



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA

EFFECTO DEL BENZOTRIAZOL EN LOS PROCESOS AMONIO Y NITRITO OXIDANTES DE LA NITRIFICACIÓN

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA: I.B.I DANIEL MATURANO CARRERA

DIRECTORA

DRA. ANNE-CLAIRE TEXIER

ASESORES

DRA. FLOR DE MARÍA CUERVO LÓPEZ

DR. DIEGO IVÁN BEJARANO ORTIZ

Esta tesis se llevó a cabo en el Laboratorio de Fisiología Microbiana W-004 del Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa, gracias al apoyo otorgado por el Consejo Divisional de la DCBS de la UAM-I y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa está inscrita en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC).

Iztapalapa, Ciudad de México a 05 de septiembre de 2018

El H. Jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la
Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa aprobó la tesis

**Efecto del benzotriazol en los procesos amonio y nitrito oxidantes de la
nitrificación**

Que presentó

I.B.I Daniel Maturano Carrera

Comité tutorial

Dra. Anne-Claire Texier

Directora de tesis, UAM-Iztapalapa

Dra. Flor de María Cuervo López

Asesora, UAM-Iztapalapa

Dr. Diego Iván Bejarano Ortiz

Asesor, CINVESTAV-IPN.

H. Jurado

Presidenta: Dra. Florina Ramírez Vives _____

Secretaria: Dra. Flor de María Cuervo López _____

Vocal: Dr. Diego Iván Bejarano Ortiz _____

Vocal: Dr. Jesús Emmanuel Pérez Alfaro _____

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Anne-Claire Texier por el tiempo, pasión y esfuerzo dedicado a este trabajo. Por darme la oportunidad de ser parte de este maravilloso trabajo y por su apoyo, que ha sido parte de mi formación personal y profesional.

A la Dra. Flor de María Cuervo López por su asesoría, observaciones y sugerencias, que han enriquecido este trabajo.

Al Dr. Diego Iván Bejarano Ortiz por su tiempo y apoyo a larga distancia.

A la Dra. Leticia González Núñez y Andrea Gómez Zuñiga por darme infinitas oportunidades y ser mi motivación para continuar en esta carrera profesional.

A todos mis compañeros y amigos del W-004 por hacerme pasar grandes e inolvidables momentos en mi vida; Migue, Yen, Lalo, Rubén (Raúl), Cintuky, Saruky, Juan y finalmente a mi vecina y mejor amiga, compañera de historias Lyn.

A mis amigos y equipo de fut Canteros; Charly, Vane, Chivo, Vico, Lalo, Mario, Neto, Memo e Ivan porque son el pilar principal de mi vida y las personas que me hacen seguir creciendo día a día además de hacerme reír hasta la muerte!!.

DEDICATORIA

A mis padres

Con toda la fuerza de mi corazón dedico este trabajo a la chispa que ha encendido mi inspiración en todos los aspectos de mi vida: **Arturo Maturano** y **Concepción Carrera**, nunca podre agradecerles la oportunidad de darme la vida. Muchas gracias por su amor, tiempo y cariño. Porque en mi vida, absolutamente nada me faltó gracias a ustedes.

A mi Hermano

David Maturano porque te admire desde pequeño, con todos los logros personales y académicos que obtuviste. Por tu manera de superarte día a día y enseñarme que todo en este mundo es posible si lo deseas. Gracias por darme tu apoyo total cuando más lo necesitaba, por escucharme, y estar preocupado por mí, además de compartir toda una infancia llena de alegrías y una que otra discusión.

A mis primos

Vane porque siempre estas para mí en cualquier momento y haces sentirme una persona importante y amada. Gracias por sacarme adelante y ser mi fuerza. Tú me motivas para llegar a la meta que todos tenemos en esta vida: ¡¡ser felices!!

Carlos por estar en las buenas y las malas, hacerme ver que la vida está llena de alegrías. Gracias por tantos momentos perfectos (conciertos y buen fútbol). Eres mi hermano y nunca te dejare de admirar. Sin embargo, sabes que me superarás!!!

A mis tías

Mary que buscaste la manera de conseguirme cosas que necesitaba (la mayoría caprichos), por escucharme y siempre estar al pendiente de mi persona, tienes un enorme corazón como lo saben tus niños (la char y el perro feo) que te cuidan desde el punto más elevado del cielo, corazón del cual aprendí a ser mejor ser humano y persona.

