 0.1; CuSO_4 , 0.06; M2: MgSO_4 , 0.6; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.06; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.6; KH_2PO_4 , 3.0. The M2 containing toluene was kept at 5°C .

2.3. Analytical methods

The concentration of toluene was determined in the liquid and gas phase by gas chromatography (Star Varian model 3400, Walnut Creek, CA, USA) with flame ionization detector (FID) using a capillary column (30 m and 0.53 mm internal diameter) with a stationary phase carbowax/BTR (Quadrex, Woodbridge CT, USA). The temperatures of the column, detector and injector were 60, 235 and 250°C , respectively. Molecular nitrogen was used as carrier gas (4 mL min^{-1}). Acetate concentration was

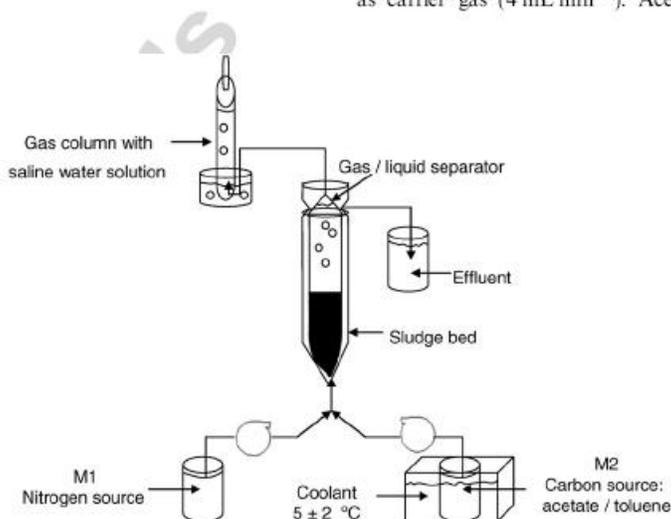


Fig. 1. Diagrammatic sketch of the experimental UASB reactor.

measured by gas chromatography (HP model 5890, NJ USA) with a FID and a capillary column (10 m and 0.53 mm internal diameter, Alltech AT 1000, Deerfield IL, USA). The temperatures of the column, detector and injector were 120, 150 and 130 °C respectively. The carrier gas was molecular nitrogen (4.5 mL min⁻¹). N₂, N₂O, CH₄ and CO₂ were quantified by gas chromatography (Varian model 3350, Walnut Creek, CA, USA) with a thermal conductivity detector and a stainless steel packed column (porapak Q on 80/100 mesh, 1.2 m and 1/8 in internal diameter). The temperatures of the column, detector and injector were 40, 100 and 100 °C, respectively. The carrier gas was helium (18 mL min⁻¹). The nitrite and nitrate content was measured by capillary electrophoresis (Millipore, model 4000, Bedford, MA) as described by Gómez et al. (1996). The organic and inorganic carbon was analysed in a total organic carbon (TOC) analyser (Shimadzu, TOC-5000A, Australia) as described by Cuervo-López et al. (1999). Total and volatile suspended solids (TSS, VSS) contents were determined at the end of each assay following standard methods (APHA, 1995).

2.4. Culture

At first, two controls in batch culture were used as reported by Peña-Calva et al. (2004). One contained the culture medium, denitrifying sludge, nitrate and no electron source. The second control contained the culture medium, denitrifying sludge and electron donor, but without nitrate.

Afterwards, the experiments were carried out in two stages. In the first stage, the sludge was fed with 250 mg acetate-C L⁻¹ d⁻¹ and 178 mg NO₃⁻-N L⁻¹ d⁻¹ (C/N ratio of 1.4). In the second stage, acetate-C loading rate was gradually substituted by different loading rates of toluene-C, namely: 25, 50, 75, 100 and 125 mg toluene-C L⁻¹ d⁻¹. A total constant carbon loading rate of 250 mg C L⁻¹ d⁻¹ was fed in all cases. The C/N was also maintained at 1.4. In all cases a hydraulic retention time (HRT) of two days was set.

Abiotic assays to verify possible losses of toluene were conducted in the UASB reactor continuously fed with 116 mg toluene-C L⁻¹ d⁻¹. Toluene concentration was measured at several places of the experimental setup as follows: the influent reservoir which contained the M2 fraction (liquid phase and head space), the influent lines, throughout the UASB reactor (culture broth and head space) and at the exit gas column.

During all the experimentation carbon mineralization from acetate and toluene to CO₂ was measured as soluble HCO₃⁻ as the pH value in the reactor remained as 8.5 ± 0.4. According to the chemical equilibrium at this pH value most of the CO₂ will be as HCO₃⁻.

Volumetric rates (mg L⁻¹ d⁻¹), consumption efficiencies (mg substrate consumed/mg substrate fed) and yield products (*Y*_{ps}, mg product/mg substrate consumed, considered as the efficiency of the metabolic denitrifying pathway) were calculated in all cases.

2.5. Statistical analysis

Standard curves were conducted at least in triplicates for each analytical method. In all cases, the coefficient of variation for slope, coefficient of determination (*R*²) and intercept were less than 8%. Values obtained in abiotic assays represent mean values and the ± range from two independent samples. In order to elucidate differences, individual consumption efficiencies and yield values obtained at each carbon loading rate were subjected to one-way ANOVA analysis. Multiple comparison test (Tukey-Kramer, $\alpha = 0.05$) were also made. Standard deviations were calculated from at least seven independent measurements obtained during the steady state of denitrification. The computer package used was Number Cruncher Statistical System (NCSS, Jerry Hintze, 2001).

3. Results and discussion

3.1. Batch control assays

No consumption of substrates was observed in the batch culture indicating that there was no nitrate reduction in the sludge without adding any electron source and vice versa.

3.2. Abiotic assays

Influent reservoir: The toluene fraction dissolved in the liquid phase of the influent reservoir maintained at 5 °C (M2) was close to 96% while the rest was found in the head space of the bottle. Thus, toluene was mainly dissolved in the liquid phase and the concentration in the influent was constant.

UASB reactor: The abiotic assays performed in the UASB reactor showed that when 116 ± 3.2 mg toluene-C L⁻¹ d⁻¹ were fed from the influent reservoir, 85 ± 2.6 mg toluene-C L⁻¹ d⁻¹ were dissolved in the culture broth while the rest was found in the reactor head space (26 ± 0.6 mg toluene-C L⁻¹ d⁻¹). Thus the major fraction of this compound (73.5%) was present in the liquid culture. The total amount of toluene found in the UASB reactor accounted for 111 ± 3.15 mg toluene-C L⁻¹ d⁻¹, which represented 96% of total loading rate. The amount of toluene at the gas column was equal to 2 mg toluene-C L⁻¹ d⁻¹ or lower which was negligible (accounting for 1.7% of the total toluene). Therefore, under abiotic culture conditions most of toluene remained in the UASB reactor and the loss by volatilization of total toluene throughout it was close to 4%. Therefore, the UASB reactor proved to be an adequate system for the evaluation of toluene as electron source in the denitrifying process.

3.3. Denitrification with acetate

Efficiency and yield values obtained are shown in Table 1. At the loading rate of 251 ± 10 mg acetate-C L⁻¹ d⁻¹ (no toluene added) and 176 ± 9 mg NO₃⁻-N L⁻¹ d⁻¹, the

Table 1
Efficiencies in the substrate consumption (E_f) and yields in product formation ($Y_{P/S}$) of the denitrifying process that used acetate and toluene as electron donors

Loading rate acetate/toluene (mg C L ⁻¹ d ⁻¹)	E_f (%) ^a		$Y_{P/S}$ ^b	
	C	N	HCO ₃ ⁻	N ₂
250/0	98.6 ± 0.7	96.5 ± 0.4	0.74 ± 0.01	0.89 ± 0.04
225/25	99.9 ± 0.04	96.9 ± 0.2	0.71 ± 0.04	0.87 ± 0.01
200/50	95.9 ± 3.6	96.9 ± 0.5	0.75 ± 0.03	0.90 ± 0.01
175/75	98.1 ± 0.5	87.6 ± 0.8	0.70 ± 0.03	0.89 ± 0.02
150/100	97.3 ± 0.9	86.9 ± 0.5	0.70 ± 0.02	0.88 ± 0.02
125/125	98.0 ± 0.8	87.8 ± 0.5	0.69 ± 0.04	0.89 ± 0.01

^a Consumption efficiency, $E_f = (\text{mg substrate}_{\text{consumed}} / \text{mg substrate}_{\text{fed}}) \times 100$.

^b Yield, $Y_{P/S} = (\text{mg product} / \text{mg substrate}_{\text{consumed}})$.

rate of bicarbonate formation was $185 \pm 7 \text{ mg HCO}_3^- \text{ C L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ and the rate of molecular nitrogen production was $151 \pm 8 \text{ mg N}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (Table 2). The CCE and nitrate-N consumption efficiency (NCE) were $98.6\% \pm 0.7$ and $96.5\% \pm 0.4$, respectively. Acetate consumed was mainly mineralized to HCO₃⁻ and NO₃⁻ was reduced to N₂, as indicated by the $Y_{P/S}$ values of 0.74 ± 0.01 and 0.89 ± 0.04 , for HCO₃⁻ and N₂ formation, respectively. No methane formation was detected. Accumulation of nitrite was $2.3 \pm 0.3 \text{ mg NO}_2^- \text{ N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (close to 1.3% of the total NO₃⁻-N) while the intermediate nitrous oxide was not detected. Therefore, under these culture conditions where nitrate is the limiting substrate a biomass yield production close to 0.1 mg VSS-C/mg consumed-C could be expected.

Thermodynamic calculations indicate that denitrification process using acetate as electron source has a change in free energy (ΔG°) of $-798.05 \text{ KJ/reaction}$. Namely, the potential for biomass formation is higher than fermentative process. Therefore an increase in biomass could be expected, however, a biomass yield production close to

0.1 mg VSS-C/mg consumed-C was estimated from Table 2. Likewise, sludge concentration inside the reactor remained almost constant ($3.5 \pm 0.14 \text{ g VSS L}^{-1}$) due to sampling.

The mainly dissimilative sludge behaviour as well as no methane formation obtained in this work might be described in terms of the C/N ratio established (1.4) which was near to stoichiometric value for acetate oxidation in presence of nitrate (1.1). As the C/N ratio of 1.4 is strongly restrictive for microbial biomass production, acetate-C and nitrate-N were mainly dissimilated as they were used as electron and acceptor sources in the denitrifying respiratory process. A similar behaviour was previously reported by Cuervo-López et al. (1999), at the C/N ratio of 2 in a UASB reactor continuously fed with acetate.

As the consumption and production volumetric rates remained with a general variation level lower than 6%, the respiratory process was at steady state of denitrification. This physiological behaviour can be observed in Fig. 2 (zone indicated by arrow 1). The effect of different TLR on denitrifying respiratory process was evaluated under these culture conditions.

3.4. Denitrification of a mixture of acetate and toluene

The performance of the denitrifying respiratory process at different acetate/toluene loading rates is shown in Fig. 2 where arrows indicate the loading rates assayed. At each TLR assayed the respiratory process was in denitrifying steady state as the rates of acetate, toluene and nitrate consumption and the volumetric rates of N₂ and HCO₃⁻ production remained within a coefficient of variation lower than 6%. It can be observed that in all cases both acetate and toluene were simultaneously and efficiently consumed. The material balance for acetate oxidation and nitrate reduction considering the estimated biomass production is shown in Table 2. Input toluene-C loading rates repre-

Table 2
Material balance of the denitrifying process that used acetate and toluene as electron donors

Loading rate acetate/toluene (mg C L ⁻¹ d ⁻¹)	C-input		C-output (mg C L ⁻¹ d ⁻¹)		
	Acetate-C	Toluene-C	Acetate-C	Toluene-C	HCO ₃ ⁻ C
250/0	251 ± 10	0	3.4 ± 1.6	0	185 ± 7
225/25	227 ± 5.3	25 ± 0.6	ND	0.2 ± 0.09	181 ± 3.5
200/50	201 ± 5.3	53 ± 3.4	7.9 ± 8	2.6 ± 1	183 ± 7.3
175/75	181 ± 2.3	76 ± 3.2	4.2 ± 0.9	1 ± 0.6	178 ± 3
150/100	154 ± 3.8	102 ± 5.2	4.6 ± 1.4	2.2 ± 0.7	174 ± 6.2
125/125	126 ± 1.2	126 ± 5.8	4.5 ± 1.7	1 ± 0.3	172 ± 4.3
	N-input	N-output	(mg N L ⁻¹ d ⁻¹)		
	NO ₃ ⁻ -N	NO ₃ ⁻ -N	NO ₂ ⁻ -N	N ₂ -N	
250/0	176 ± 9	3.9 ± 0.3	2.3 ± 0.3	151 ± 7.6	
225/25	185 ± 8	3.5 ± 0.3	2.2 ± 0.2	159 ± 7	
200/50	191 ± 5	3.5 ± 0.5	2.4 ± 0.3	164 ± 4	
175/75	182 ± 5	8.1 ± 0.8	14.4 ± 0.9	141 ± 4	
150/100	175 ± 1	9.2 ± 0.5	13.7 ± 0.9	135 ± 1	
125/125	181 ± 1	8.8 ± 0.5	13.2 ± 1.0	141 ± 3.5	

ND = not determined.

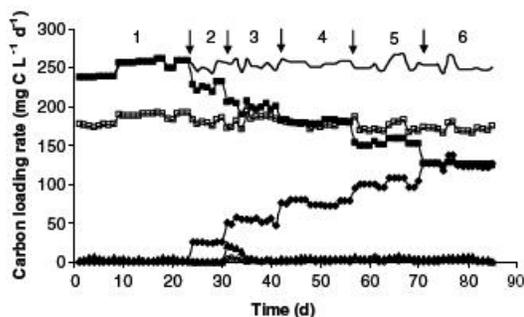


Fig. 2. Carbon profile in the denitrifying reactor fed at different acetate/toluene loading rates. Arrows and numbers indicate each loading rate assessed. — Total-C (input), ■ Acetate-C (input), ▲ Acetate-C (output), ◆ Toluene-C (input), ◇ Toluene-C (output) and □ HCO_3^- - C.

sent the toluene measured in the liquid phase of the M2 (96%) while toluene-C volumetric rates in the output represent the total measured in the effluent (liquid and gas phase). It can be observed that in the effluent only 3.4–8 mg acetate-C $\text{L}^{-1} \text{d}^{-1}$ and 0.2–2.6 mg toluene-C $\text{L}^{-1} \text{d}^{-1}$ were measured. No toluene was detected in the gas accumulated in the column as only a mixture of N_2 and CO_2 was determined. Similarly to the assays with only acetate, methane production was not detected. The toluene concentrations detected in the gas phase were lower than those measured in the abiotic assays because toluene was consumed by the denitrifying sludge. Therefore, the equilibrium was reached with the continuous feeding of toluene, the consumption process and its dissolution from the gas phase into the liquid phase. The ANOVA analysis indicated significant differences among CCE average values throughout all the experiment ($\alpha = 0.0005$). Nevertheless, the lowest value of CCE obtained (95.9 ± 3.7) will not be determinant on the performance of a wastewater treatment plant (Table 1). Likewise, the ANOVA analysis indicated significant differences among $Y_{\text{HCO}_3^-}$ average values obtained ($\alpha = 0.0005$), as $Y_{\text{HCO}_3^-}$ values decreased as TLR was increased. However, considering that the average $Y_{\text{HCO}_3^-}$ value was higher than 0.69 ± 0.04 , it is possible to say that the organic matter composed of acetate and toluene was mainly mineralized.

Multiple comparisons test indicated that the average NCE values at 25 and 50 mg toluene-C $\text{L}^{-1} \text{d}^{-1}$ did not show significant differences ($\alpha = 0.05$) if compared to those obtained with only acetate as electron source (Table 1). However, the increase of TLR to 75, 100 and 125 mg toluene-C $\text{L}^{-1} \text{d}^{-1}$ influenced the NCE as a decrease was noticed. In fact, the ANOVA statistical analysis indicated that two groups were formed ($\alpha = 0.05$). One group containing the assays with TLR of 0, 25 and 50, and a second group with the assays at TLR of 75, 100 and 125 mg toluene-C $\text{L}^{-1} \text{d}^{-1}$. The decrease in the NCE suggests that due to the increase in the TLR the nitrite oxide reductase enzyme might have been affected leading to a small accu-

mulation of nitrite in the UASB reactor (Table 2). In spite of the decrease in NCE, the average Y_{N_2} values remained higher than 0.87 ± 0.01 , indicating that the efficiency of the metabolic denitrifying pathway was not influenced by TLR even at 125 mg toluene-C $\text{L}^{-1} \text{d}^{-1}$, as the electron sources were mainly mineralized and the nitrate consumed was reduced to N_2 . These results are in accordance with the statistical analysis which indicated that no significant difference was obtained among average Y_{N_2} values. This dissimilative behaviour observed can be attributed to the low toluene concentration inside the reactor, where the highest toluene-C concentration noted was 6 mg toluene-C L^{-1} . These values are lower than those reported in the literature as responsible for negative effects. In fact, in batch cultures, Elmen et al. (1997), observed a diminishing in the denitrifying activity of the sludge at 50.4 mg toluene-C L^{-1} , while Peña-Calva et al. (2004), showed that the toluene concentrations between 85 and 100 mg toluene-C L^{-1} induced an inhibition from 4% to 21% in the specific toluene consumption rate without affecting the Y_{N_2} .

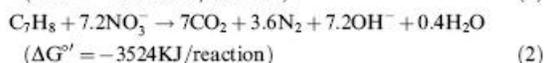
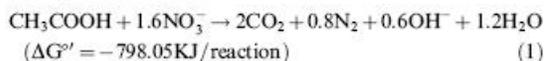
Concentration of VSS in the UASB reactor at the different loading rates of acetate and toluene remained in $3.5 \pm 0.2 \text{ g L}^{-1}$ therefore, the process continued being mainly dissimilative. In fact, the material balance of the process indicates that both acetate and toluene were mainly used as electron donors for nitrate reduction to N_2 (Table 2). This behaviour can be explained in the same terms as that obtained with only acetate.

The dissimilative behaviour of the denitrifying process observed in our work is in contrast to those previously reported. For instance, in spite of using pure and enriched cultures Schocher et al. (1991) obtained in batch cultures around 57% of toluene mineralization. Evans et al. (1991) in batch cultures with different sources of inocula estimated a significant assimilation of toluene into biomass (more than 37%). However, our results are in accordance with those obtained in batch culture by Peña-Calva et al. (2004) where toluene was completely mineralized to HCO_3^- and NO_3^- reduced to N_2 . Similar toluene consumption efficiencies were obtained by Ma and Love (2001) in a sequencing batch reactor using a mixture of benzene, toluene and isomers of xylene under denitrification conditions (5 mg L^{-1} of initial concentration of each compound). Toluene and *m*-xylene were consumed, but mineralization of both compounds to HCO_3^- as well as a complete nitrate reduction to N_2 was not confirmed.

There is some information in the literature concerning toluene consumption in continuous denitrifying culture. Zeyer et al. (1986), reported toluene consumption using a laboratory aquifer column under continuous culture with loading rates lower than the evaluated in our work ($28 \text{ mg toluene-C L}^{-1} \text{d}^{-1}$). 75% of toluene-C conversion to CO_2 was observed when denitrifying sediment previously adapted to *m*-xylene was used as inoculum. Similarly, Kuhn et al. (1988), using also a laboratory aquifer column and $28 \text{ mg toluene-C L}^{-1} \text{d}^{-1}$, observed that about 82% of the initial toluene-C was evolved as CO_2 , while 14% was

probably incorporated into the biomass. In both works, oxidation of toluene was coupled with the reduction of NO_3^- to NO_2^- , although, complete nitrate reduction to N_2 was not evidenced. Our results clearly indicate that toluene and nitrate can be efficiently converted to HCO_3^- and N_2 , respectively, in a continuous denitrifying culture even at loading rates of $125 \text{ mg toluene-C L}^{-1} \text{ d}^{-1}$.