Ángela por ser la persona que más confianza me puede tener en este mundo y nunca dudar de mí. Por compartir hermosos momentos con toda la familia y dejarme en claro que esto es solo el inicio de una cadena de logros.

A mi abue

Delia la persona que me enseñó que ser grande, es sinónimo de humilde. Por ser la parte más importante de mi familia y la más trabajadora del mundo, gracias por darme todo incondicionalmente.

Índice

.....	1
<i>xi</i> Resumen.....	10
1. Introducción	12
1.1. Composición de aguas residuales.....	12
1.2 Contaminantes orgánicos emergentes (EOCS)	12
1.3 Benzotriazol	14
1.3.1 Presencia de benzotriazol en agua	15
1.3.2 Estudios toxicológicos.....	15
1.4 Tratamiento biológico por nitrificación.....	16
1.4.1 Nitrificación	17
1.4.1.1 Bacterias amonio oxidantes.....	20
1.4.1.2 Bacterias nitrito oxidantes	21
1.4.2 Factores que afectan la nitrificación	21
1.4.2.1 Efecto del valor de pH en la nitrificación.....	22
1.4.2.2 Efecto de la concentración de oxígeno.....	22
1.4.2.3 Efecto de la temperatura	22
1.4.2.4 Efecto de compuestos aromáticos sobre la nitrificación	22
1.4.3 Efectos inhibitorios en procesos nitrificantes	23
2 Justificación	25
3 Hipótesis	26
4 Objetivo	26
4.1 Objetivos particulares	26
5 Metodología.....	26
5.1 Reactor nitrificante en continuo.....	26
5.2 Cultivos en lote	27
5.3.1 Métodos analíticos.....	28
5.3.1 Cuantificación de amonio (Electrodo selectivo).....	28
5.3.2 Cuantificación de hidroxilamina.....	29
5.3.3 Cuantificación de nitrito y nitrato (HPLC).....	30
5.3.4 Cuantificación de nitrito y nitrato (Electroforesis capilar)	31

EFFECTO DEL BENZOTRIAZOL EN LOS PROCESOS AMONIO Y NITRITO OXIDANTES DE LA
NITRIFICACIÓN.

5.3.5	Cuantificación de benzotriazol (HPLC)	33
5.3.6	Determinación de proteína microbiana	34
5.3.7	Determinación de pH y oxígeno disuelto (Electrodo selectivo)	35
5.4	Variables de respuesta	35
5.4.1	Eficiencia	35
5.4.2	Rendimiento	36
5.4.3	Velocidad volumétrica y específica	36
5.5	Análisis estadístico	37
6	Resultados y discusión	37
6.1	Reactor nitrificante en continuo	37
6.2	Cultivos con amonio como fuente de energía	39
6.2.1	Consumo de amonio	39
6.2.2	Formación de hidroxilamina	40
6.2.3	Formación de nitrito	42
6.2.4	Formación de nitrato	43
6.2.5	Resumen de resultados (cultivos nitrificantes con amonio)	45
6.2.6	Benzotriazol	46
6.3	Cultivos con nitrito como fuente de energía	47
6.3.1	Consumo de nitrito	47
6.3.2	Formación de nitrato	48
6.3.3	Resumen de resultados (cultivos nitrificantes con nitrito)	50
6.3.4	Consumo de benzotriazol	50
7	Conclusiones	52
8	Bibliografía	53
I.	Apéndice I	60
II.	Apéndice II	64

Índice de tablas

Tabla 1. Efectos de EOCs sobre los seres vivos, incluido el ser humano (tomado de Bolong et al., 2009 y Farré et al., 2008).	13
Tabla 2. Efectos de contaminantes orgánicos en la nitrificación	23
Tabla 3. Efectos en cultivos nitrificantes en presencia de diferentes compuestos inhibitorios	24
Tabla 4. Composición del medio de cultivo para alimentar el reactor nitrificante.	26
Tabla 5. Composición del medio de cultivo.	27
Tabla 6. Valores de coeficiente de determinación (R^2), pendientes (m) y coeficientes de variación en las pendientes (CV) obtenidos de las curvas de calibración de los diferentes métodos analíticos.	35
Tabla 7. Balance de nitrógeno en el reactor nitrificante en continuo.	38
Tabla 8. Proceso amonio oxidante: eficiencias y velocidades específicas de consumo de amonio	40
Tabla 9. Proceso amonio oxidante: rendimiento de formación de nitrito	43
Tabla 10. Proceso amonio oxidante: rendimiento y velocidad específica de formación de nitrato	44
Tabla 11. Resumen de las variables de respuesta de los cultivos nitrificantes, utilizando amonio como fuente de energía.	45
Tabla 12. Concentraciones promedio de Bt en 10 horas de cultivo nitrificante.	46
Tabla 13. Proceso nitrito oxidante: eficiencias y velocidades específicas de consumo de nitrito	48
Tabla 14. Proceso nitrito oxidante: rendimientos y velocidades específicas de formación de nitrato	49
Tabla 15. Resumen de las variables de respuesta en el proceso nitrito oxidante, utilizando nitrito como fuente de energía.	50
Tabla 16. Concentraciones promedio de Bt en 10 horas de cultivo nitrito oxidante	51

Índice de figuras

Figura 1. Benzotriazol y sus posibles formas tautoméricas.(tomado de Sease 1978).....	14
Figura 2. Ciclo del nitrógeno (tomado de Corrales et al., 2016).	17
Figura 3. Reacción amonio oxidante en el proceso respiratorio nitrificante.....	18
Figura 4. Oxidación de amonio y flujo de electrones (tomado de Farras y Juárez 1997). 19	
Figura 5. Reacción nitrito oxidante en el proceso respiratorio nitrificante.	19
Figura 6. Oxidación de nitrito y flujo de electrones (tomado de Farras y Juárez 1997).	20
Figura 7. Reactor en continuo con biomasa nitrificante.	27
Figura 8. Adición de oxígeno a botellas serológicas y posterior incubación.....	28
Figura 9. Curva de calibración de amonio por electrodo selectivo.....	29
Figura 10. Curva de calibración de hidroxilamina por espectrofotometría.	30
Figura 11. Curva de calibración de nitrito por HPLC.	31
Figura 12. Curva de calibración de nitrato por HPLC.	31
Figura 13. Curva de calibración de nitrito por electroforesis capilar.	32
Figura 14. Curva de calibración de nitrato por electroforesis capilar.	33
Figura 15. Curva de calibración de benzotriazol por HPLC.....	33
Figura 16. Curva de calibración de proteína microbiana por el método de Lowry.....	34
Figura 17. Perfil de la actividad nitrificante en el reactor.	38
Figura 18. Consumo de amonio a diferentes concentraciones iniciales de Bt.	39
Figura 19. Formación de hidroxilamina a diferentes concentraciones iniciales de Bt.	41
Figura 20. Formación de nitrito a diferentes concentraciones iniciales de Bt.....	42
Figura 21. Formación de nitrato a diferentes concentraciones iniciales de Bt.	44
Figura 22. Concentración de Bt en los cultivos nitrificantes de 10 h.....	46
Figura 23. Consumo de nitrito a diferentes concentraciones iniciales de Bt.	48
Figura 24. Formación de nitrato a diferentes concentraciones iniciales de Bt.	49
Figura 25. Concentración de Bt en los cultivos nitrito oxidantes de 10 h.....	51

xi Resumen

Se denominan contaminantes orgánicos emergentes (EOCs) a las sustancias cuya presencia en el ambiente no es necesariamente nueva, pero sí la preocupación por las posibles consecuencias de las mismas, dado el factor de riesgo que presentan para los seres vivos. El benzotriazol (Bt) es uno de los EOCs detectado en efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales. Se desconoce su efecto sobre el proceso nitrificante usado en el tratamiento biológico de aguas residuales para la eliminación de amonio. La nitrificación se lleva a cabo a través de dos procesos respiratorios sucesivos: amonio oxidación y la nitrito oxidación, donde participan bacterias quimiolitotróficas amonio oxidantes y nitrito oxidantes, respectivamente.