The following thermodynamic calculations indicate the ΔG° values of toluene oxidation and acetate oxidation during denitrification.



These data allow predicting that the reaction with toluene as electron donor will occur before the acetate reaction. However, in batch culture acetate specific consumption rate is higher than toluene specific consumption rate (Peña-Calva et al., 2004). However, our experimental results indicate that both electron sources were simultaneously consumed. Su and Kafkewitz (1994), and Nahar et al. (2000), also noted the simultaneous consumption of toluene when succinate or glucose was present. Toluene mineralization was not confirmed in the both cases mentioned before but toluene consumption noted was justified in terms of a co-metabolic process. Our work demonstrated that similarly to the assays with toluene added with succinate and glucose, acetate might also be used as co-substrate for simultaneous toluene mineralization.

4. Conclusions

Acetate and toluene denitrification was successfully carried out in a continuously fed UASB reactor. The ANOVA analysis indicated significant differences among CCE average values throughout all the experiment ($\alpha = 0.0005$). As the average CCE values were higher than 95.9 ± 3.7 , TLR up to $125 \text{ mg toluene-C L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ will not be determinant on the performance of a wastewater treatment plant. Although, average $Y_{\text{HCO}_3^-}$ values decreased as TLR was increased, the average $Y_{\text{HCO}_3^-}$ value was higher than 0.69 ± 0.04 , therefore, the organic matter composed of acetate and toluene was mainly mineralized even at TLR up to $125 \text{ mg toluene-C L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. The increase in TLR from 25 to $50 \text{ mg toluene-C L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ did not influence the nitrate consumption efficiency but the increase from 75 to $125 \text{ mg toluene-C L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ caused a diminishing in the nitrate consumption efficiency. However, denitrifying respiratory process was not influenced by the TLR increases as no statistical significant difference was established among Y_{N_2} values. The results obtained in this work suggest that the simple UASB denitrifying reactor system have promising applications for complete conversion of nitrate, toluene and acetate into N_2 and CO_2 with a minimal sludge production.

Acknowledgement

Financial support by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), México, (grant 400200-5-33668-U) has been gratefully acknowledged.

References

- APHA, 1995. Standard Methods for Examination of Water and Wastewater, 19 ed. American Public Health Association, Washington DC.
- Cuervo-López, F., Martínez, F., Gutiérrez-Rojas, M., Loyola, R.A., Gómez, J., 1999. Effect of nitrogen loading rate and carbon source on denitrification sludge settleability in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Water Sci. Technol.* 40, 123–130.
- Dean, B.J., 1978. Genetic toxicology of benzene, toluene, xylenes and phenols. *Mutat. Res.* 47, 75–97.
- Duetz, W.A., Jong, C.D., Williams, P.A., Andel, J.G., 1994. Competition in chemostat culture between *Pseudomonas* strains that use different pathways for the degradation of toluene. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2858–2863.
- Edwards, E.A., Grbic-Galic, D., 1994. Anaerobic degradation of toluene and o-xylene by a methanogenic consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 313–322.
- Edwards, E.A., Wills, L.E., Reinhard, M., Grbic-Galic, D., 1992. Anaerobic degradation of toluene and xylene by aquifer by microorganisms under sulfate-reducing conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 794–800.
- 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.
- Evans, P.J., Mang, D.T., Young, L.Y., 1991. Degradation of toluene and m-xylene and transformation of o-xylene by denitrifying enrichment cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 450–454.
- Fornazzari, L., Pollanen, M.S., Myers, V., Wolf, A., 2003. Solvent abuse-related toluene leukoencephalopathy. *J. clin. forensic med.* 10, 93–95.
- Ghosh, S., Liu, T., Fukush, K., 1996. Anaerobic biodegradation of toluene in a plug-flow reactor. In: Proceedings of the HSRC/WERC Joint Conference on the Environment. Great Plains/Rocky Mountain Hazardous Substance Research Center, USA.
- Gómez, J., Méndez, R., Lema, J., 1996. The effect of antibiotics on nitrification process: batch assays. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 5, 869–876.
- 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.
- Jerry Hintze, 2001. Number Cruncher Statistical System (NCSS).
- Kuhn, E.P., Zeyer, J., Eiche, P., Schwarzenbach, R.P., 1988. Anaerobic degradation of alkylated benzene in denitrifying laboratory aquifer columns. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 490–496.
- Lee, J.Y., Choi, Y.B., Kim, H.S., 1993. Simultaneous biodegradation of toluene and p-xylene in a novel bioreactor: experimental results and mathematical analysis. *Biotechnol. Prog.* 9, 46–53.
- Lovley, D.R., Lonergan, D.J., 1990. Anaerobic oxidation of toluene, phenol and p-cresol by the dissimilatory iron-reducing organism Gs-15. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1858–1864.
- Ma, G., Love, N.G., 2001. BTX biodegradation in activated sludge under multiple redox conditions. *J. Environ. Eng.* 127, 509–516.
- Nahar, N., Alauddin, N., Quilty, B., 2000. Toxic effects of toluene on the growth of activated sludge bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 16, 307–311.
- Peña-Calva, A., Olmos, D.A., Viniestra, G.G., Cuervo, L.F., Gómez, J., 2004. Denitrification in presence of benzene, toluene, and m-xylene. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 119, 195–208.
- Phelps, C.D., Young, L.Y., 1999. Anaerobic biodegradation of BTEX and gasoline in various aquatic sediments. *Biodegradation* 10, 15–25.

- Ruiz-Aguilar, G.M.L., Fernandez-Sanchez, J.M., Kane, S.R., Kim, D., Alvarez, P.J.J., 2002. Effect of ethanol and methyl-butyl ether on monoaromatic hydrocarbon biodegradation: response variability for different aquifer materials under various electron-accepting conditions. *Environ. Toxicol. Chem.* 21 (12), 2631–2639.
- Schocher, R.J., Seyfried, B., Vazquez, F., Zeyer, J., 1991. Anaerobic degradation of toluene by pure cultures of denitrifying bacteria. *Arch. Microbiol.* 175, 7–12.
- Su, J.J., Kafkewitz, D., 1994. Utilization of toluene and xylenes by nitrate-reducing strain of *Pseudomonas maltophilia* under low oxygen and anoxic conditions. *FEMS Microbiol. Ecol.* 15, 249–258.
- Zeyer, J., Kuhn, E.P., Schwarzenbach, R.P., 1986. Rapid microbiological mineralization of toluene and 1,3-dimethylbenzene in the absence of molecular oxygen. *Appl. Environ. Microbiol.* 52, 944–947.

Author's personal copy

6.2 El acetato mejora la velocidad específica de consumo de tolueno bajo condiciones desnitrificantes.

Resumen del artículo enviado: Sergio Martínez-Hernández, Hugo C. Ramírez-Saad, Eugenia J. Olguín, Jorge Gómez and Flor de María Cuervo-López. (2007). Acetate enhances the specific consumption rate of toluene under denitrifying conditions. Submitted.

En el presente trabajo, se evaluó el efecto del acetato sobre la eliminación de tolueno por desnitrificación en cultivo continuo y en lote,. El trabajo se analizó mediante variables de respuesta fisiológicas como eficiencias de consumo, rendimientos de producto y velocidades específicas de consumo de sustrato. Además, en el cultivo continuo se analizó la estructura de la comunidad microbiana mediante la técnica molecular de DGGE. Para el cultivo continuo se utilizó un reactor UASB que fue alimentado con acetato y tolueno (C-acetato/C-tolueno) a diferentes velocidades de carga de carbono (mg C/l-d: 100/0, 75/25, 50/50, 0/100), en este caso el acetato fue disminuyendo gradualmente hasta eliminarse totalmente de la alimentación. El trabajo en lote se realizó en botellas serológicas en el cual se evaluaron diferentes concentraciones de carbono de acetato/tolueno (10/70, 30/50, 50/30 and 65/20 mg C/l). Ensayos con tolueno (20, 30, 50 y 70 mg C/l) como única fuente de carbono fueron corridos como control.

En los resultados en continuo se encontró que conforme descendió la velocidad de carga de carbono de acetato en el cultivo, las eficiencias de consumo de carbono descendieron gradualmente (de 91 a 51%). Las eficiencias de consumo de nitrógeno también descendieron de 99 a 65%. Los rendimientos tuvieron una tendencia similar ya que los rendimientos de bicarbonato pasaron de 0.82 a 0.46, mientras que los rendimientos de N₂ cayeron de 0.82 a 0.47. El análisis por DGGE mostró que el mayor número de bandas se presentó en los ensayos que contenían la mezcla acetato/tolueno comparado con los de sólo acetato. El análisis de perfil de bandas por los índices ecológicos de diversidad (H) y equitatividad (J) indicó que ciertas especies podrían estar predominando en los ensayos alimentados con sólo acetato. Sin embargo, en los ensayos con la mezcla acetato/tolueno dicho predominio no se observó, por lo que una relación entre la estructura de la comunidad microbiana y el descenso en el consumo de tolueno no pudo ser detectada.

Los ensayos en lote mostraron que la velocidad específica de consumo de tolueno (q_T) a 70 y 50 mg C/tolueno/l fue similar a la misma concentración de tolueno pero en mezcla con acetato. Sin embargo, en los ensayos en mezcla con predominio de acetato (65 mg C-acetato/20 mg C-tolueno) la q_T fue dos veces mayor comparada con los ensayos con sólo tolueno (0.006 mg C/mg SSV-d). Estos resultados indican que la velocidad específica de consumo de tolueno fue incrementada en presencia de acetato.

Los detalles metodológicos de este trabajo, así como la discusión de mismo pueden ser revisados en el siguiente artículo de investigación.

Acetate enhances the specific consumption rate of toluene under denitrifying conditions

Sergio Martínez-Hernández (1), Hugo C. Ramírez-Saad (2), Eugenia J. Olguín (3); Jorge Gómez (1) and Flor de María Cuervo-López* (1)

(1) Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, C.P. 09340 Iztapalapa, D.F. México. Tel. 5255 5804 4600 ext. 2668, * E-mail address: fmcl@xanum.uam.mx

(2) Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, C.P. 04960 Coyoacán, D.F. México.

(3) Departamento de Biotecnología Ambiental, Instituto de Ecología, A. C., C.P. 91070 Xalapa, Veracruz, México.

Abstract

Toluene is usually present in the environment along with other carbon sources which may influence its removal. Toluene mineralization by denitrification in the presence of acetate was examined in order to evaluate the influence of a readily consumable compound on toluene oxidation. Continuous and batch cultures with stabilized denitrifying sludge were carried out. An upflow anaerobic sludge blank (UASB) reactor was fed with several ratios of acetate and toluene (acetate-C/toluene-C) at different carbon loading rates (mg C/l-d: 100/0, 75/25, 50/50 and 0/100). As the acetate loading rate decreased in the culture, the carbon and nitrate consumption efficiency decreased from 91 to 51% and from 99 to 65%, respectively. The HCO_3^- and N_2 yields also decreased from 0.82 to 0.46 and 0.82 to 0.47, respectively. The dynamics of denitrifying community profile by means of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) indicated that there was no prevalence of a certain microbial population in the community. Batch assays with different acetate-C/toluene-C ratios (10/70, 30/50, 50/30 and 65/20 mg C/l) were made. The results indicated that the specific consumption rates of toluene (q_T) obtained at 70 and 50 mg toluene-C/l were similar to those obtained at the same concentration of toluene mixed with acetate (10 mg acetate-C/l /70 toluene-C; and 30 mg acetate-C/l /50 mg toluene-C). When acetate was predominant (65 mg acetate-C/l /20 mg toluene-C/l) the q_T was two times higher as compared to assays with 15 mg toluene-C as electron source (0.006 mg

C/mg VSS-d). The results showed that specific consumption rate of toluene improved in the presence of acetate.

Keywords: acetate, denitrification, readily-consumable compound, toluene mineralization

Introduction

Toluene along with benzene and xylenes (BTX) are produced by petrochemical industries in vast amounts each year (Chin et al., 1996). These are main pollutants linked with petroleum releases from pipelines, refineries or leaking from underground storage tanks. Toluene has a widespread use in the chemical and petroleum industry (Vanderberg, 2000). It is widely used as an organic solvent contributing to 80% in paints, 56% in thinners, and 51% in adhesives (Kumai, 1983). Toluene is often present in contaminated soils and aquifers along with other carbon sources which might influence the rate and extent of its elimination (Lovanh and Alvarez, 2004). Under aerobic conditions, toluene elimination is inhibited in the presence of succinate (Duetz, 1994) and acetate (Lovanh and Alvarez, 2004). Other studies have also shown that the consumption efficiencies of toluene decreased in the presence of ethanol (Da Silva et al., 2005). Anaerobic elimination of toluene in the presence of readily consumable carbon is also reported. Su and Kafkewitz (1994) have demonstrated that a nitrate-reducing strain of *Pseudomonas maltophilia* was capable of utilizing toluene and succinate simultaneously and both substrates were used for microbial growth. However, the end products as CO₂ and N₂ were not mentioned. Edwards and Grbic-Galic (1994) found that addition of alternate carbon sources such as acetate and glucose inhibited toluene elimination under methanogenic conditions. They also observed that inhibition of toluene elimination was notable as the availability of the alternate substrate increased in the culture. Corseuil et al. (1998) observed the effect of ethanol on microbial consumption of BTX compounds in iron reducing, denitrifying, sulfidogenic and methanogenic microcosms. In all these cases, toluene was consumed after ethanol had been completely removed. Ethanol negatively influenced toluene elimination in iron-reducing and methanogenic microcosms. However, in denitrifying microcosms ethanol addition did not affect the

consumption of toluene. Under sulfate reducing conditions however, ethanol enhanced toluene consumption, although the magnitude of this beneficial interaction was not quantified. The enhancement in consumption rate of hydrocarbons in the presence of easily consumable substrates has been attributed to a possible increase of toluene consumer populations (Courseil et al., 1998), but the evidences are still scarce. In these sense, the use of molecular biological techniques could be useful to determine the influence of alternative carbon sources on microbial consortium exposed to monoaromatic hydrocarbons.

The evidences indicate that the presence of easily consumable compounds could generate varied effects on toluene elimination. Researchers have observed that the type of cosubstrate as well as respiratory process play an important role in microbial elimination of toluene mixtures. Many of the published studies have mainly focused on evaluating the effect of alternate carbon sources on toluene consumption. However, data about mineralization and consumption rate of toluene are seldom found in the literature. A better understanding of the physiology and kinetics of toluene elimination could be very useful in the implementation of a wastewater treatment technology.

The purpose of this work was therefore to evaluate the effect of a readily consumable carbon source such as acetate on toluene mineralization under denitrifying conditions employing consumption efficiencies, yield products and substrate specific consumption rates as variables of response. We also monitored the dynamics of the denitrifying community in order to determinate whether a relationship between its profile and toluene oxidation activity exists. DGGE was used as a community profiling technique and relative quantification of bands were used to determine diversity and equitability indices (Shannon and Weaver, 1963).

Materials and methods

UASB reactor: continuous assays

Two UASB reactors of 1.4 l (working volume) with a head space volume of 0.11 l were set up (Martínez et al., 2007). The UASB1 reactor was used for the continuous assays with acetate and toluene, whereas the UASB2 reactor was fed with acetate and used as inoculum source for batch assays. Anaerobic sludge (8 g of volatile suspended solids (VSS)/l) obtained from a domestic wastewater treatment plant was used as inoculum. The reactors were fed with a mineral medium (MM) prepared as follows (g/l): $\text{CuSO}_4 \cdot 5(\text{H}_2\text{O})$, 0.06; FeCl_3 , 0.1; $\text{CaCl}_2 \cdot 2(\text{H}_2\text{O})$, 0.6; KH_2PO_4 , 3; MgSO_4 , 0.6 and NaMoO_4 , 0.06. The MM for feeding UASB reactors was divided into medium 1 (M1) and medium 2 (M2). M1 contained $\text{CuSO}_4 \cdot 5(\text{H}_2\text{O})$, FeCl_3 and nitrate. M2 contained the other compounds and the acetate and/or toluene as electron donors and was kept at 5 ± 2 °C. Flasks containing M1 and M2 were bubbled with a current of helium for 10 min to displace oxygen. Polytetrafluorethylene tubing (Cole-Parmer) was used for feeding the reactors. Both reactors were first fed with an acetate loading rate of 100 mg acetate-C/l-d and 71 mg NO_3^- -N/l-d of nitrate loading rate. When the sludge of both reactors reached the denitrifying steady state, acetate-C loading rate in UASB1 reactor was gradually substituted by different loading rates (C/l-d), resulting in the following acetate-C/toluene-C ratios: 75/25, 50/50 and 0/100. The UASB2 reactor remained fed with 100 mg acetate-C/l-d and 71 mg NO_3^- -N/l-d. A total constant carbon loading rate of 100 mg C/l-d was fed through out in all cases. In both reactors, nitrate concentration was adjusted to obtain a C/N ratio of 1.4. The hydraulic retention time (HRT) was maintained at two days and each loading rate was held at least 5 times the HRT.

Abiotic assays to verify possible losses of toluene and toluene adsorption were conducted in the UASB1 reactor as reported by Martínez et al. (2007). Two control assays were also carried out; one contained denitrifying sludge, culture medium, nitrate and no electron source. The second control contained denitrifying sludge, culture medium and electron source but without nitrate. In all cases, standard deviations were calculated from at least five independent measurements obtained during the steady state of denitrification.

Batch culture

Inoculum source

The inoculum for batch assays was obtained from the UASB2 reactor. Prior to each batch assay the stabilized sludge was withdrawn from the UASB reactor and washed with saline solution (0.9% NaCl).

Culture conditions

The assays were carried out in serologic bottles of 60 ml. Each bottle was an independent experimental unit and after sampling was discarded. Different ratios of acetate-C/toluene-C concentrations (mg C/l) were evaluated as follows: 65/20, 50/30, 30/50, 10/70. Assays with nitrate and different concentrations of toluene (mg C/l: 20, 30, 50 and 70) were done as control. 55 ml of mineral media (M1 and M2) was placed in each bottle leaving a headspace volume of 5 ml. The bottles were seeded with stabilized denitrifying sludge obtaining a final concentration of 1.0 ± 0.11 g VSS/l. Each experimental unit was sealed then nitrogen and oxygen were displaced by a current of helium for 10 minutes. Finally, toluene was added to the culture. The bottles were supplemented with nitrate to oxidize the organic matter by stoichiometry. Bottles were placed on a shaker at 150 rpm and incubated at 30 °C. The initial pH was 7. Control assays were conducted in serologic bottles similar to those in UASB1 reactor. The values obtained in assays represented mean values and the \pm range from two independent samples. T test for two samples was also made. Number Cruncher Statistical System (NCSS, Jerry Hintze, 2001) was the computation package used for calculation.

Molecular analysis

DNA extraction

A 1.5 ml sample of denitrifying sludge was withdrawn from the UASB1 reactor in steady state denitrification at the different acetate-C/toluene-C ratios (mg C/l-d: 100/0, 75/25 and 50/50). The DNA of the anaerobic inoculum used for seeding the UASB1 reactor was also extracted. The samples were subjected to bead beating and then DNA was extracted as described by Felske et al. (1998). The size of the DNA obtained was estimated by agarose gel electrophoresis by ethidium bromide staining.

PCR reaction and DGGE.

DNA extracted from denitrifying sludge was used as template to amplify the V6-V8 variable regions of the 16S rDNA gene (Muyzer et al., 1993) by the universal bacterial primers 968 forward and 1401 reverse. The PCR reaction was done with a total volume

of 25 μ l, under the following conditions: 15.8 μ l sterile water, 2.5 μ l of PCR buffer (10X, 100 Tris/HCL pH 9, 500 mM of KCl), 3.0 μ l of $MgCl_2$ (25 mM), 0.5 μ l of deoxynucleoside triphosphates (0.2 mM each), 1 μ l of each primer (0.2 μ M), 0.2 μ l Taq DNA polymerase (promega) and 1 μ l of DNA extracted. The PCR conditions was as follows: an initial denaturing step for 5 min at 94 $^{\circ}C$ was followed by 35 cycles of 30 s at 94 $^{\circ}C$, 20 s at 55 $^{\circ}C$ and 40 s at 68 $^{\circ}C$. The amplicons obtained by PCR were separated by DGGE system as described by Muyzer et al. (1993). A gradient of gel from 40 to 56% was used (100% denaturant stock solution was made of 7 M urea and 40% formamide).The gel was run at 60 $^{\circ}C$ for 16 h at 85 V. Fixation and silver staining of the gels was according to Sanguinetti et al. (1994). Finally the gel was scanned (Arcus 1200,AGFA).

Structural diversity, richness and evenness of microbial community were approached by the ecological indices of diversity (H) and equitability (J) proposed by Shannon and Weaver (1963) as implemented by Begon et al. (1990). The indices were derived from the following equations $H = - \sum P_i \ln P_i$ and $J = H/\ln S$. The term P_i is the relative abundance of the bands in a lane and was calculated as follows: $P_i = n_i/N$, where n_i is the band intensity for individual bands and N is the sum of intensities of bands in a lane. S represents the total number of bands in the sample.

Estimation of both indices was based on the DGGE profiles. Each band within a profile was considered as fragments of different microbial populations, while bands with similar migration position in different profiles could be regarded as a fragment of the same population. The relation between the surface of band and mean pixel intensity of that area was considered as the intensity of the band and was calculated by using the image analysis program Image J (public domain image processing and analyzer program), developed at the National Institutes of Health.

Analytical methods

Acetate concentration was measured by gas chromatography (HP model 5890, NJ USA) with a flame ionization detector (FID) and a capillary column (10 m and 0.53 mm internal diameter, Alltech AT 1000, Deerfield IL, USA). The temperatures of the column, detector and injector were 120, 150 and 130 $^{\circ}C$ respectively. The carrier gas was N_2 (4.5 ml/min). The concentration of toluene was determined in the liquid and gas phase by gas

chromatography (Star Varian model 3400, Walnut Creek, CA, USA) with FID using a capillary column (30 m and 0.53 mm internal diameter) with a stationary phase carbowax/BTR (Quadrex, Woodbridge CT, USA). The temperatures of the column, detector and injector were 60, 235 and 250 °C, respectively. N₂ was used as carrier gas (4 ml/min). Benzylsuccinate and benzoate were determined by HPLC (Perkin Elmer, Shelton, CT, USA) using a C18 reverse-phase column (phenomenex, Torrance, CA, USA) and a UV detector at 260 nm. The mobile phase was methanol/sodium formate (40 mM) (50/50 v/v) at a flow of 1.2 ml/min. N₂, N₂O, CH₄ and CO₂ were quantified by gas chromatography (Varian model 3350, Walnut Creek, CA, USA) with a thermal conductivity detector and a stainless steel packed column (porapak Q on 80/100 mesh, 1.2 m and 1/8 in internal diameter). The temperatures of the column, detector and injector were 40, 100 and 100° C, respectively. The carrier gas was helium (18 ml/min). The nitrite and nitrate content was measured by capillary electrophoresis (Millipore, model 4000, Bedford, MA) as described by Gomez et al. (1996). The organic and inorganic carbon was analyzed in a total organic carbon (TOC) analyzer (Shimadzu, TOC-5000A, Australia) as reported by Cuervo-López et al. (1999). Total and volatile suspended solids (TSS, VSS) contents were determined at the end of each assay following standard methods (APHA 1995). Standard curves were drawn in triplicates for each analytical method. In all cases, the coefficient of variation of slope, coefficient of determination (R²) and intercept was less than 8%.

Evaluation of culture behavior

Carbon mineralization from acetate and toluene was measured as HCO₃⁻ produced. The total HCO₃⁻ was determined as the difference between HCO₃⁻ generated by the culture against those measured in the controls without electron source. A similar procedure was used to determine the N₂ produced. In all cases, the coefficient of variation was less than 10%. Respiratory behavior of the sludge was evaluated by consumption efficiencies (*E*, mg substrate consumed/mg substrate fed), yield products (*Y*, mg product/mg substrate consumed) and substrate consumption specific rates (*q_s*, mg of substrate consumed/ [mg of VSS-d]).

RESULTS AND DISCUSSION

Continuous culture

Abiotic and control assays.

Toluene measured in the influent reservoir kept at 5 °C was close to 96%, while the rest was found in the head space of the bottle. Toluene fed to the reactor (116 ± 3 mg toluene-C/l-d at least during 3 HRT) showed that 74 ± 4 % was dissolved in the culture while the rest was found in the head space of the reactor. As no loss of toluene was detected along the UASB1 reactor, it resulted to be a useful system for the evaluation of toluene during the denitrifying process. Likewise, no consumption of substrates was observed in control assays in the UASB1 reactor indicating that there was no nitrate reduction in the sludge without adding an electron source and vice versa.

Denitrification with acetate and toluene

Acetate-C (E_A), toluene-C (E_T) and nitrate ($E_{NO_3^-}$) consumption efficiencies as well as HCO_3^- (Y_{HCO_3}) and N_2 (Y_{N_2}) yield values were calculated from the assays with different acetate-C/toluene-C loading rates as shown in Table 1. In the assays fed with only acetate the E_A and $E_{NO_3^-}$ were $97 \pm 1.7\%$ and $99 \pm 1\%$, respectively. The yield values of HCO_3^- and N_2 formation showed that the acetate consumed was mainly mineralized to HCO_3^- and NO_3^- was reduced to N_2 . Under these conditions, according to the mass balance (Table 2), it was estimated that around 23% of the carbon and 11% of the nitrate consumed were used for sludge formation. This behavior is in accordance to Mateju et al. (1992) who indicated that under C/N ratio of 1.4 the process was mainly dissimilative. As consumption and production volumetric rates of bicarbonate (74.5 ± 3 mg HCO_3^- -C/l-d) and N_2 (60.4 ± 5.5 mg N_2 /l-d) remained within a variation level of less than 10% (Table 2) the denitrification was operated in steady state. Under these conditions different acetate-C/ toluene-C ratios were evaluated.

At an acetate-C/toluene-C ratio of 75/25 (mg C/l-d), the E_A , E_T , $E_{NO_3^-}$, Y_{HCO_3} and Y_{N_2} values were similar to those without toluene (Table 1). The Y_{HCO_3} values obtained in these assays were similar to those found by Zeyer et al. (1986) and Kuhn et al. (1988), when denitrifying sediment previously adapted to monoaromatic hydrocarbons and 28 mg toluene-C/l-d were used. Toluene oxidation was reported in both works, although the reduction of NO_3^- to N_2 was not mentioned.

When acetate loading rate diminished in the culture (50/50 and 0/100 acetate-C/toluene-C ratios) the values of E_T , $E_{NO_3^-}$ and yield decreased. The E_A remained constant, but the E_T

decreased 40% and the $E_{\text{NO}_3^-}$ decreased 34% resulting in an increase of nitrate, toluene and nitrite outlet rates. The $Y_{\text{HCO}_3^-}$ and Y_{N_2} values decreased to 43 and 42%, respectively. The mass balance also indicated a decrease in the biomass production rate (mg-C/l-d) (Table 2). The decrease in Y_{N_2} values (Table 1) suggests that metabolic denitrifying pathway might have been affected at the level of nitrite oxide reductase enzyme. As total reducing source was not limited for the reduction of the nitrate, the behavior of the denitrifying sludge appears be related to the decrease of acetate loading rate. This result might be explained in terms of the specific consumption rate for both electron sources. Peña-Calva et al. (2004) evidenced that toluene consumption rate was much lower than the acetate consumption rate during denitrification. Thus, the decreasing in the acetate loading rate resulted in a lower rate of nitrate reduction and nitrite accumulation (Table 2).

The pattern of bands obtained by DGGE at the different mixtures of acetate-C/toluene-C in the continuous reactor is shown in Fig. 1. These patterns were analyzed to elucidate the possible structural changes in the microbial community. It can clearly be seen 9 to 21 distinguishable bands which illustrate the structure of the microbial community at different times in the UASB1 reactor. Some differences were noted in position, intensity and number of bands in the bacterial DGGE patterns. Some bands remained constant throughout experimentation, while other bands vanished. The results of the analysis of banding pattern in terms of Shannon (H) and equitability (J) indexes are shown in Table 3. A high H value of 2.87 was obtained for the inoculum source (lane 1). This inoculum came from a domestic wastewater treatment plant and therefore, the H value could be taken as the start point (control for changes). The H values decreased when the denitrifying consortium was fed with acetate as sole electron donor. Nevertheless, these values increased again when the bacterial community was fed with acetate plus toluene (lanes 6 to 8). The J index values for the inoculum and the assays with different the mixtures of acetate-C/toluene-C (lanes 1, 6-9) were close to 1 (0.94-0.97) irrespective of the mixture acetate-C/toluene-C fed. This results indicated that all cases resulted in microbial population rough similar among them, although the bands were not necessarily the same. However, the J values of 0.82-0.85 obtained in the assays with only acetate (lanes 2 to 5) indicated that certain populations predominate in these assays if compare to

the rest of them (0.94-0.97, lanes 1, 6-9). Therefore, considering that J values obtained at the different acetate-C/toluene-C ratios assays were between 0.96-0.97, it is possible to say that no clear relationship was found between shifts in the microbial community composition and the changes in metabolism, namely, the decrease in the toluene elimination efficiency and yield.

In order to obtain evidences and to be able to understand the role of acetate over the toluene oxidation rate, different mixtures of acetate-C/toluene-C ratios were assayed in batch culture.

Batch culture

Control assays

The pattern observed in the serologic bottles was similar to those obtained in the continuous control assays. There was no nitrate consumption in the sludge without the addition of the electron source.

Denitrification with acetate and toluene

The assays were conducted at initial toluene concentrations ranging from 20 to 70 (mg toluene-C/l) taking into account that it has been reported that toluene concentrations between 85 and 100 mg toluene-C/l produced an inhibition in the specific toluene consumption rate ranging from 4 to 21% (Peña-Calva et al., 2004).

Results of E_A , E_T and $E_{NO_3^-}$ as well as $Y_{HCO_3^-}$ and Y_{N_2} values obtained in assays with toluene in presence or absence of acetate are shown in Table 4. In all cases the E_A was close to 100%, the $E_{NO_3^-}$ values oscillated between 92 and 99%, while E_T reached values higher than 95%. In all assays a concomitant oxidation of organic matter to HCO_3^- and nitrate reduction to N_2 was observed, with $Y_{HCO_3^-}$ values around 0.71 ± 0.03 and 0.88 ± 0.01 and Y_{N_2} values between 0.88 ± 0.03 and 0.96 ± 0.01 . These results indicated that both acetate and toluene were mainly mineralized to HCO_3^- through denitrification. Taking into account these variables of response, acetate did not affect either the toluene consumption efficiency or yields (metabolic pathway) in the denitrifying process. Courseil et al. (1998) obtained similar values of consumption efficiencies when they studied toluene elimination mixed with ethanol under denitrifying conditions. The authors mentioned that the presence of ethanol (100 mg/l) did not affect the toluene removal efficiency significantly if nitrate was in excess. They observed toluene

consumption along nitrate removal; however, no information on mass balance or end products was included. Gusmao et al. (2006) evaluated BTEX consumption separately (between 14 and 33 mg/l of each BTEX) or in mixtures (5 mg/l of each hydrocarbon) in the presence of ethanol (566 mg/l) in a horizontal-flow anaerobic, immobilized biomass reactor containing denitrifying biomass. Hydrocarbons removal efficiencies were similar to those noted in our work, although these authors did not provide data about the fate of the consumed substrates.

The profile of toluene consumption alone or mixed with different acetate concentrations is shown in Fig. 2. Acetate was consumed during the first 6 h of process in all cases. No significant statistical difference was established between the lag phase of toluene consumption in assays with only toluene when compared to that obtained in acetate and toluene assays. Therefore, acetate did not retard the start of toluene elimination. This behavior is different to some works reported in aerobic culture where the presence of easily consumable compounds retarded consumption of toluene (Corseuil et al., 1998; Da Silva and Álvarez, 2002). In the present work, a comparison between assays with the same concentration of toluene mixed with acetate and those with only toluene were conducted. We observed that the time required for the total consumption of toluene plus acetate was smaller than that observed in toluene alone assays. Thus, the time required for toluene consumption was diminishing as the acetate concentration increased in the culture. This reduced consumption time resulted in an increase in toluene consumption rate, indicating that presence of acetate improved the consumption rate of toluene. The magnitude of this effect is presented in Fig. 3, where the specific consumption rates of toluene in the mixture with acetate versus toluene alone are compared. It was observed that q_T obtained with only 70 and 50 mg toluene-C/l was similar to those obtained at the same concentration of toluene in presence of acetate. However, at the ratio of 50 mg acetate-C/l /30 mg toluene-C/l, the q_T was 25% greater ($\alpha = 0.05$) with respect to the q_T obtained in assays with only toluene. Interestingly, this increase was higher in the assays with 65 mg acetate-C/l / 20 mg of toluene-C/l, since the q_T was twice ($\alpha = 0.029$) compared to that obtained at 20 mg toluene-C/l (Fig. 3). Duetz et al. (1994) observed that the presence of succinate repressed the enzymes involved in the pathway of toluene consumption under aerobic conditions. Edwards and Grbic-Galic (1994), observed that

the addition of acetate, propionate or glucose inhibited toluene consumption efficiency under methanogenic conditions. On the other hand, the positive effect of easily degradable compounds on the consumption rate of toxic compounds has also been observed in hydrocarbons under different respiratory processes. According to Corseuil et al. (1998), observed that ethanol enhanced toluene elimination rate under sulfate reducing conditions. Ebihara and Bishop (2002a, b) studied the effect of acetate on the consumption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) such as naphthalene, phenanthrene and pyrene under aerobic conditions using sand columns. They found that the addition of acetate improved the PAH consumption rate (not quantified) owing to the increase in the viable biomass. The increase in the consumption rate of hydrocarbons in the presence of easily consumable substrates has also been attributed to an increase in toluene consuming populations (Courseil et al., 1998). The increase in toluene elimination rate observed in our work might be the result of a higher biomass production in the presence of acetate. In fact, in the continuous culture the mass balance indicated a minor biomass formation when acetate decreased in the culture (Table 2). However, our results from batch cultures indicated that acetate and toluene were practically mineralized resulting in a small production of biomass and that the presence of acetate enhanced the specific consumption rate of toluene. On the other hand, the analysis of banding pattern in terms of Shannon and equitability indexes in continuous culture showed that J index values were close to 1 irrespective of the acetate-C/toluene-C ratio. Therefore, there was no prevalence of a certain microbial population in the community. These results suggest that qt was not clearly related with the shifts in the composition of the microbial community. Our results suggest that acetate might be acting as a biochemical positive catalyst of toluene anoxic oxidation enhancing the rate of its consumption. Accordingly, the results shown here give the impression of qt was not related to biomass increase. Regarding this, more work is required to be done in this aspect.

CONCLUSIONS

Toluene mineralization by denitrification performed in an UASB1 reactor fed at different acetate-C/toluene-C loading rates (100/0 to 0/100 mg C/l d) showed that as the acetate loading rate decreased in the culture, the total organic carbon and nitrate consumption

efficiency as well as yield values, decreased. According to J index values between 0.96-0.97, no clear relationship was found between shifts in the composition of the microbial community and the decrease in the toluene elimination efficiency, as there was no predominance of certain population in the microbial community. Batch assays indicated that when acetate was predominant (65 mg acetate-C/l /20 mg toluene-C/l) the specific consumption rates of toluene (0.0013 mg C/mg VSS-d) increased two times in respect of assays with 20 mg toluene-C/l as the only electron source (0.006 mg C/mg VSS-d). The results obtained here evidence that the specific consumption rate of toluene increased in the presence of a readily consumable substrate such as acetate. The batch culture results suggest that acetate acted as a possible positive biochemical catalyst on the oxidative pathway of toluene. The results obtained in this work can be useful in the remediation of contaminated sites with monoaromatic hydrocarbons where oxygen is absent and anaerobic processes such as denitrification are predominant.

ACKNOWLEDGEMENTS

Financial support by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), México, (grant SEP-2003-C02-43144).

REFERENCES

- Alvarez, P.J.J., Vogel, T. M., 1991. Substrate Interactions of benzene, toluene, and para-xylene during microbial degradation by cultures and mixed culture aquifer slurries. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (10), 2981-2985.
- APHA, 1995. Standard methods for examination of water and wastewater. 19 ed. American Public Health Association, Washington D.C. pp 2-56, 2-57.
- Begon, M., Harper, J. L., Townsend, C.R., 1990. *Ecology: individuals, populations and communities*. 2nd Edn., 945 pp. Blackwell Scientific Publication, Cambridge.
- Chin, K.K, Ong, S.L, Poh, L.H, Kway, H.L., 1996. Wastewater treatment with bacterial augmentation. *Wat. Sci. Technol.* 33, 17-22.

- Corseuil, H.X., Hunt, C.S., Ferreira-Dos santos, R.C., Alvarez, P.J.J., 1998. The influence of the gasoline oxygenate ethanol on aerobic and anaerobic BTX biodegradation. *Wat. Res.* 32 (7), 2065-2072.
- Cuervo-López, F., Martínez, F., Gutiérrez-Rojas, M., Loyola, R. A., Gómez, J., 1999. Effect of nitrogen loading rate and carbon source on denitrification sludge settleability in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Wat. Sci. Tech.* 40, 123-130.
- Da Silva, M.L.B., Alvarez, P.J.J., 2002. Effects of ethanol versus MTBE on benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene natural attenuation in aquifer columns. *J. Environ. Eng.* 128, 862–867.
- Da Silva, L.B.M., Ruiz-Aguilar, G.M.L., Alvarez, P.J.J., 2005. Enhanced anaerobic biodegradation of BTEX-ethanol mixtures in aquifer columns amended with sulfate, chelated ferric iron or nitrate. *Biodegradation.* 16, 105-114.
- Duetz, W.A., Marques, S., De Jong, C., Ramos J.L., Van Andel, J.G., 1994. Inductibility of the TOL catabolic pathway *Pseudomonas putida* (pWW0) growing on succinate in continuous cultures: evidence of carbon catabolite repression control. *J. Bacteriol.* 176, 2354-2361.
- Ebihara, T., Bishop, P.L., 2002a. Influence of supplemental acetate on bioremediation for dissolved polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Environ. Eng.* 128, 505-513.
- Ebihara, T., Bishop, P.L., 2002b. Effect of acetate on biofilms utilized in PAH bioremediation. *Environ. Eng. Sci.* 19 (5), 305-319.
- Edwards, E.A., Grbic-Galic, D., 1994. Anaerobic degradation of toluene and *o*-xylene by a methanogenic consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* 60 (1), 613-622.
- Felske, A., Backhaus, H., Akkermans, A.D.L., 1998. Direct ribosome isolation from soil. In: *Molecular microbial ecology manual* (Akkermans, A.D.L., de Bruijn F.J. and van Elsas, J. d., Eds.), chap 1.2.4. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands.
- Gómez, J., Méndez, R., Lema, J., 1996. The effect of antibiotics on nitrification process: Batch assays. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 57, 869-876.
- Gusmao, V.R., Martins, T.H., Chinalia, F.A., Sakamoto, I.K., HenriqueThiemann, O., Varesche, M.B.A., 2006. BTEX and ethanol removal in horizontal-flow anaerobic

- immobilized biomass reactor, under denitrifying condition. *Process Biochem.* 41, 1391–1400.
- Jerry Hintze, 2001. Number Cruncher Statistical System (NCSS).
- Kuhn, E.P., Zeyer, J., Eiche, P., Schwarzenbach, R.P., 1988. Anaerobic degradation of alkylated benzenes in denitrifying laboratory aquifer columns. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 490-496.
- Kumai, M., Loizumi, A., Saito, K., Sakura, H., Inoue, T., Takeuchi, Y., Hara, I, Ogata, M, Matsushita, T., and Ikeda, M., 1983. A nationwide survey on organic solvent components in various solvent products. II. Heterogeneous products such as paints, inks, and adhesives. *Ind. Health.* 21, 185-197.
- Lovanh, N., Alvarez, P.J.J., 2004. Effect of ethanol, acetate, and phenol on toluene degradation activity and *tod*–*lux* expression in *Pseudomonas putida* TOD 102: evaluation of the metabolic flux dilution model. *Biotechnol. Bioeng.* 86 (7), 801-808.
- Martinez, S., Cuervo-Lopez, F.M., Gomez, J., 2007. Toluene mineralization by denitrification in an up flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. *Bioresour. Technol.* 98, 1717- 1723.
- Mateju, V., Cizinska, S., Krejci, J., Janoch, T., 1992. Biological water denitrification. A review. *Enzyme Microb. Technol.* 14, 170-183.
- Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695-700.
- Peña-Calva, A, Olmos, D.A, Viniegra, G.G, Cuervo, L.F., Gómez, J., 2004. Denitrification in presence of benzene, toluene, and *m*-xylene. *Appl. Biochem. Biotech.* 119, 195-208.
- Reardon, K.F., Mosteller, D.C., Rogers, B.J., 2000. Biodegradation kinetics of benzene, toluene, and phenol as single and mixed substrates for *Pseudomonas putida* F1. *Biotechnol. Bioeng.* 69 (4), 526-536.

- Sanguinetti, C.j., Dias Neto, E., Simpson, A.J.G., 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Bio Techniques*. 17, 915-919.
- Shannon, C.E., Weaver, W., 1963. *The mathematical theory of communication*. University of Illinois Press, Urbana.
- Su, J.J., Kafkewitz, D., 1994. Utilization of toluene and xylenes by a nitrate reducing strain of *Pseudomonas maltophilia* under low oxygen and anoxic conditions. *FEMS Microbiol. Ecol.* 15, 249-258.
- Vanderberg, L.A., Krieger-Grumbine, R., Taylor, M.N., 2000. Evidence for diverse oxidations in the catabolism of toluene by *Rhodococcus rhodochrous* strain OFS. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53, 447-452.
- Zeyer, J., Kuhn, E.P., Schwarzenbach, R.P., 1986. Rapid microbial mineralization of toluene and 1,3-dimethylbenzene in the absence of molecular oxygen. *Appl. Environ. Microbiol.* 52, 944-947.

Table 1 - Substrate consumption efficiencies and yield product values of the denitrifying process using acetate and toluene as electron source in the continuous UASB reactor.

Loading rate acetate/toluene mg C/l-d	Consumption efficiency *			Yield product **	
	Carbon		NO ₃ ⁻ -N	HCO ₃ ⁻	N ₂
	Acetate	toluene			
100/0	97± 1.7	-	99 ± 1	0.78 ± 0.03	0.82 ± 0.08
75/25	91± 1.5	91 ± 1	99 ± 2	0.82 ± 0.02	0.76 ± 0.03
50/50	93 ± 3.5	82 ± 6.3	95 ± 7.8	0.65 ± 0.07	0.66 ± 0.08
0/100	-	51 ± 1.8	65 ± 3.73	0.46 ± 0.06	0.47 ± 0.04

* = (mg substrate consumed/ mg substrate fed) x100.

** = (mg product/ mg substrate consumed).

Table 2 - Material balance of the denitrifying process using acetate and toluene as electron donors in continuous culture.

Loading rate acetate/toluene mg C/l-d	C- input (mg C/ l-d)		C-output (mg C/l-d)			
	Acetate	Toluene	Acetate	Toluene	CHO ₃ ⁻	Biomass
100/0	98.2 ± 2	-	2.9 ± 0.3	-	74.5 ± 3	22.02
75/25	80 ± 2.1	24.5 ± 2	7 ± 0.6	2 ± 0.1	79 ± 1.5	24.26
50/50	53 ± 1.3	53 ± 3	3.3 ± 0.4	9.5 ± 0.8	61± 6.2	21.73
0/100	-	96 ± 1.2	-	47 ± 1.4	23 ± 3.9	12.5
Loading rate acetate/toluene mg C/l-d	N-input (mg N/l-d)		N-output (mg N/l-d)			Biomass
	NO ₃ ⁻	NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻	N ₂		
100/0	74 ± 3	0.12 ± 0.1	0.8 ± 0.39	60.4 ± 5.5	8.66	
75/25	71 ± 1	0.7 ± 0.1	0.5 ± 0.1	53.2 ± 3	9.9	
50/50	74 ± 3.7	3 ± 0.2	13 ± 3	47 ± 6.5	8.9	
0/100	72.6 ± 1	25 ± 2.8	12.3 ± 2	22.3± 1.8	4.2	

Table 3 - Shannon's diversity (H) and equitability (J) indices for each lane. The estimation of H and J was based on the DGGE profiles illustrated in Figure 1. S represents the number of quantifiable bands in each profile.

Indices	Lanes							
	1	2	3	4	5	6	7	8
H	2.87	1.87	2.05	1.96	1.90	2.87	2.62	2.69
J	0.942	0.851	0.854	0.851	0.825	0.974	0.967	0.970
S	21	9	11	10	10	19	15	16

Lane 1, inoculum source; lanes 2, 3 4 and 5 denitrifying sludge fed only with acetate at 100 mg C/l-d; lane 6, denitrifying sludge fed at ratio acetate-C/toluene-C of 75/25 mg C/l-d; lanes 7 and 8, denitrifying sludge fed with acetate-C/toluene-C a ratio of 50/50 mg C/l-d.

Table 4 - Substrate consumption efficiencies, yield product values of the denitrifying process using acetate and toluene as electron source in batch culture.

Concentration acetate/toluene mg C/l	Consumption efficiency *			Yield product **	
	Carbon		NO ₃ ⁻ -N	HCO ₃ ⁻	N ₂
	Acetate	toluene			
0/20	-	96 ± 1	100 ± 1	0.77 ± 0.03	0.92 ± 0.02
65/20	100 ± 1	95 ± 2	100 ± 1	0.77 ± 0.02	0.96 ± 0.01
0/30	-	99 ± 1	99 ± 1	0.84 ± 0.05	0.88 ± 0.03
50/30	100 ± 2	96 ± 1	100 ± 2	0.78 ± 0.02	0.96 ± 0.02
0/50	-	99 ± 1	98 ± 1	0.80 ± 0.01	0.86 ± 0.01
30/50	100 ± 1	96 ± 1	100 ± 1	0.75 ± 0.02	0.94 ± 0.03
0/70	-	98 ± 1	92 ± 2	0.88 ± 0.01	0.93 ± 0.02
10/70	100 ± 1	99 ± 2	99 ± 1	0.71 ± 0.03	0.93 ± 0.02

* = (mg substrate consumed/ mg substrate fed) x100.

** = (mg product/ mg substrate consumed).

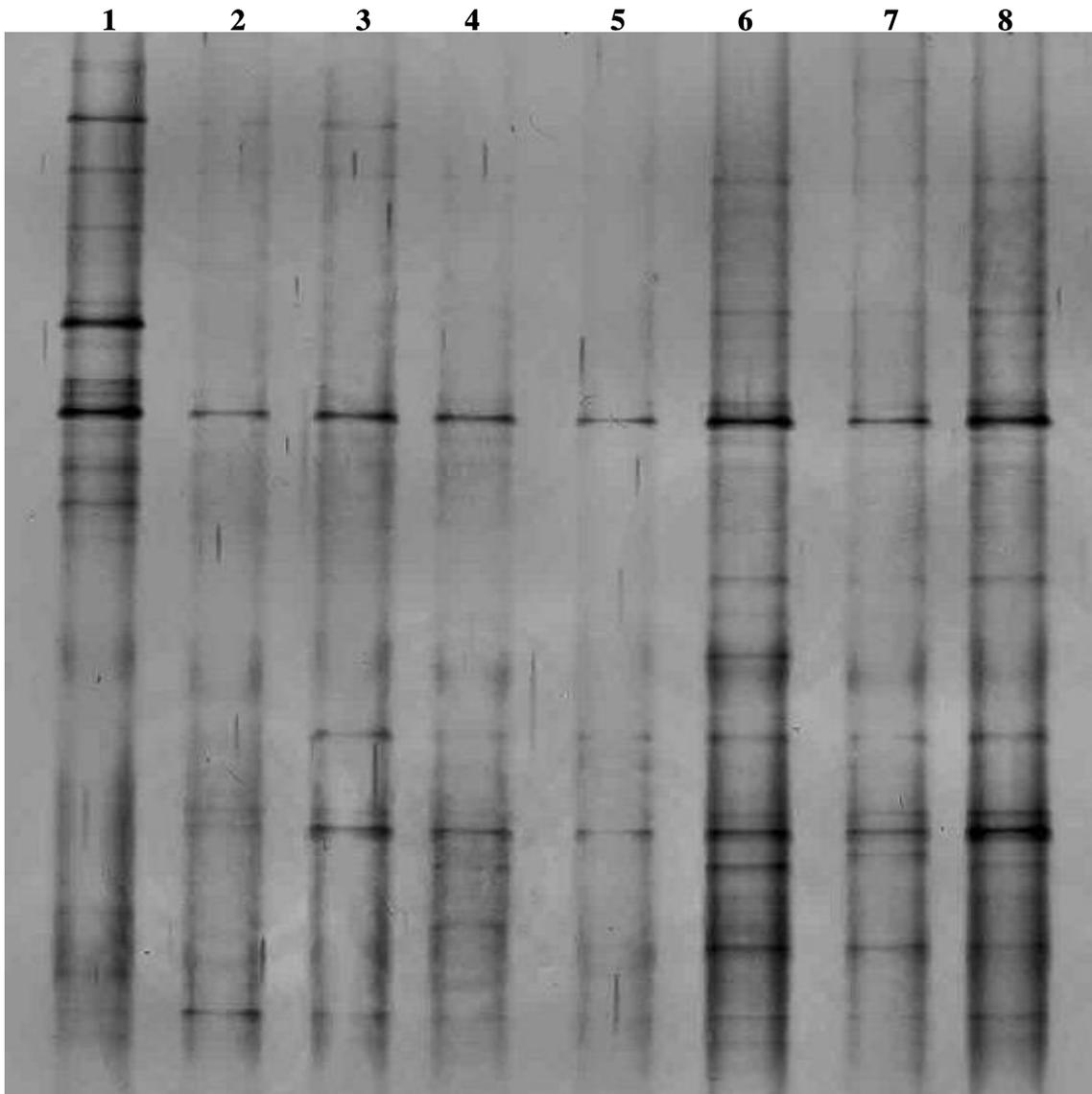


Fig. 1 - DGGE analysis of V6-V8 regions of 16s rDNA from denitrifying community fed at different acetate/toluene loading rates. Lane 1, inoculum source; lanes 2, 3 4 and 5 denitrifying sludge fed only with acetate at 100 mg C/l-d; lane 6, denitrifying sludge fed at ratio acetate-C/toluene-C of 75/25 mg C/l-d; lanes 7 and 8, denitrifying sludge fed with acetate-C/toluene-C a ratio of 50/50 mg C/l-d.

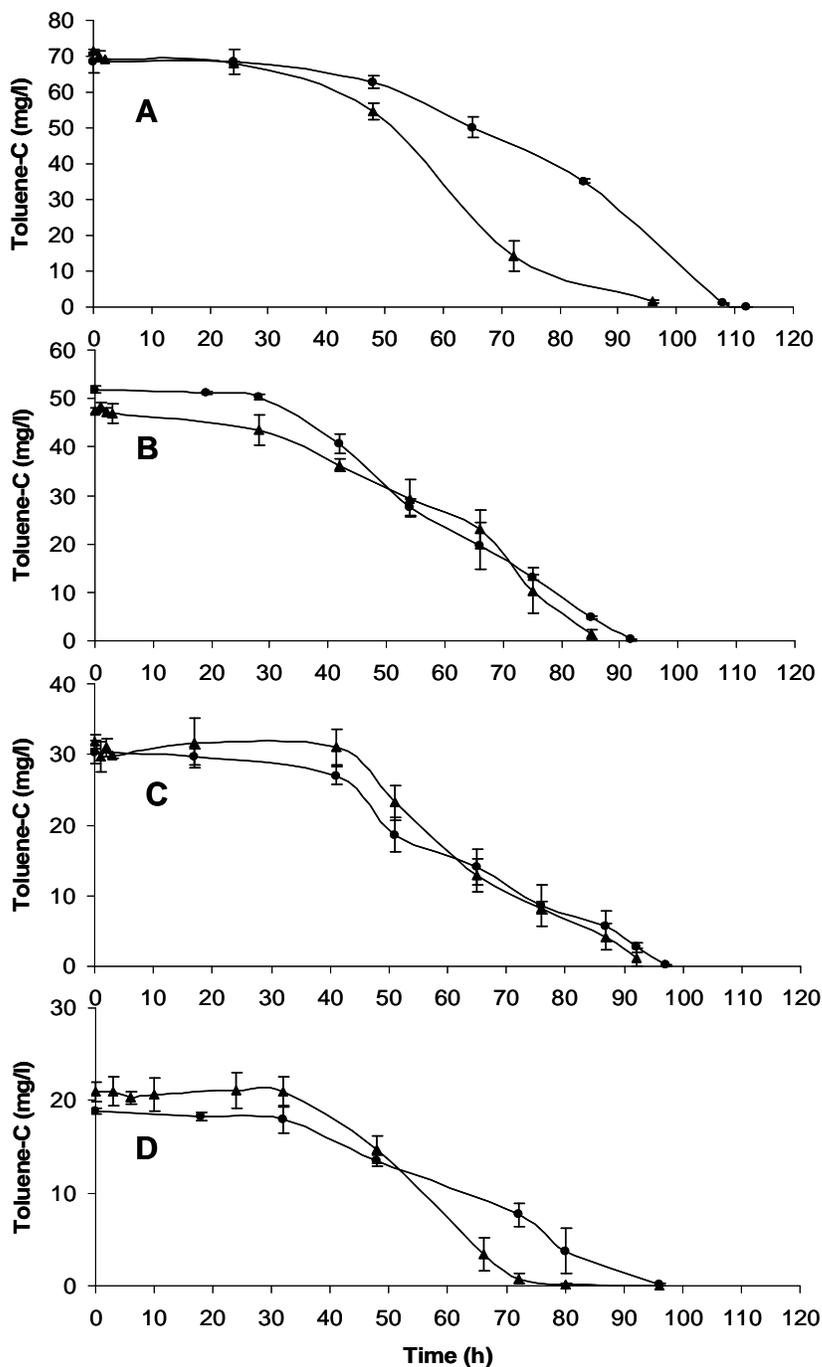


Fig. 2 – Profile of toluene consumption alone (-●-) or toluene in presence of acetate (-▲-) obtained under denitrifying conditions at different acetate and toluene concentrations (mg/l) in batch culture. A) Toluene (70), acetate (10); B) Toluene (50), acetate (30); C) Toluene (30), acetate (50); D) Toluene (20), acetate (65).

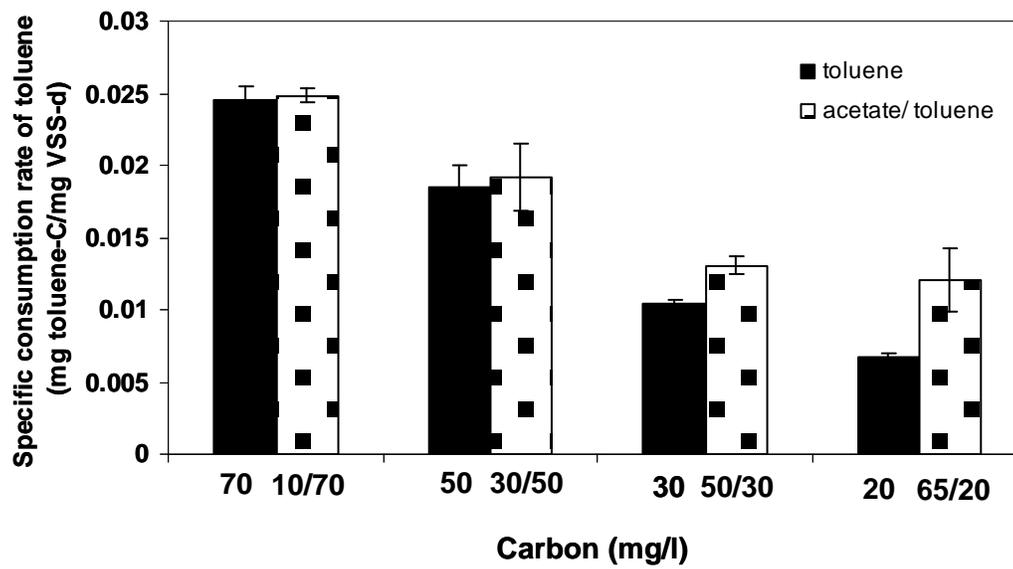


Fig. 3 - Specific consumption rate of toluene alone or toluene in presence of acetate obtained under denitrifying conditions in batch culture.

6.3 Eliminación de tolueno bajo condiciones desnitrificantes: efecto del acetato sobre la velocidad de eliminacion y los cambios genotípicos.

Resumen del artículo en revisión: Sergio Martínez-Hernández, Marcio Da Silva, Flor de María Cuervo-López, Pedro J.J. Alvarez and Jorge Gómez. Toluene biodegradation under denitrifying conditions: effect acetate on degradation kinetics and genotype shifts. En revisión.

En este trabajo se examinó la influencia del acetato como fuente fácilmente oxidable sobre el consumo de tolueno por desnitrificación. En esta parte además de la variables de respuesta fisiológicas, se analizó mediante la técnica de PCR-RT, la presencia de genes catabólicos del tolueno como el *bssA* que codifica para la enzima benzilsuccinato sintasa, así como de genes constitutivos como el 16S DNAr. En los ensayos se utilizó un lodo desnitrificante fisiológicamente estable sin contacto previo a hidrocarburos. Los ensayos se realizaron en lote con una concentración de 15 mg /l de carbono de tolueno en presencia (90 mg C/l) o ausencia de acetato. Los resultados mostraron eficiencias de consumo de C-tolueno de $99 \pm 1\%$, con o sin acetato; mientras que las eficiencias de consumo de N-nitrato alcanzaron valores de $99 \pm 0.5\%$. Los rendimientos de bicarbonato fueron mayores que 0.74 ± 0.05 y los de nitrógeno alcanzaron valores de 0.78 ± 0.01 , indicando un proceso desnitrificante predominantemente desasimilativo. Se encontró que la velocidad específica de consumo de tolueno (q_T) incrementó con la presencia del acetato, ya que mientras la q_T en presencia de acetato fue de 1.28 ± 0.065 mg C/mg SSV-h, la q_T obtenida en los ensayos con tolueno como única fuente orgánica fue de 1.03 ± 0.030 . El análisis de PCR-RT mostró que el mayor número de copias de gen *bssA* se encontró en los ensayos que presentaban tolueno comparado con los de sólo acetato. Sin embargo, para el caso del gen 16S DNAr se presentó un efecto contrario, encontrando un mayor número de copias en los ensayos que presentaban acetato, lo que podría indicar que mientras el tolueno promovió el crecimiento de bacterias que albergan el gen *bssA*, el acetato promovió el crecimiento de bacterias totales. En general, los resultados sugieren que el acetato promovió el incremento en bacterias totales, lo que podría estar relacionado con un incremento en la velocidad específica de consumo de tolueno.

A continuación se pueden encontrar detalles sobre el artículo de investigación generado de los resultados antes mencionados y que se enviará a publicar.

Toluene consumption under denitrifying conditions: effect of acetate on consumption kinetics and genotype shifts.

Sergio Martínez-Hernández, Marcio Da Silva (2), Flor de María Cuervo-López, Pedro J.J. Alvarez (2) and Jorge Gómez (1).

(1) Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México D.F., México. Tel. 5255 5804 4600 ext. 2668, fmcl@xanum.uam.mx

(2) Department of Civil and Environmental Engineering, Rice University, Houston Texas.

Abstract

Toluene mineralization by denitrification in the presence of acetate was examined in order to evaluate the influence of a readily consumable compound on toluene oxidation. A stabilized denitrifying sludge without exposition to hydrocarbons was used as inoculum. A concentration of 15 mg toluene-C/l in presence or absence of acetate-C was assayed in batch culture. Toluene consumption by denitrification was successfully achieved as indicated by the carbon consumption efficiency of $99 \pm 1\%$ and nitrate consumption efficiency of $99 \pm 0.5\%$. The bicarbonate yields values were higher than 0.74 ± 0.05 and denitrifying yields values were of 0.78 ± 0.01 , indicating a dissimilative predominantly denitrifying process. It was observed that the specific consumption rates of toluene (q_T) improved in presence of acetate as the q_T with acetate-C was of 1.28 ± 0.065 C/mg VSS-h while with toluene as only carbon source was of 1.03 ± 0.030 . Real time quantitative PCR analysis showed that the highest numbers of *bssA* gene copies occurred in the assays with toluene, whereas the highest numbers of 16 rDNA gene copies was obtained in the assays with acetate. These results suggested that the acetate increased the total bacterial populations causing an enhanced in the toluene consumption rate.

Keywords

Toluene, denitrification, acetate, RT-PCR, *bssA* gen

Introduction

Toluene is an important contaminant present in surface and groundwater releasing from industrial activities related to chemical synthesis or refining and disposal of petroleum products. Usually, this kind of wastewater is mixed with other compounds, like fatty acids which can influence the extent and rate of toluene consumption degradation. Several substrate interactions have been identified during toluene degradation. Edwards and Grbic-Galic (1994) found that addition of alternate carbon sources such as acetate and glucose inhibited toluene elimination under methanogenic conditions. Su and Kafkewitz (1994) indicated that the nitrate-reducing strain of *Pseudomonas maltophilia* was capable of utilizing simultaneously toluene and succinate; in this case both substrates were used for growth. Corseuil et al. (1998) analyzed the effect of ethanol on microbial consumption of benzene, toluene and xylene (BTX) compounds in iron reducing, denitrifying, sulfidogenic and methanogenic conditions. It was seen that ethanol influenced negatively toluene consumption rate in iron-reducing and methanogenic microcosms; however, the presence of ethanol did not affect the consumption of toluene in denitrifying microcosms and under sulfate reducing conditions, ethanol enhanced toluene consumption rate. The authors suggested that this behavior could be related to a low initial concentration of toluene degrader microorganisms and their incidental growth during ethanol consumption, although the evidence was not clear.

Quantification and prediction of the effect of alternate substrate on the elimination of a target pollutant is important for implementing biological treatments. However, this is a

complex task which requires a better understanding of the effect of alternative carbon sources on parameters such as metabolic pathways, gene expression or microbial populations (Lovanh and Alvarez, 2004).

Considering that molecular biology techniques preclude laboratory isolation and cultivation of microorganisms involved in the degradation of environmental pollutants (Beller et. al 2002), they have been successfully applied to characterize microbial population of environments such as soil, sediment and wastewater (Bej and Mahbubani, 1992). The real time quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis has been used to for the quantification of bacteria or catabolic gene, because it is sensitive, specific and relatively rapid if compared with other techniques such as DNA: DNA hybridization (Zhang and Fang, 2006). Quantification of catabolic gene associated with hydrocarbons consumption was published by Beller et.al (2002). The authors used RT-PCR technique to quantify the catabolic gene *bssA*, which codes the α -subunit of benzylsuccinate synthase, enzyme involved in catalyzing the first step of anaerobic toluene degradation (Heider et. al, 1998). Beller et. al (2002), found a correlation between toluene degradation activity and numbers of *bssA* gene copies. Similar results were found by Da Silva and Alvarez (2004), during toluene degradation under methanogenic conditions, suggesting that this gene could be a useful biomarker for analyzing environments where anaerobic toluene degradation is occurring.

Previous results obtained in our lab indicated that the addition of acetate to a denitrifying batch culture fed with toluene resulted in an increase of 25% in the toluene specific consumption rate if compared to a culture without addition of acetate (Martinez et. al 2007, submitted) The purpose of the present work is to obtain microbial evidence by

means of molecular biology techniques whether the increase in consumption and oxidation rate of toluene observed when acetate was added is related to the increase of toluene consumer microorganisms. Therefore, in a denitrifying consortium without previous contact to hydrocarbons, the effect of acetate as alternate substrate on toluene consumption rate was evaluated by physiologic variables such as substrate consumption efficiencies, yield products and toluene specific consumption rate, as well as by the quantification of catabolic gene *bssA* and estimation of total bacterial populations indicated by 16S rDNA gene copies.

Materials and methods

Inoculum, reactor and culture medium. Denitrifying sludge from an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor was used as inoculum. The reactor was fed with acetate (250 mg C/l-d) and nitrate (178 mg N/l-d). The mineral medium (also used in assays batch) contained in (g/l): CuSO₄ 5(H₂O) (0.06); FeCl₃ (0.1); CaCl₂ 2(H₂O) (0.6); KH₂PO₄ (3); MgSO₄ (0.6) and NaMoO₄ (0.06).

Batch cultures. The experiments were carried out by duplicate in serologic bottles of 60 ml. In each bottle was placed 50 ml of culture medium supplemented with the carbon source acetate, toluene or both (added at the end of the preparation) and the required nitrate concentration to obtain a C/N ratio close to stoichiometric value. Each assay bottle was an independent experimental unit and after sampling it was discarded. Three series of batch cultures were conducted: one series added with 15 mg toluene-C/l, a second one added with 90 mg acetate-C/l, and finally a series added with a mixture of acetate and toluene (mg/l; 90 Acetate-C and 15 Toluene-C. The bottles were seeded with the required volatile suspended solids (VSS) quantity to obtain a final concentration of 1.0 ± 0.15 g/l.

Each experimental unit was sealed and nitrogen and oxygen were displaced by using a helium current for 3 minutes. Bottles were placed on a shaker at 150 rpm and incubated at 30 °C. Simultaneously, two series of bottles were carried out as control assays. One control contained denitrifying sludge, culture medium, nitrate and no electron source. The second control contained denitrifying sludge, culture medium and electron source but no nitrate.

Sludge DNA extraction. Sludge samples from each experimental unit were collected for analysis at beginning and final of each assay. 0.25 g of sludge was used for DNA extraction by means of power soil DNA kit (MO BIO laboratories Inc.). A bead beating device (MINI Beadbead) was used for cell breaking. Approximately 50 µl sludge DNA sample was collected in a 1.5 Eppendorf vials and stored in a freezer at - 70 °C.

TR-PCR. The *bssA* gene copies and total numbers of bacteria estimated by 16S rDNA gene were determined by using real- time PCR (RT-PCR) analysis with primers and probes (Integrated DNA technologies Inc.) (Table 1). The primers and probes for *bssA* were designed based on sequences of *bssA* from a variety of toluene-degrading denitrifying bacteria such as *Azoarcus tolulyticus*, *Azoarcus* sp. strains T and T4 and *Thauera aromatica* strain T1 and K172 (Beller et. al, 2002). The primers and probes for bacteria gene were designed by Suzuki et al (2000).

The PCR reaction contained 0.5 µM concentration for each primers, a 0.25 µM concentration for probe, 1x TaqMan Universal PCR Master mix (Applied Biosystems), 2.0 µl of undiluted DNA and nuclease-free water (AMRESO-E476) to a final volume of 25 µl. RTQ-PCR was conducted with an ABI PRISM 7000 sequence detection system

(Applied Biosystems) with the following temperature conditions: 50 °C for 2 min followed by 95 °C for 10 min and 40 cycles at 95 °C for 15 seconds and 60 °C for 1 min. The number of *bssA* copies was estimated using the equation and assumptions mentioned by Beller et al. (2002), which are: 1) the *bssA* primer and probe designed on different denitrifying bacteria and was representative of all other bacteria containing *bssA*; 2) the approximate size of the strain T1 genome used as a standard was 4.6 Mpb (and these are approximately 9.12576×10^{14} pb \times μg of DNA⁻¹) which is the size of the *Escherichia coli* genome (Blatter et al. 1997); and 3) there is one copy of *bssA* per genome. These considerations were also used to quantify bacteria.

Analytical methods. Acetate concentration was measured by gas chromatography (HP model 5890, NJ USA) with a flame ionization detector (FID) and a capillary column (10 m and 0.53 mm internal diameter, Alltech AT 1000, Deerfield IL, USA). The temperatures of the column, detector and injector were 120, 150 and 130 °C respectively. The carrier gas was molecular nitrogen (4.5 mL min⁻¹). Toluene concentration was determined in the liquid and gas phase by gas chromatography (Star Varian model 3400, Walnut Creek, CA, USA) with FID using a capillary column (30 m and 0.53 mm internal diameter) with a stationary phase carbowax/BTR (Quadrex, Woodbridge CT, USA). The temperatures of the column, detector and injector were 60, 235 and 250 °C, respectively. Molecular nitrogen was used as carrier gas (4 mL min⁻¹). N₂, N₂O, and CO₂ were quantified by gas chromatography (Varian model 3350, Walnut Creek, CA, USA) with a thermal conductivity detector and a stainless steel packed column (porapak Q on 80/100 mesh, 1.2 m and 1/8 in internal diameter). The temperatures of the column, detector and injector were 40, 100 and 100° C, respectively. The carrier gas was helium (18 mL min⁻¹

¹). The nitrite and nitrate content was measured by capillary electrophoresis (Millipore, model 4000, Bedford, MA) as described by Gomez et al. (1996). The organic and inorganic carbon was analyzed in a total organic carbon (TOC) analyzer (Shimadzu, TOC-5000A, Australia) as described by Cuervo-López et al. (1999). Total and volatile suspended solids (TSS, VSS) contents were determined at the end of each assay by standard methods (APHA 1995).

Evaluation of culture behavior. Carbon mineralization from acetate and toluene was measured as HCO_3^- produced. The total HCO_3^- was determined as the difference between HCO_3^- generated by the culture and that measured in the controls without electron source. Similar procedure was used to determine the N_2 produced.

Sludge behavior was evaluated by consumption efficiencies (mg substrate consumed/mg substrate fed), yield products ($Y_{P/S}$, mg product/mg substrate consumed and specific substrate consumption rate (q_s , mg of substrate consumed/ [mg of VSS-h]).

Results and discussion

Degradation assays

Toluene degradation was observed in viable microcosms, but not in control assays ($\leq 3\%$). The results are given in Table 1. In all cases acetate-C (E_A), toluene-C (E_T) and nitrate ($E_{\text{NO}_3^-}$) consumption efficiencies were higher than 98%. Similarly HCO_3^- (Y_{HCO_3}) and N_2 (Y_{N_2}) yield values were higher than 0.74. These results indicated that the organic substrates consumed were mainly oxidized to CO_2 , whereas the nitrogen compounds were transformed to N_2 . The yield values also suggest that under the toluene concentration assayed neither denitrifying nor toluene oxidation pathways were altered, as the values were very high.

The consumption profile of toluene alone and with acetate is shown in Figure 1. In all cases acetate was consumed in a short time (6 hours) by the denitrifying consortium consortia, while the time required for toluene consumption was around 45 hours. The preferential degradation of acetate over toluene may reflect the fact that the acetate is an easily degradable substrate which can be degraded by constitutive enzymes. No significant statistical difference was established between the lag phase of toluene consumption in assays with only toluene compared to that obtained in acetate with toluene assays (Figure 1). It was observed that the time required for toluene consumption diminished with the presence of acetate, which enhanced significantly ($\alpha = 0.05$) the toluene consumption specific rate compared to those found with toluene alone (Figure 1). These results are different to others reported in the literature. Regarding this, Duetz et al. (1994), found that the presence of easily degradable substrate such as succinate affect negatively the toluene degradation. The authors reported that succinate repressed the enzymes involved in the pathway of toluene consumption under aerobic conditions. Edwards and Grbic-Galic (1994), observed that the addition of acetate, propionate or glucose inhibited toluene consumption under methanogenic conditions. They also observed that the inhibition was higher as the concentration of the alternate substrate increased in the culture. On the other hand, the ability of easily consumable substrate to enhance the pollutants consumption has been observed by other researchers. Shimp and Pfaender (1985) found that the presence of readily consumable carbon substrates such as carbohydrates and fatty acids enhanced the elimination of *m*-cresol, *m*-aminophenol and *p*-chlorophenol under aerobics conditions. This effect was related to previous adaptation of microbial community to increasing concentrations of easily degradable substrates.

Corseuil et al. (1998) observed that ethanol enhanced toluene elimination rate under sulfate reducing conditions. It was hypothesized that this behavior could be due to growth of toluene degraders during the ethanol consumption. Alvarez et al. (1998) used flow-through aquifer columns to evaluate the efficacy of using benzoate as a biostimulatory substrate to enhance the aerobic consumption of benzene, toluene and *o*-xylene (BTX). The columns amended with benzoate enhanced BTX consumption kinetics and shortened the acclimation period of consumption. This effect was related to microbial population changes, specifically to an increase in predominance of *Pseudomonas* species capable of BTX consumption in the columns. Ebihara and Bishop (2002a, b) studied the effect of acetate on the consumption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) such as naphthalene, phenanthrene and pyrene under aerobic conditions using sand columns. They found that the addition of acetate increased the viable biomass and extracellular polysaccharide contents which improved the PAH consumption rate. The findings in our assays indicated that acetate improved the toluene consumption rate, these results coincided with previous report by our laboratory, where it was observed a correlation between the acetate concentration in the culture and the increase in the *q*T (Martinez et. al, 2007 submitted). Although the results observed might be linked to the consumption rate of acetate, particular microbial population relationship between this single substrate and toluene degradation could also be considered. This motivated us to investigate whether the toluene degradation activity was correlated to number copies of *bssA* and 16S rDNA genes.

The *bssA* and 16S rDNA gene copies obtained by RT-PCR at initial and final times are shown in Figure 2. It was found that the initial concentration of *bssA* copies was similar

in all treatments. However, throughout experimentation the number of copies of *bssA* in presence of toluene was significantly higher ($\alpha = 0.0027$) than those detected in presence with only acetate. These results reflect that toluene promoted the growth of bacteria harboring the *bssA* gene. This result is consistent with others found in the literature where the enzyme benzylsuccinate synthase which is encoded by the *bssA* gene, only was synthesized and activated in cells growth in toluene (Heider, 1998; Hermuth et. al, 2002). Our results also coincided with those reported by Beller et al. (2002). These authors evaluated the toluene consumption under under denitrifying conditions, using aquifer sediments as inoculum. They found that the largest numbers of *bssA* copies were observed in the microcosms with the most rapid toluene degradation. In other work Da silva and Alvarez (2004) reported that the highest number of *bssA* gene was measured in the methanogenic aquifer columns exhibiting the highest toluene degradation activity.

In contrast to its scarce effect on increase of *bssA* copies, acetate had an effect on the increase of the 16S rDNA gene. It was found that in the presence of acetate the number copies of 16S rDNA at the end of the assays were significantly higher ($\alpha = 0.012$) than the culture fed with only toluene, indicating that this substrate stimulated the increase of total bacterial populations. These findings can be explained considering that acetate is a potential source of both carbon and energy for a wide range of microorganisms. This substrate possesses the characteristic that freely permeates the cellular membrane (Kihara and Macnab, 1981; Boot, 1985); moreover, it is required for the cell for acetyl-CoA formation, the high-energy intermediate that sits at the crossroads of central metabolism (Wolfe, 2005).

The increase in the toluene specific consumption rate found in this study shown a relationship with the increase of the 16S rDNA copies, suggesting that the acetate besides that promoted the growth of microorganisms for their own consumption, supported the increase of toluene consumers bacteria. In fact of finding toluene-degrading bacteria in the inoculum (without previous contact to hydrocarbons) used in this work it is not surprising, since it has been suggested that microorganisms able to use toluene under anaerobic conditions are widely distributed in nature (Fries et. al, 1994). These authors isolated denitrifying microorganisms able to use toluene as carbon and energy source from a variety of environments such as pristine rain forest, industrial sites, marine beach, a deep sandy aquifer, wood pulp and a compost pile. On the other hand, microorganisms belonging to the genus *Thauera* which are known for their capacity to degrade toluene under anaerobic conditions have been isolated from denitrifying culture fed with acetate (Etchevehere et. al, 2001) and from denitrifying continuous reactors treating wastewaters (Haan-Woong et. al, 2002). Recently Ginine et. al (2005) investigated the populations microbial able to use acetate as sole carbon source by denitrification using stable isotope probing ([¹³C]acetate) to label de DNA and molecular techniques as fluorescent in situ hybridization (FISH). The generated data strongly suggest that bacteria related to the genera *Acidovorax*, *Thauera* and *Dechloromonas* are capable of utilizing acetate under denitrifying conditions. It has been shown that microorganisms belonging to the genus *Dechloromonas* besides to degrade toluene using perchlorate and chlorate as electron acceptor, they can consume toluene under denitrifying conditions (Chakraborty et. al, 2005). Thus, the results found in this work suggest that the consumption of acetate

supported the growth of toluene-degrading bacteria enhancing the consumption specific rate of this hydrocarbon.

Conclusions

The results of these studies demonstrated that acetate and toluene were completely consumed by denitrification. The real time quantitative PCR analysis showed that the highest numbers of *bssA* gene copies occurred in the microcosms in presence of toluene, which suggests the potential use of this gene as a biomarker, as well as the implementation of this method as a useful tool in the detection of catabolic gene. The highest numbers of 16S rDNA gene copies was observed in assays in presence of acetate suggesting that the acetate promoted a higher growth of bacteria including microorganisms able to consume toluene which enhanced the toluene consumption specific rate. These results support that idea that addition of easily degradable substrate as acetate could be a suitable alternative to accelerate the toluene degradation under denitrifying conditions.

References

- APHA, 1995. Standard methods for examination of water and wastewater. 19 ed. American Public Health Association, Washington D.C. pp 2-56, 2-57.
- Beller HR, Kane SR, Legler TC & Alvarez PJJ (2002) A realtime polymerase chain reaction method for monitoring anaerobic, hydrocarbon-degrading bacteria based on a catabolic gene. *Environ. Sci. Technol.* 36: 3977–3984.
- Bej, A.K. , Mahbubani, M.H., 1992. Applications of the polymerase chain reaction in environmental microbiology. *PCR Methods and Applications.* 1, 151- 159.

- Blattner, F. R.; Plunkett, G., III; Bloch, C. A.; Perna, N. T.; Burland, V.; Riley, M.; Collado-Vides, J.; Glasner, J. D.; Rode, C. K.; Mayhew, G. F.; Gregor, J.; Davis, N. W.; Kirkpatrick, H. A.; Goeden, M. A.; Rose, D. J.; Mau, B.; Shao, Y., 1997. *Science*. 277, 1453-1474.
- Booth, I. R., 1985. Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiol. Rev.* 49, 359–378.
- Corseuil, H.X., Hunt, C.S., Ferreira-Dos santos, R.C., Alvarez, P.J.J., 1998. The influence of the gasoline oxygenate ethanol on aerobic and anaerobic BTX biodegradation. *Wat. Res.* 32 (7), 2065-2072.
- Cuervo-López, F., Martínez, F., Gutiérrez-Rojas, M., Loyola, R. A., Gómez, J., 1999. Effect of nitrogen loading rate and carbon source on denitrification sludge settleability in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Wat. Sci. Tech.* 40, 123-130.
- Chakraborty, R., O'Connor, S.M., Chan, E. Coates, J.D., 2005. Anaerobic degradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene compounds by *Dechloromonas* Strain RCB. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (12), 8649–8655.
- Da Silva, M.L.B. and Alvarez, P.J.J. (2004). Enhanced anaerobic biodegradation of benzene-toluene-ethylbenzene-xylene-ethanol mixtures in bioaugmented aquifer columns. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (8), 4720-4726.
- Duetz, W.A., Marques, S., De Jong, C., Ramos J.L., Van Andel, J.G., 1994. Inductibility of the TOL catabolic pathway *Pseudomonas putida* (pWW0) growing on succinate

- in continuous cultures: evidence of carbon catabolite repression control. *J. Bacteriol.* 176, 2354-2361.
- Ebihara, T., Bishop, P.L., 2002a. Influence of supplemental acetate on bioremediation for dissolved polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Environ. Eng.* 128, 505-513.
- Ebihara, T., Bishop, P.L., 2002b. Effect of acetate on biofilms utilized in PAH bioremediation. *Environ. Eng. Sci.* 19 (5), 305-319.
- Etchebehere, C., Errazquin, I., Barrandeguy, E., Dabert, P., Moletta, R., Muxi, L., 2001. Evaluation of the denitrifying microbiota of anoxic reactors. 2001. *FEMS Microbiol. Ecol.* 35, 259-265.
- Edwards, E.A., Grbic-Galic, D., 1994. Anaerobic degradation of toluene and *o*-xylene by a methanogenic consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* 60 (1), 613-622.
- Fries, M.R., Zhou, J., Chee-Sanford, J., Tiedje, J.M., 1994. Isolation, characterization, and distribution of denitrifying toluene degraders from a variety of habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* 60 (8), 2802-2810.
- Ginige, M. P., Keller, J., Blackall, L. L., 2005. Investigation of an Acetate-Fed Denitrifying Microbial Community by Stable Isotope Probing, Full-Cycle rRNA Analysis, and Fluorescent In Situ Hybridization-Microautoradiography. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (12), 8683-8691.
- Gómez, J., Méndez, R., Lema, J., 1996. The effect of antibiotics on nitrification process: Batch assays. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 57, 869-876.
- Han-Woong, L., Soo-Youn, L., Jin-Woo, L., Jong-Bok, P., Eui-So C., Yong, K. P., 2002. Molecular characterization of microbial community in nitrate-removing activated sludge. *FEMS Microbiol. Ecol.* 41, 85-94.

- Hermuth, K., Leuthner B., Heider, J., 2002. Operon structure and expression of the genes for benzylsuccinate synthase in *Thauera aromatica* strain K172. *Arch Microbiol.* 177, 132–138.
- Jerry Hintze, 2001. Number Cruncher Statistical System (NCSS).
- Kihara, M., Macnab, R. M., 1981. Cytoplasmic pH mediates pH taxis and weak- acid repellent taxis of bacteria. *J. Bacteriol.* 145, 1209–1221.
- Lovanh, N., Alvarez, P.J.J., 2004. Effect of ethanol, acetate, and phenol on toluene degradation activity and *tod* –*lux* expression in *Pseudomonas putida* TOD 102: evaluation of the metabolic flux dilution model. *Biotechnol. Bioeng.* 86 (7), 801-808.
- Martínez-Hernández, S., Ramírez-Saad, H., Olguín, E.J., Gómez, J., Cuervo-López F.M. 2007. Acetate enhances the specific consumption rate of toluene under denitrifying conditions. submitted
- Shimp, R.J., Pfaender, F.K., 1985. Influence of easily degradable naturally occurring carbon substrates on biodegradation of monosubstituted phenols by aquatic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 49 (2), 394-401.
- Su, J.J., Kafkewitz, D., 1994. Utilization of toluene and xylenes by a nitrate reducing strain of *Pseudomonas maltophilia* under low oxygen and anoxic conditions. *FEMS Microbiol. Ecol.* 15, 249-258.
- Suzuki, M.T., Taylor, L.T., DeLong, E.F., 2000. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4605-4614.
- Wolfe, A. J., 2005. The acetate switch. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69 (1), 12–50.

Zhang, T., Fang, H. H. P., 2006. Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples. *Appl Microbiol Biotechnol.* 70, 281–289.

Tables and Figures

Table 1. Primers and probes sequences used in real time- PCR.

Target	Forward primer	Reverse primer	Probe ^a
<i>bssA</i>	5'ACGACGGYGGC ATTTCTC3'	5' CGATGATSG GYACCGACA3'	FAM-5' CTTCTGGTTCTTCTG CACCTTGGACACC3'TAMRA
Bacteri a	5'CGGTGAATACGT TCYCGG3'	5'GGWTACCTTG TTACGACTT3'	FAM-5'CTTGTACACACCG CCCGTC3'-BHQ-1

a The reporter dye used was FAM (6-carboxyfluorescein) or TET (tetrachloro-6-carboxyfluorescein), and the quencher dye was either TAMRA (6-carboxytetramethyl rhodamine) or BlackHole Quencher-1.

Table 2. Removal efficiencies and yield product values of the denitrifying process using toluene alone and toluene plus acetate.

Treatment (mg C/l)	Consumption efficiency ^a			Yield ^b	
	Carbon		NO ₃ ⁻ -N	HCO ₃ ⁻	N ₂
	Acetate	toluene			
Acetate 90	99 ± 0.5	-	99 ± 1	0.91 ± 0.02	0.90 ± 0.01
Toluene 15	-	99 ± 0.7	98 ± 1	0.81 ± 0.03	0.90 ± 0.02
Acetate 90/toluene 15	98 ± 2.0	99 ± 1	99 ± 0.5	0.74 ± 0.05	0.78 ± 0.01

a, mg substrate consumed/mg substrate fed; b, mg product/mg substrate consumed

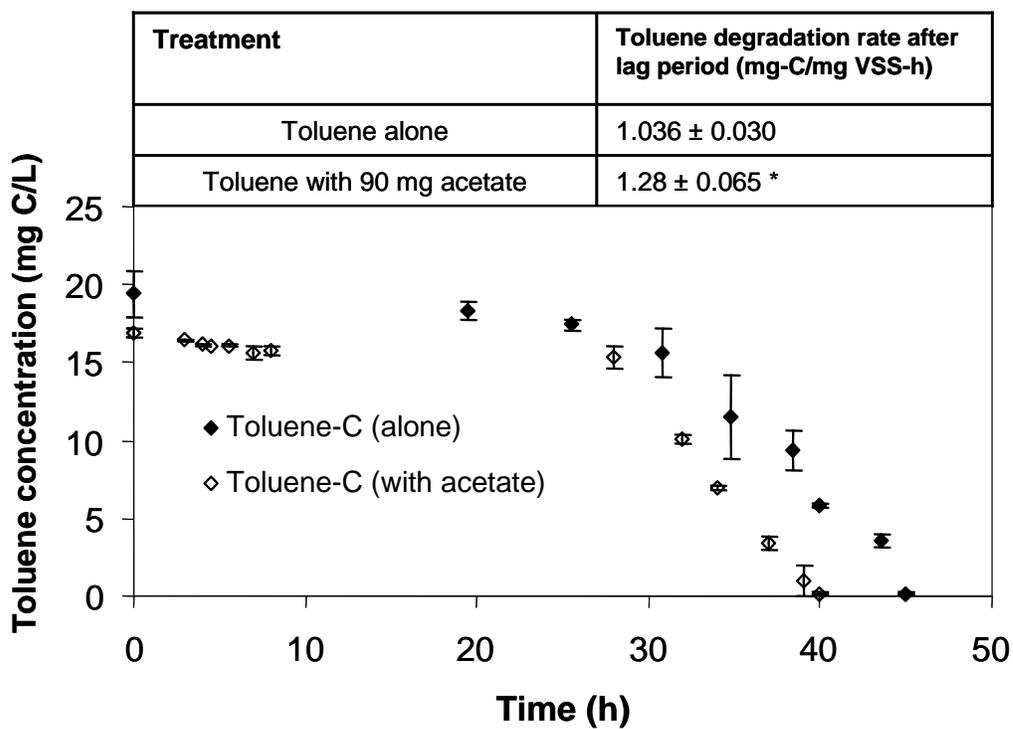


Figure 1. Consumption profile of toluene alone and toluene with acetate under nitrate-reducing conditions. Error bars represent the range duplicate treatments. * = different statistical significant at 95 % level.

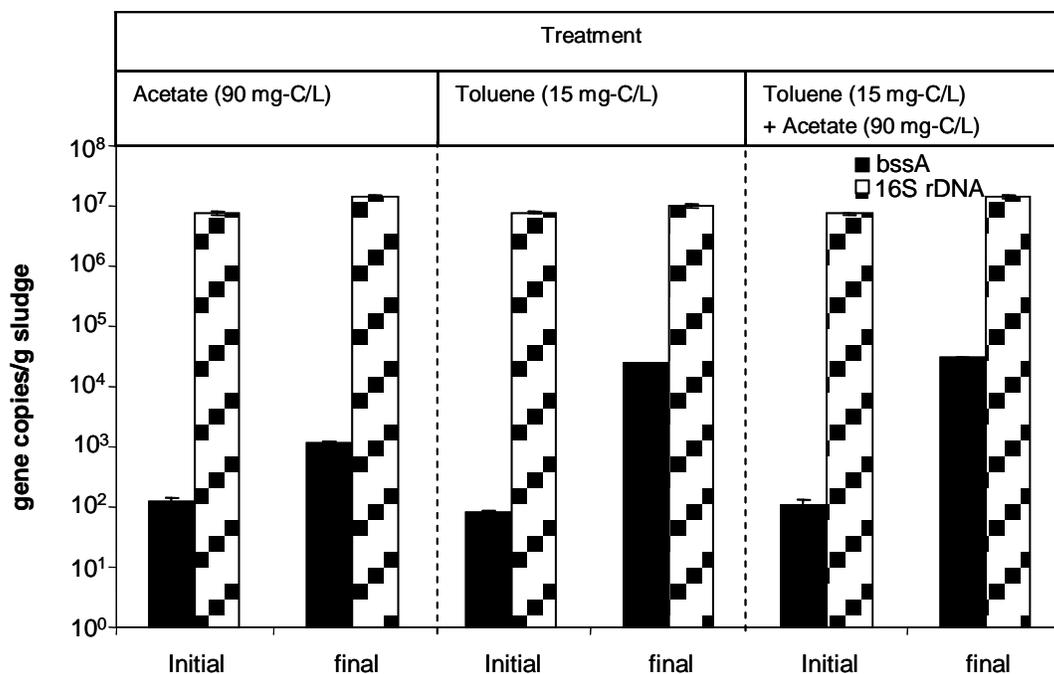


Figure 2. Real-time quantitative polymerase chain reaction (RTQ-PCR) analysis of *bssA* gene(coding for benzyl succinate syntase) and 16S rDNA gene from denitrifying sludge in presence of toluene or toluene plus acetate. The experiments were conducted in microcosms. Samples were taken at the initial and final time of assays after depletion of carbon source. Errors bars represent the range duplicate treatment.

7. CONCLUSIONES GENERALES y RECOMENDACIONES

En general, en el presente trabajo se puso de manifiesto la mineralización de tolueno por desnitrificación en cultivo continuo y en lote. También se mostró que la adición de acetato como fuente fácilmente oxidable mejoró la velocidad de consumo del tolueno. Las principales conclusiones obtenidas durante este trabajo son las siguientes.

Se encontró que en presencia de acetato (125 mg C/l) y mediante un proceso desnitrificante alimentado en continuo, es posible eliminar hasta 125 mg C-tolueno/l-d, puesto que se obtuvieron eficiencias de consumo de carbono y nitrógeno mayores que $96 \pm 0.4 \%$ y rendimientos de bicarbonato y nitrógeno molecular mayores que 0.74 ± 0.01 . Esto es, el proceso fue predominantemente desasimilativo, lo que implica una menor producción de biomasa. Esto podría ser una ventaja respecto a otros procesos como los aerobios, donde la generación de biomasa suele convertirse en un problema durante la operación del proceso. Estos resultados muestran la factibilidad de emplear reactores desnitrificantes en continuo como el UASB para la eliminación de altas cargas de tolueno y nitrato de las aguas residuales.

Cuando se eliminó el acetato de la alimentación del reactor en continuo, las eficiencias de consumo de carbono y nitrógeno descendieron considerablemente de 91 a 61% y de 99 a 65%, respectivamente. Los rendimientos de HCO_3^- y N_2 también decrecieron desde 0.82 a 0.46 y 0.82 a 0.47, respectivamente. Tales resultados sugieren un efecto coadyuvante del acetato en la eliminación del tolueno a las condiciones experimentales probadas. En este reactor, el estudio de la estructura del consorcio desnitrificante mediante la técnica molecular de DGGE, reveló que el mayor número de bandas (consideradas poblaciones) se detectó en los ensayos con la mezcla acetato/tolueno comparada con los de sólo acetato. Los índices ecológicos de diversidad (H) y equitatividad (J), mostraron que los valores de H fueron mayores en los ensayos con la mezcla acetato/tolueno (2.87) comparados con los de sólo acetato (2.05), mostrando una mayor diversidad de las poblaciones microbianas ante la adición de una mezcla de substratos. Los valores de J en los ensayos con sólo acetato (entre 0.82 y 0.85) mostraron cierto predominio de algunas poblaciones microbianas del consorcio. Sin embargo, dicho predominio no se encontró en los ensayos con la mezcla acetato/tolueno, ya que los valores de J fueron cercanos a

0.97. Debido a ésto, no pudo ser detectada una relación clara entre la estructura de las poblaciones desnitrificantes y el descenso en el consumo del tolueno.

En los ensayos en lote se encontraron eficiencias de consumo de tolueno mayores que $95 \pm 2\%$, independientemente de la concentración inicial de tolueno o de la presencia de acetato. Las eficiencias de consumo de nitrato fueron superiores a 92 ± 2 , mientras que los rendimientos de HCO_3^- fueron mayores que 0.71 ± 0.03 y los de N_2 mayores que 0.86 ± 0.01 . Tales resultados muestran por un lado, que el acetato no afectó el consumo de tolueno, y por otro, que ambos substratos fueron prácticamente mineralizados hasta CO_2 .

Los ensayos en lote también mostraron que la velocidad específica de consumo de tolueno (q_T) fue duplicada en presencia de acetato, ya que mientras la q_T con 15 mg C-tolueno/l fue de 0.006 mg C/mg SSV-d, la q_T encontrada a la misma concentración de tolueno pero en presencia de 65 mg C-acetato/l fue de 0.013. Por lo tanto las evidencias permiten concluir que una fuente fácilmente oxidable como el acetato mejoró significativamente la velocidad de eliminación de tolueno por desnitrificación. Estos resultados podrían ser de utilidad en la implementación de estrategias encaminadas a agilizar la eliminación de tolueno de los sitios contaminados.

La tendencia desasimilativa, así como el efecto positivo del acetato sobre la velocidad de consumo de tolueno fue corroborado en la última serie de experimentos en lote, ya que se encontró que la q_T con 15 mg C-tolueno/l (en presencia de 90 mg/l C-acetato) fue significativamente mayor que la q_T encontrada a la misma concentración de tolueno pero sin acetato. El análisis de PCR-RT mostró que el mayor número de copias del gen catabólico *bssA* se registró en los ensayos con tolueno, mientras que el mayor número de copias de gen 16S DNAr fue encontrado en los ensayos que presentaron acetato. Esto podría indicar que mientras el tolueno promovió el crecimiento de bacterias que albergan el gen *bssA*, el acetato promovió el crecimiento de bacterias totales, lo que podría estar relacionado con el aumento en la velocidad específica del tolueno. Los hallazgos encontrados en estos ensayos son innovadores ya que a diferencia de otros trabajos donde sólo se muestra en consumo de los substratos y/o el monitoreo de los genes catabólicos, en este trabajo se logró conjuntar el análisis del proceso respiratorio desnitrificante, la evaluación cinética del proceso, así como la implementación de técnicas moleculares para evaluar el seguimiento de genes catabólicos y constitutivos como el *bssA* y el 16S DNAr.

Finalmente, considerando que a las condiciones experimentales probadas (tiempo de residencia hidráulico de 2 días en presencia de acetato), las eficiencias de consumo de tolueno disminuyeron considerablemente, sería recomendable realizar algunos estudios encaminados a explorar las condiciones hidráulicas del sistema, como por ejemplo, evaluar el consumo de tolueno a tiempos de residencia hidráulico mayores que los ensayados para observar si mejora el consumo de tolueno. En cuanto al incremento de la velocidad específica de consumo de tolueno por la presencia de acetato, y a fin de profundizar en el efecto cuadyuvante del mismo, sería recomendable realizar ensayos bioquímicos, ya que el acetato es la fuente de Acetil-CoA, una molécula de alta energía que es considerada como un “switch” en el metabolismo central de muchos microorganismos.

8. BIBLIOGRAFÍA

Ahn, Y.H. (2006). Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: A review. *Process Biochemistry*. 41: 1709-1721.

An, Y. J., Joo, Y. H. Hong, I. Y., Ryu, H.W., Cho, K. S. (2004). Microbial characterization of toluene-degrading denitrifying consortia obtained from terrestrial and marine ecosystems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65: 611-619.

Álvarez, P. J. J., Anid, P. J. and Vogel, T. M. (1991). Kinetics of aerobic biodegradation of benzene and toluene in sandy aquifer material. *Biodegradation*. 2: 43-51.

Álvarez, P. J. J., Anid, P. J. and Vogel, T. M. (1994). Kinetics of toluene degradation by denitrifying aquifer microorganisms. *J. Environmental Engineering*. 120 (5): 1327-1335.

Álvarez, P. J. J., and T. M. Vogel. (1995). Degradation of BTEX and their aerobic metabolites by indigenous microorganisms under nitrate reducing conditions. *Water Sci. Technol.* 31:15–28.

Álvarez, M. V., y Figueroa, L. J. (1996). *La Contaminación Ambiental causas y control*. Universidad Autónoma Metropolitana-Azcapotzalco. Amalgama arte editorial.

Akunna, J. C., Bizeau, C. and Moletta, R. (1993). Nitrate and nitrite reductions with anaerobic sludge using various carbon sources: glucose, glycerol, acetic acid, lactic acid and methanol. *Wat. Res.* 27 (8): 1303-1312.

Akunna, J.C., Bizeau, C. and Molleta, R. (1994). Nitrate reduction by anaerobic sludge using glucose at various nitrate concentrations: ammonification, denitrification and methanogenic activities. *Environ. Technol.* 15: 41-49.

Alexander, R. B., Smith, R.A. and Schwars, G. E. (2000). Effect of the stream channel size on the delivery of nitrogen to the Gulf of Mexico. *Nature*. 403 (17): 758-761.

Altenschmidt, U. and Fuchs, G. (1991). Anaerobic degradation of toluene in denitrifying *Pseudomonas sp.*: indication of toluene methylhydroxylation and benzoyl-CoA as central aromatic intermediate. *Arch. Microbiol.* 156, 152-158.

Altenschmidt, U. and Fuchs, G. (1992). Anaerobic toluene oxidation to benzyl alcohol and benzaldehyde in a denitrifying *Pseudomonas* strain. *J. Bacteriol.* 174: 4860-4862.

Anders, H., Kaetzke, A., Kaempfer, P., Ludwig, W., 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 *Thauera*, as *Thauera 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.

Antón D.J. y Díaz, D.C. (2000). Sequía en un mundo de agua. Piriguazú, Ediciones/CIRA-UAEM, San José/Toluca, pag. 420.

APHA (1985). Standard methods for examination of water and wastewater. 16 ed. American Public Health Association, Washington D. C.

Bell, L.D., Richardson, D.J., Ferguson, S. J. (1990). Periplasmic and membrane-bound respiratory nitrate reductases in *Thiosphaera pantotropha*: the periplasmic enzymes catalyzes the first step in aerobic denitrification. *FEBS Lett.* 265: 85-87.

Beller, H. R., Grbic-Galic, D. and Reinhard. (1992). Microbial degradation of toluene under sulfate-reducing conditions and the influence of iron on the process. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 786-793.

Beller, H. R., Spormann, A. M. (1997). Anaerobic activation of toluene and *o*-xylene by addition to fumarate in denitrifying strain T. *J Bacteriol.* 179: 670–676.

Beller, H. R., Spormann, A. M. (1999). Substrate range of benzylsuccinate synthase from *Azoarcus* sp. strain T. *FEMS Microbiol Lett.* 178: 147–153.

Beller, H. R., Kane, S. R., Legler, T. C. and Álvarez, P. J. J. (2002). A real-time polymerase chain reaction method for monitoring anaerobic, hydrocarbon degrading bacteria based on a catabolic gene. *Environ. Sci. Technol.* 36: 3977–3984.

Berger, D. and Mackay, D. (1994). The evaporation of viscous or waxy oils – When is a liquid-phase resistance significant? 17th Arctic and Marine Oil Spill Program Technical Seminar, Vancouver (BC, Canada): 77–92.

Biegert, T. and Fuchs, G. (1995). Anaerobic oxidation of toluene (analogues) to benzoate (analogues) by whole cells and cell extracts of a denitrifying *Thauera* sp. *Arch. Microbiol.* 163: 407-417.

Bischof F., Hofken, M. and Durst, F. (1996). Design and construction of aeration systems for optimum operation of large wastewater treatment plants. *Wat. Sci. Tech.* 33(12): 189-198.

Bonin, P., Gilewicz, M. and Bertrand, J.C. (1989). Effects of oxygen on each step of denitrification on *Pseudomonas nautica*. *Can. J. Microbiol.* 35: 1061-1064.

Braun, C. and Zumft, W.G. (1991). Marker exchange of the structural genes for nitric oxide reductase blocks the denitrification pathway of *Pseudomonas stutzeri* at nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 266: 22785-22788.

Breemen, N. V. (2002). Nitrogen cycle: Natural organic tendency. *Nature.* 415: 381-382.

Brown, K., Prudencio, M., Pereira, A. S., Besson, S., Moura, J. J. G., Moura, I., Tegoni, M. and Cambillau, C. (2000). A novel type of catalytic copper cluster in nitrous oxide reductase. *Nat Struct Biol.* 7: 191-195.

Cervantes, F. J., De la Rosa, D. A. and Gómez, J. (2001). Nitrogen removal from wastewaters at low C/N ratios with ammonium and acetate as electron donors. *Biotechnol. Bioeng.* 79: 165-170.

Chang, M. K., Voice, T. C. and Criddle, C. S. (1993). Kinetics of competitive inhibition and cometabolism in the biodegradation of benzene, toluene, and p-xylene by two *Pseudomonas* isolates. *Biotechnol. Bioeng.* 41: 1057-1065.

Chin, K. K. (1994). Evaluation of treatment efficiency of processes for petroleum refinery wastewater. *Wat. Sci. Tech.* 29(8): 47-50.

Christensen, J. S. and Elton, J. (1996). Soil and groundwater pollution from BTEX. *Groundwater pollution primer.*

Cohen, J.E. (2003). Human population: the next half century. *Science.* 302:1172-1175.

Costa, C., Moura, J. J. G., Moura, I., Liu, M. Y., Peck, H. D., LeGall, J., Wang, Y. and Huynh, B. H. (1990). Hexaheme nitrite reductase from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774. *J. Biol. Chem.* 265: 14382-14387.

Corseuil, H. X., Hunt, C. S., Ferreira-Dos santos, R. C., Álvarez, P. J. J. (1998). The influence of the gasoline oxygenate ethanol on aerobic and anaerobic BTX biodegradation. *Wat. Res.* 32 (7), 2065-2072.

Criss, R. E. and Davisson, M. L. (2004). Fertilizers, water quality and human health. *Environmental Health Perspectives.* 112 (10): 536.

Cuervo-López, F. M., Martínez, F., Gutiérrez-Rojas, Loyola, R. A. and Gómez, J. (1999). Effect of nitrogen loading rate and carbon source on denitrification and sludge settleability in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Wat. Sci. Tech.* 40(8): 123-130.

Cuervo-López, F. M. (2003). Estudio biológico-físicoquímico de un lodo desnitrificante alimentado con diferentes fuentes de electrones. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana. México.

Cutruzzola, F. (1999). Bacterial nitric oxide synthesis. *Biochim Biophys Acta.* 1411:231-249.

Da Silva, M. L. B. and Alvarez, P. J. J. (2004). Enhanced anaerobic biodegradation of benzene-toluene-ethylbenzene-xylene-ethanol mixtures in bioaugmented aquifer columns. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (8), 4720-4726.

- Da Silva, M. L. B., Ruiz-Aguilar, G. M. L., Álvarez, P. J. J. (2005). Enhanced anaerobic biodegradation of BTEX-ethanol mixtures in aquifer columns amended with sulfate, chelated ferric iron or nitrate. *Biodegradation*. 16, 105-114.
- Dean, B. J. (1985). Recent findings on the genetic toxicology of benzene, toluene, xylenes and phenols. *Mutat. Res.* 154: 153-181.
- Dickson, T. R. (1980). *Química: enfoque ecológico*. Editorial Limusa.
- Dolfing, J., Zeyer, J., Binder-Eicher, P., Schwarzenbach, R. P. (1990). Isolation and characterization of a bacterium that mineralizes toluene in the absence of molecular oxygen. *Arch Microbiol.* 134: 336–341.
- Duetz, W. A., de Yong, C., Williams, P. A. and Van Andel, J. G. (1994). Competition in chemostat culture between *Pseudomonas* strains that use different pathways for the degradation of toluene. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(8): 2858-2863.
- Edwards, E. A., Wills, L. E., Reinhard, M. and Grbic-Galic, D. (1992). Anaerobic degradation of toluene and xylene by aquifer microorganisms under sulfate-reducing conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 794-800.
- Edwards, E. A. and Grbic-Galic, D. (1994). Anaerobic degradation of toluene and *o*-xylene by a methanogenic consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(1): 313-322.
- Eirlensen, A. M., Henze, M. and Kloft, L. (1994). Effect of volatile fatty acids and trimethylamine on nitrification in activated sludge. *Wat. Res.* 28: 1329-1336.
- Elmen, J., Pan, W., Leung, S. Y., Magyarosy, A., and Keasling, J. D. (1997). Kinetics of toluene degradation by a nitrate-reducing bacterium isolated from a groundwater aquifer. *Biotechnol. Bioeng.* 55, 82–90.
- Evans, P. J., Mang, D. T. and Young, L. Y. (1991). Degradation of toluene and *m*-xylene and transformation of *o*-xylene by denitrifying enrichment cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 57(2): 450-454.
- Evans, P. J., Ling, W., Goldschmidt, B., Ritter D. R. and Young, L. D. (1992). Metabolites formed during anaerobic transformation of toluene and *o*-xylene and their proposed relationship to the initial steps of toluene mineralization. *Applied and environmental Microbiology.* 58 (2): 496-501.
- Falkowski, P., Scholes, R. J., Boyle, E., Canadell, J., Canfield, D., Elser, J., Gruber, N., Hibbard, K., Hogberg, P., Linder, S., Mackenzie, F. T., Moore III, B., Pedersen, T., Rosenthal, Y., Seitzinger, S., Smetacek V. and Steffen W. (2000). The global carbon cycle: a test of our knowledge. *Science.* 290: 291-296.

- Fernández, A., Huang, S., Seston, S., Xing, J., Hickey, R., Criddle, C. and Tiedje, J. (1999). How stable is stable? Function versus community composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (8): 3697-3704.
- Fields, S. (2004). Global nitrogen. *Environmental Health Perspectives.* 112 (10): 556-563.
- Fornazzari, L., Pollanen, M. S., Myers, V. and Wolf, A. (2003). Solvent abuse-related toluene leukoencephalopathy. *Journal of Clinical Forensic Medicine.* 10: 93-95.
- Frazer, A. C., Coschigano, P.W. and Young, L. Y. (1995). Toluene metabolism under anaerobic conditions: A review. *Anaerobe.* 1: 293-303.
- Freeman, K. (2001). The future of fresh water. *Environmental Health Perspectives.* 109 (4): 158.
- Fries, M. R., Zhou, J., Chee-Sanford, J. and Tiedje, J. M. (1994). Isolation, Characterization, and distribution of denitrifying toluene degraders from a variety of habitats. *Applied Environmental Microbiology.* 60 (8): 2802-2810.
- Fuchs, G., Mohamed, M. E., Altenschmidt, U., Koch, J., Lack, A., Brackmann, R., Lochmeyer, C. and Oswald, B. (1994). Biochemistry of anaerobic biodegradation of aromatic compounds, in *Biochemistry of microbial degradation* (Ratledge, C. ed.) pp. 513-553. Kluwer Academic publishers, Dordrecht.
- Fulop, V., Moir, J. W. B., Ferguson, S. and Hajdu, J. (1995). The anatomy of a bifunctional enzyme: structural basis for reduction of oxygen to water and synthesis of nitric oxide by cytochrome *cd1*. *Cell.* 81: 369-377.
- Galloway, J. N. (1998). The global nitrogen cycle: changes and consequences. *Environ. Pollut.* 102 (S1): 15-24.
- Gibson, J. and Harwood, C. S. (2002). Metabolic diversity in aromatic compound utilization by anaerobic microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* 56: 345-369.
- Glockner, A. B., Jungst, A. and Zumft, W. G. (1993). Copper- containing nitrite reductase from *Pseudomonas aureofaciens* is functional in a mutationally cytochrome *cd1*-free background (NirS-) of *Pseudomonas stutzeri*. *Arch. Microbiol.* 160: 18-26.
- Gómez, J., Méndez, R. and Lema, J. (1996). The effect of antibiotics on nitrification process: Batch assays. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 57: 869-876.
- Grbic-Galic, D., and T. M. Vogel. (1987). Transformation of toluene and benzene by mixed methanogenic cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 254-260.

Gulensoy, N. and Álvarez, P. J. J. (1999). Diversity and correlation of specific aromatic hydrocarbon biodegradation capabilities. *Biodegradation*. 10: 331-340.

Haigler, B. E., Pettigrew, C. A. and Spain, J. C. (1992). Biodegradation of mixtures of substituted benzenes by *Pseudomonas* sp. Strain JS150. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(7): 2237-2244.

Hanaki, K., Wantawin, C. and Ohgaki, S. (1990). Nitrification at low levels of dissolved oxygen with and without organic loading in a suspended-growth reactor. *Wat. Res.* 24:297-302.

Harwood, C. S., Burchhardt, G., Hermann, H., Fuchs, G. (1999). Anaerobic metabolism of aromatic compounds via the benzoyl-CoA pathway. *FEMS Microbiol Rev.* 22:439-458.

Heider, J., Spormann, A. M., Beller, H. R. and Widdel, F. (1998). Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. *FEMS Microbiol. Rev.* 22: 459-473.

Heipieper, H. J., de Bont, J. A. M. (1994). Adaptation of *Pseudomonas putida* S12 to ethanol and toluene at the level of fatty acid composition of membranes. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 4440-4444.

Hellinga, C. Schellen A. A. J. C., Mulder, J. W., van Loosdrecht, M. C. M. (1998). The Sharon process: an innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich wastewater. *Water Science and Technology.* 37: 135-142.

Hutchins, S. R. (1991). Biodegradation of monoaromatic hydrocarbons by aquifer microorganism using oxygen, nitrate, or nitrous oxide as the terminal electron. *Applied Environmental Microbiology.* 57: 2403-2407.

Inoue, O., Seiji, K., Watanabe, T., Nakatsuka, H., Jin, C., Liu, S. J., Ikeda, M. (1983). Effects of smoking and drinking habits on excretion of hippuric acid among toluene-exposed workers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 64:425-430.

Isken, S. and de Bont, J. A. M. (1996). Active efflux of toluene in a solvent-resistant bacterium. *J. Bacteriol.* 178(20): 6056-6058.

Jacobs, J. A. and Testa, S. M. (2003). Design Considerations for in situ chemical oxidation using high pressure jetting technology. *Soil Sediment and Water.* March/April. 51-60.

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

Jetten, M. S. M., Schmidt, M., Schmidt, I., Wubben, M., Van Dongen, U., Abma, W., et al. (2002). Improved nitrogen removal by application of new nitrogen-cycle bacteria. *Re/V Environ Sci Bio/Technol*.1: 51-63.

Jutter F. and Henatsch J. J. (1986). Anoxic hypolimnion is a significant source of biogenic toluene. *Nature*. 323: 797-798.

Kane, S. R., Beller, H. R., Legler, T.C., Anderson, R. T. (2002). Biochemical and genetic evidence of benzylsuccinate synthase in toluene degrading, ferric iron-reducing *Geobacter metallireducens*. *Biodegradation*. 13:149–154.

Kieboom, J., Dennis, J. J., de Bont, J. A. M. and Zylstra. (1998). Identification and molecular characterization of an efflux pump involved in *Pseudomonas putida* S12 solvent tolerance. *J. Biol. Chem.* 273(1): 85-91.

Kelly, C. J., Bienkowski, P. R. and Sayler, G. S. (2000). Kinetic analysis of a tod-lux bacterial reporter for toluene degradation and trichloroethylene cometabolism. *Biotechnol. Bioeng.* 69: 256-265.

Kobayashi, H., Uematsu, K., Hirayama, H. and Horikoshi, K. (2000). Novel toluene elimination system in a toluene-tolerance microorganism. *J. Bacteriol.* 182(22): 6451-6455.

Koizumi, Y., Kelly, J. J., Nakagawa, T., Urakawa, H., El-Fantroussi, S., Al-Muzaini, S., Fukui, M. Urushigawa, Y. and Stahl, D. A. (2002). Parallel Characterization of anaerobic toluene- and ethylbenzene-degrading microbial consortia by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis, RNA-DNA membrane hybridization and DNA microarray technology. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (7): 3215-3225.

Knobeloch, L., Salna, B., Hogan, A., Postle, J. and Anderson, H. (2000). Blue babies and nitrate-contaminated well water. *Environmental Health Perspectives*. 108: 675-678.

Knowles, R. (1982). Denitrification. *Microbiol. Rev.* 46(1): 43-70.

Knowles, Q. W. and Niven, D. F. (1994). O₂ regulation of denitrification in *Flexibacter Canadensis*. *Can J. Microbiol.* 40: 916-921.

Krieger, C. J. (1999). Initial reactions in anaerobic oxidation of *m*-xylene by the denitrifying bacterium *Azoarcus sp.* strain T. *J Bacteriol.* 181: 6403–6410.

Kroneck, P. M., Beuerle, J. Schumacher, R. W. (1992). Metal-dependent conversion of inorganic nitrogen and sulfur compounds. In: *Metal ions in biological systems*. Siegel, H. and Siegel, A. Eds. Marcel Dekker Inc., AUS. 28. pp. 455-505.

Kropp, K. G., Davidova, I. A., Suflita, J. M. (2000). Anaerobic oxidation of n-dodecane by an addition reaction in a sulfate reducing bacterial enrichment culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:5393–98.

- Kuhn, E. P., Colberg, P. J., Schnoor, J. L., Wanner, O., Zehnder, A. J. B. and Schwarzenbach, R. P. (1985) Microbial transformations of substituted benzenes during infiltration of river water to groundwater: laboratory column studies. *Environ. Sci. Technol.* 19: 961-968.
- Kuhn, E.P., Zeyer, J., Eiche, P., Schwarzenbach, R.P., 1988. Anaerobic degradation of alkylated benzenes in denitrifying laboratory aquifer columns. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 490-496.
- Kumai, M., Loizumi, A., Saito, K., Sakura, H., Inoue, T., Takeuchi, Y., Hara, I., Ogata, M., Matsushita, T. and Ikeda, M. (1983). A nationwide survey on organic solvent components in various solvent products. II. Heterogeneous products such as paints, inks, and adhesives. *Ind. Health.* 21: 185-197.
- Lalucat, J., Bennasar, A., Bosch, R., García-Valdés, E., and Palleroni, N. J. (2006). Biology of *Pseudomonas stutzeri*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 70 (2): 510-547.
- León, E., Seignez, C., Adler, N. and Peringer, P. (1999). Growth inhibition of biomass adapted to the degradation of toluene and xylenes in mixture in a batch reactor with substrates supplied by pulses. *Biodegradation.* 10: 245- 250.
- Leuthner, B., Leutwein, C., Schulz, H., Horth, P., Haehnel, W., Schiltz, E., Schagger, H., Heider, J. (1998). Biochemical and genetic characterization of benzylsuccinate synthase from *Thauera aromatica*: a new glycyl radical enzyme catalysing the first step in anaerobic toluene metabolism. *Mol Microbiol.* 28:615–628.
- Li, S. F. Y. (1993). Capillary electrophoresis-principle, practice and applications. Elsevier, Netherlands. Pp. 797.
- Lindbohm, M. L., Taskinen, H., Sallmen, M. Hemminki, K. (1990). Spontaneous abortions among women exposed to organic solvents. *Am. J. Ind. Med.* 17: 449-463.
- Lovley, D. R, Baedeker, M. J., Lonergan, D.J., Cozzarelli, I. M., Phillips, E. J. P., Siegel, D. I. (1989). Oxidation of aromatic contaminants coupled to microbial iron reduction. *Nature.* 339:297–299.
- Lovley, D. R. and Lonergan, D. J. (1990). Anaerobic oxidation of toluene, phenol and *p*-cresol by the dissimilatory iron-reducing organisms GS-15. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1858-1864.
- Lovley, D. R., Woodward, J. C. and Chapelle, F. H. (1994). Stimulated anoxic biodegradation of aromatic hydrocarbons using Fe(III) ligands. *Nature.* 370: 128-131.

Macnaughton, S. J., Stephen, J. R., Venosa, A. D., Davis, G. A., Chang, Y. J. and White, D. C. (1999). Microbial population changes during bioremediation of a experimental oil spill. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (8): 3566-3574.

Madigan, M. T., Martinko, J. M. y Parker, J. (1998). *Biología de los microorganismos*. Prentice Hall, Inc.

Mateju, V., Cizinska, S., Krejei, J. and Janoch, T. (1992). Biological water denitrification. A review. *Enzyme Microb. Technol.* 14: 170-183.

McIsaac, G. F., David, M. B., Gertner, G. Z. and Goolsby, D. A. (2002). Nitrate flux in the Mississippi river. *Nature.* 414 (8): 166-167.

Metcalf and Eddy. (1991). *Wastewater engineering: Treatment disposal reuse*. Editorial McGraw-Hill, Inc.

Mirvish, S. S. (1985). *Science.* 315: 461-462.

Morrison, R. T. y Boyd, R. N. (1998). *Química orgánica*. Addison Wesley Longman de México S.A. de C.V.

Moura, I. and Moura, J. JG. (2001). Structural aspects of denitrifying enzymes. *Current Opinion in Chemical Biology.* 5: 168-175.

Mrowiec, B., Suschka, J. and Keener, T. C. (2005). Formation and biodegradation of toluene in the anaerobic sludge digestion process. *Water Environment Research.* 77 (3): 274-278.

Muller, J. A., Galushko, A. S., Kappler, A., Schink, B. (1999). Anaerobic degradation of *m*-cresol by *Desulfobacterium cetonicum* is initiated by formation of 3-hydroxybenzylsuccinate. *Arch. Microbiol.* 172: 287-94.

Muller, J. A., Galushko, A. S., Kappler, A., Schink, B. (2001). Initiation of anaerobic degradation of *p*-cresol by formation of 4- hydroxybenzylsuccinate in *Desulfobacterium cetonicum*. *J. Bacteriol.* 183:752- 57.

Muñoz, H., Armienta, M. A., Vera, A. y Cenicerros, N. (2004). Nitrato en el agua subterránea del valle de Huamantla, Tlaxaca, México. *Revista Internacional de contaminación ambiental.* 20 (003):91-97.

Muyzer, G., De Wall, E. C. and Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 (3): 695-700.

Ng, T. P., Foo, S. C., Yoong, T. (1992). Risk of spontaneous abortions in workers exposed to toluene. *Br. J. Ind. Med.* 49: 804-808.

Oh, J. and Silverstein, J. (1999). Acetate limitation and nitrite accumulation during denitrification. *J. Environ. Eng.* 125(3): 234-242.

Olsen, R. H., Kukor, J. J., and Kaphammer, B. (1994). A novel toluene-3-monooxygenase pathway cloned from *Pseudomonas pickettii* PKO1. *J. Bacteriol.* 176: 3749-3756.

Otte, S., Grobbsen, N. G., Robertson, L. A., Jetten, M. S. M. and Kuenen, J.G. (1996). Nitrous oxide production by *Alcaligenes faecalis* under transient and dynamic aerobic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(7): 2421-2426.

Pacheco, J., Marin, M., Cabrera, A., Steinich, B., y Escolero, O. (2001). Nitrate temporal and spatial patterns in 12 water supply wells, Yucatán, Mexico. *Environ. Geol.* 40: 708-715.

Panday, S., Wu, Y. S., Huyakorn, P. S., Wade, S. C. and Saleem, Z. A. (1997). A composite numerical model for assessing subsurface transport of oil and wastes and chemical constituents. *J. Contam. Hydrol.* 25: 1-2.

Parés, R. y Juárez, A. (1997). *Bioquímica de los microorganismos*. Editorial Reverté. Barcelona.

Parker, W. J., Monteith, H. D., Bell, J. P. and Melcer, H. (1996). A field scale evaluation of the airstripping of volatile organic compounds by surface aerators. *Water Environ. Res.* 68(7): 1132-1139.

Payne, W. J. (1981). *Denitrification*. A Wiley- Interscience publication.

Patz, J.A., Engelberg, D. and Last J. (2000). *Annu. Rev. Public health.* 21: 271-307.

Pelz, O., Chatzinotas, A., Andersen, N., Bernasconi, S. M., Hesse, C., Abraham, W. R. and Zeyer, J. (2001). Use of isotopic and molecular techniques to link toluene degradation in denitrifying aquifer microcosms to specific microbial populations. *Arch. Microbiol.* 175: 270-281.

Pemex: informe desarrollo sustentable: <http://desarrollosustentable.pemex.com>.

Peng, Y. and Zhu, G. (2006). Biological nitrogen removal with nitrification and denitrification via nitrite pathway. *App. Microbiol. Biotechnol.* 10.1007/s00253-006-0534-z.

Peña-Calva, A, Olmos, D. A, Viniegra, G. G, Cuervo, L. F., Gómez, J. (2004). Denitrification in presence of benzene, toluene, and *m*-xylene. *Appl. Biochem. Biotech.* 119, 195-208.

- Pérez, J. T. (1998). Estudio y evaluación del efecto del pH y la fuente de electrones en la desnitrificación en estado estacionario. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México.
- Phelps, C. D. and Young, L. Y. (1999). Anaerobic biodegradation of BTEX and gasoline in various aquatic sediments. *Biodegradation*. 10: 15-25.
- Phelps, C. D., and Young, L. Y. (2001). Biodegradation of BTEX under anaerobic conditions: A review. *Advances in Agronomy*. 70: 329-357.
- Prescott, L. M., Harley, J. P. and Klein, D. A. (1999). *Microbiología*. Editorial McGraw-Hill-Interamericana.
- Poughon, L., Dussap, C. G. and Gros, J. B. (2001). Energy model and metabolic flux analysis for autotrophic nitrifiers. *Biotech. and Bioeng.* 72(4): 416-433.
- Rabalais, N. N., Turner, R. E., Wiseman Jr., W. J. (2002). Gulf of Mexico hypoxia A.K.A. "The dead zone". *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 33: 235-263.
- Rabus, R., Widdel, F. (1996). Utilization of alkylbenzenes during anaerobic growth of pure cultures of denitrifying bacteria on crude oil. *Appl Environ Microbiol* 62:1238-1241.
- Rabus, R., Wilkes, H., Behrends, A., Armstroff, A., Fischer, T. (2001). Anaerobic initial reaction of n-alkanes in a denitrifying bacterium: evidence for (1-methylpentyl) succinate as initial product and for involvement of an organic radical in n-hexane metabolism. *J. Bacteriol.* 183: 1707-15.
- Reardon, K. F., Mosteller, D. C., Rogers, B. J. (2000). Biodegradation kinetics of benzene, toluene, and phenol as single and mixed substrates for *Pseudomonas putida* F1. *Biotechnol. Bioeng.* 69 (4), 526-536.
- Reardon, K. F., Mosteller, D. C., Rogers, J. B., Du Teau, N. M. and Kim, K. H. (2002). Biodegradation kinetics of aromatic hydrocarbon mixtures by pure and mixed bacterial cultures. *Environmental Health Perspectives*. 110 (6): 1005-1011.
- Rijn, J. V., Tal, Y. and Barak, Y. (1996). Influence of volatile fatty acids on nitrite accumulation by a *Pseudomonas Stutzeri* strain isolated from a denitrifying fluidized bed reactor. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(7): 2615-2620.
- Rogers, J. B., Du Teau, N. M., Reardon, K. F. (2000). Use of 16S-rRNA to investigate microbial population dynamics during biodegradation of toluene and phenol by a binary culture. *Biotechnol. Bioeng.* 70: 436-445.

Roling, W. F. M., van Breukelen, B. M., Braster, M., Lin, B. and van Verseveld, H. W. (2001). Relationships between microbial community structure and hydrochemistry in a landfill leachate-polluted aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (10): 4619-4629.

Rozkov, A., Kaard, A. and Vilu, R. (1998). Biodegradation of dissolved jet fuel in chemostat by a mixed bacterial culture isolated from a heavily polluted site. *Biodegradation.* 8: 363-369.

Rueter, P., Rabus, R., Wilkes, H., Aeckersberg, F., Rainey, F. A., Jannasch, H. W. and Widdel, F. (1994). Anaerobic oxidation of hydrocarbons in crude oil by denitrifying bacteria. *Nature.* 372: 455-458.

Sanguinetti, C. j., Dias Neto, E., Simpson, A. J. G. (1994). Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Bio Techniques.* 17, 915-919.

Sebastiao, P. and Guedes-Soares, C. (1995). Modeling the fate of oil spills at sea. *Spill Sci. Technol. Bull.* 2: 2-3.

Schmidt, I., Sliemers, O., Schmid, M., Bock, E., Fuerst, J., Kuenen, J.G., Jetten, M.S.M., Strous, M. (2003). *FEMS Microbiology Reviews.* 27:481-492.

Siddiqui, R. A., Warnecke-Eberz, U., Hengsberger, A., Schneider, B., Kostka, S. and Friedrich, B. (1993). Structure and function of a periplasmic nitrate reductase in *Alcaligenes eutrophus* H16. *J. Bacteriol.* 175: 5867-5876.

Shields, M. S., Montgomery S. O., Chapman, P. J., Cursey, S. M. and Pritchard P. H. (1989). Novel pathway of toluene catabolism in the trichloroethylene-degrading bacterium G4. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1624-1629.

Schimel, D., Alves, D., Enting, I., Heimann, M. and Joos, F. (1996). Radiative forcing of climate change. In *climate change 1995. The science of climate change*, ed. J.,T., Houghton, L., G., Meira-Filho, B, A., Callander, N., Harris., A., Kattenberg, K., Maskell, pp. 65-131. Cambridge, U K: Cambridge Univ. Press.

Schink, B., Brune, A., and Schnell, S. (1992). Anaerobic degradation of aromatic compounds, in *Microbial degradation of natural products* (Winkelman, G., ed.) pp. 219-242. VCH, Weinheim.

Schocher, R. J., Seyfried, B., Vazquez, F., Zeyer, J. (1991). Anaerobic degradation of toluene by pure cultures of denitrifying bacteria. *Arch Microbiol.* 157:7-12.

Schomburg, G. (1990). *Gas chromatography- a practical course.* VCH, Federal Republic of Germany. Pp. 320.

Shannon, C. E. and Weaver, W. (1963). The mathematical theory of communication. University of Illinois Press, Urbana.

Shinoda, Y., Sakai, Y., Uenishi, H., Uchihashi, Y., Hiraishi, A., Yukawa, H., Yurimoto, H., and Kato, N. (2004). Aerobic and Anaerobic Toluene Degradation by a Newly Isolated Denitrifying Bacterium, *Thauera* sp. Strain DNT-1. Applied Environmental Microbiology. 70 (3): 1385-1392.

Sikkema, J., de Bont, J. A. M. and Poolman. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. Microbiol. Rev. 59: 201-222.

Sims, R. C. and Overcash, M. R. (1983). Fate of polynuclear aromatic compounds (PNAs) in soil plant systems. Residue Rev. 88:1-68.

Smil, V. (1997). Global population and the nitrogen cycle. Sc. Amer. 277 (1): 58-63.

Soares, M.I.M. (2000). Biological denitrification of groundwater. Water, Air, and Soil Pollution. 123: 183-193.

Snyder, R. (ed) (1987). Ethel Browning's toxicity and metabolism of industrial solvents, 2nd ed. Vol. 1, Hydrocarbons. Elsevier, Amsterdam, pp 40-52.

Song, B., Young, L. Y. and Palleroni, N. J. (1998). Identification of denitrifiers strain T1 as *Thauera aromatica* and proposal for emendation of the genus *Thauera* definition. Int. J. Syst. Bacteriol. 48, 889-894.

Spain, J. C., and Gibson, D. T. (1988). Oxidation of substituted phenol by *Pseudomonas putida* F1 and *Pseudomonas* sp strain JS6. Appl. Environ. Microbiol. 54: 1399-1404.

Spalding, R.F. and Exner, M.E. (1993). Occurrence of nitrate in groundwater- a review. J. Environ. Qual. 22: 392-402.

Spormann, A. M. and Widdel, F. (2000). Metabolism of alkylbenzenes, alkanes, and other hydrocarbons in anaerobic bacteria. Biodegradation. 11: 85-105.

Strous, M., Kuenen, J. G and Jetten, M. S. M. (1999). Key physiology of anaerobic ammonium oxidation. Appl. Environ. Microbiol. 65: 3248-3250.

Su, J. J. and Kafkewitz, D., (1994). Utilization of toluene and xylenes by a nitrate reducing strain of *Pseudomonas maltophilia* under low oxygen and anoxic conditions. FEMS Microbiol. Ecol. 15, 249-258.

Suzuki, M. T., Taylor, L. T., DeLong, E. F. (2000). Appl. Environ. Microbiol. 66, 4605-4614.

Texier, A. C. and Gomez, J. (2002). Tolerance of nitrifying sludge to *p*-cresol. Biotechnology letters. 24: 321-324.

Thoma, G., Gleason, M. and Popov, V. (2006). Sonochemical treatment of benzene/toluene contaminated wastewater. *Environmental Progress*. 17 (3): 154-160.

Tibbetts, J. 2000. World water 2000. *Environmental Health Perspectives*. 108 (2): 69-72.

Thomsen, J. K., Geest, T. and Cox, R. P. (1994). Mass spectrometric studies of effect of pH on the accumulation of intermediates in denitrification by *Paracoccus denitrificans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 536-541.

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

United Nations. (1999). World day for water. www.worldwaterday.org/wwday/1999/press.

Van de Graaf, A. A., De Bruijn, P., Robertson, L. A. Jetten, M. S. M. and Kuenen, J. G. (1996). Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing micro-organisms in a fluidized bed reactor. *Microbiology (UK)*. 142: 2187-2196.

Van Loosdrecht, M. C. M. (2004). Recent development on biological wastewater nitrogen removal Technologies. In: proceedings of the presentation in international conference on wastewater treatment for nutrient removal and reuse (ICWNR'04).

Vernier, J. (1992). *El medio ambiente*. Cruz O.

Vogel, T. M., Grbic-Galic, D. (1986). Incorporation of oxygen from water into toluene and benzene during anaerobic fermentative transformation. *Appl Environ Microbiol.* 52:200–202.

Wang, J. H., Baltzis, B. C. and Lewandoski, G. A. (1995). Reduction of nitrate and nitrite in a cyclically operated continuous biological reactor. *Biotech. Bioeng.* 46 (2): 159-171.

Ward, M. H., deKok, T.M., Levallois, P., Brender, J., Gulis, G., Nolan, B. T. and VanDerslice, J. (2005). Workgroup report : drinking-water nitrate and health-recent findings and research needs. *Environmental Health Perspectives*. 113 (11): 1607-1614.

Washer, C. E. and Edwards, E. A. (2007). Identification and expression of benzylsuccinate synthase genes in a toluene-degrading methanogenic consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* 74 (4): 1367-1369.

Watanabe, Y., Okabe, S., Hirata, K. and Masuda, S. (1995). Simultaneous removal of organic materials and nitrogen by micro-aerobic biofilms. *Wat. Sci. Tech.* 31(1): 195-203.

Weston, R.F. (1984). Inc.: Advanced waste treatment performance evaluation summary report, USEPA contract No. 68-03-3019.

Wicht, H. (1996). A model for prediction nitrous oxide production during denitrification in activated sludge. *Wat. Sci. Tech.* 34(5-6): 99-106.

Wilson, P. and Bouwer, E. J. (1997). Biodegradation of aromatic compounds under mixed oxygen/denitrifying conditions: a review. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 18: 118-130.

Williams, P. A. and Murray, K. (1974). Metabolism of benzoate and the methylbenzenes by *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2, evidence for the existence of the TOC plasmid. *J. Bacteriol.* 120: 416-423.

Whited, G. M. and Gibson, D. T. (1991). Toluene-4-monooxygenase, a three-component enzyme system that catalyzes the oxidation of toluene to *p*-cresol in *Pseudomonas mendocina* KR1. *J. Bacteriol.* 173:3010- 3016.

Yang, C. Y., Cheng, M. F., Tsai, S. S. and Hsieh, Y. L. (1998). Calcium, magnesium, and nitrate in drinking water and gastric cancer mortality. *Jpn j. Cancer Research.* 89 (2): 124-130.

Yerushalmi, L., Manuel, M. F. and Guiot, S. R. (1999). Biodegradation of gasoline and BTEX in a microaerophilic biobarrier. *Biodegradation.* 10: 341-352.

Zennaro, E., Ciabatti, I., Cutruzzola, F., D'Alessandro, R. and Silvestrini, M. C. (1993). The nitrite reductase gene of *Pseudomonas aeruginosa*: effect of growth conditions on the expression and construction of a mutant by gene disruption. *FEMS Microbiol. Lett.* 109: 243-250.

Zepeda, A., Texier, A. C. and Gomez, J. (2003). Benzene transformation in nitrifying batch cultures. *Biotechnology progress.* 19: 789-793.

Zeyer, J., Kuhn, E. P. and Schwarzenbach, R. P. (1986). Rapid microbial mineralization of toluene and 1,3-dimethylbenzene in the absence of molecular oxygen. *Appl. Environ. Microbiol.* 52, 944-947.

Zytner, R. G., Madani-Isfahani, M. and Corsi R. L. (1997). Oxygen uptake and VOC emissions at enclosed sewer drop structures. *Water Environ. Res.* 69 (3): 286-294.

Zumft, W. G. (1997). Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61(4): 533-616.

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

**Análisis ecofisiológico de la desnitrificación en presencia de
acetato y tolueno**

Que presentó
Sergio Martínez Hernández

Comité Tutorial:

Directora: Dra. Flor de María Cuervo López

Co-director: Dr. Hugo C. Ramírez Saad

Asesora: Dra. Eugenia J. Olguín Palacios

Asesor: Dr. Jorge Gómez Hernández

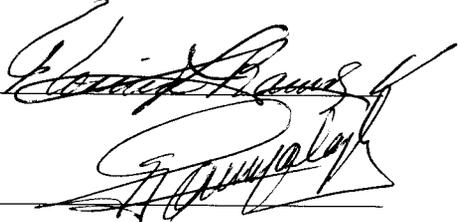
H. Jurado:

Presidenta: Dra. Florina Ramírez Vives

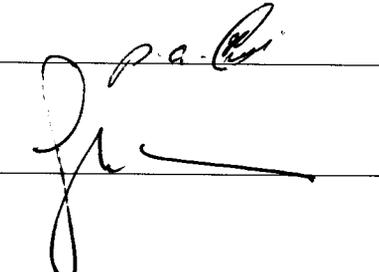
Secretario: Dr. Humberto González Márquez

Vocal: Dra. Eugenia J. Olguín Palacios

Vocal: Dr. Eric Houbron Marty



Handwritten signature of Florina Ramírez Vives, Presidenta of the Jury, written over a horizontal line.



Handwritten signature of Eric Houbron Marty, Vocal, written over a horizontal line.