En el presente trabajo, se evaluó el efecto de la adición de diferentes concentraciones de Bt (0.1-10.0 mg/L) sobre los procesos amonio y nitrito oxidantes mediante cultivos en lote. Se realizaron cultivos con amonio (NH_4^+) o nitrito (NO_2^-) como única fuente de energía para evaluar cada etapa de la nitrificación en presencia de Bt. En los dos casos, se llevaron a cabo ensayos control sin Bt como referencia y cultivos nitrificantes en presencia de Bt. El comportamiento del proceso nitrificante en cada etapa se evaluó a través de las siguientes variables de respuesta: eficiencia de consumo de amonio ($E_{\text{N-NH}_4^+}$, %) y nitrito ($E_{\text{N-NO}_2^-}$, %), rendimientos de formación de nitrito ($Y_{\text{N-NO}_2^-/\text{N-NH}_4^+}$, mg N- NO_2^- /mg N- NH_4^+ consumido) y nitrato ($Y_{\text{N-NO}_3^-/\text{N-NH}_4^+}$, mg N- NO_3^- /mg N- NH_4^+ consumido y $Y_{\text{N-NO}_3^-/\text{N-NO}_2^-}$, mg N- NO_3^- /mg N- NO_2^- consumido), velocidad específica de consumo de amonio ($q_{\text{N-NH}_4^+}$, mg N- NH_4^+ /mg proteína microbiana h) y nitrito ($q_{\text{N-NO}_2^-}$, mg N- NO_2^- /mg proteína h), así como la velocidad específica de formación de nitrato ($q_{\text{N-NO}_3^-}$, mg N- NO_3^- /mg proteína h).

El lodo nitrificante empleado como inóculo en los cultivos en lote fue producido en un reactor operado en forma semicontinua, el cual fue monitoreado constantemente para asegurar que la nitrificación se llevara a cabo de manera eficiente, completa y en régimen estacionario. El lodo nitrificante en el reactor, registró valores de $E_{\text{N-NH}_4^+}$ de $99.9\% \pm 0.1$ y $Y_{\text{N-NO}_3^-/\text{N-NH}_4^+}$ de 0.97 ± 0.02 mg N- NO_3^- /mg N- NH_4^+ consumido.

En los ensayos control con amonio como fuente de energía sin adición de Bt, se determinaron valores después de 10 h de incubación de $E_{\text{N-NH}_4^+}$ de $99.7\% \pm 0.1$ y $Y_{\text{N-NO}_3^-/\text{N-NH}_4^+}$ de 0.96 ± 0.01 , sin acumulación de nitrito. Estos resultados indican que todo el amonio consumido fue oxidado a nitrato bajo las condiciones experimentales utilizadas en los cultivos en lote, llevándose a cabo de manera adecuada tanto la amonio oxidación como la nitrito oxidación. No obstante, cuando se adicionó Bt a concentraciones iniciales de 0.1 y 0.3 mg/L en los cultivos en lote, los valores de $E_{\text{N-NH}_4^+}$ y $q_{\text{N-NH}_4^+}$ se mantuvieron altos, pero el $Y_{\text{N-NO}_3^-/\text{N-NH}_4^+}$ disminuyó de 17 a 27%. Además, se registró una acumulación de nitrito ($Y_{\text{N-NO}_2^-/\text{N-NH}_4^+}$ de 0.10). La $q_{\text{N-NO}_3^-}$ disminuyó un 53% respecto al control. Estos resultados mostraron que el Bt a concentraciones de 0.1 y 0.3 mg/L no alteró el proceso amonio oxidante, pero sí inhibió el proceso nitrito oxidante. A concentraciones mayores de Bt de 2.5 a 10.0 mg/L, los efectos fueron diferentes observándose que el valor de $E_{\text{N-NH}_4^+}$ disminuyó de 12 a 24% respecto al control. Mientras que $q_{\text{N-NH}_4^+}$ disminuyó hasta 45% respecto al control. Sin embargo, a estas mismas concentraciones de Bt, no hubo acumulación de nitrito, el $Y_{\text{N-NO}_3^-/\text{N-NH}_4^+}$ se mantuvo por arriba de 0.87 y la $q_{\text{N-NO}_3^-}$ se conservó alta. Estos resultados indican que a concentraciones de 2.5 a 10.0 mg/L de Bt, el proceso mayormente alterado fue la amonio oxidación, mientras que el proceso de nitrito oxidación

EFFECTO DEL BENZOTRIAZOL EN LOS PROCESOS AMONIO Y NITRITO OXIDANTES DE LA NITRIFICACIÓN.

no fue inhibido. En todas las concentraciones de Bt ensayadas, no se registró una mayor acumulación de hidroxilamina, permaneciendo las concentraciones de NH_2OH en los cultivos por debajo de 1.8 mg/L como en los ensayos control. Estos resultados muestran que el efecto del Bt de 2.5 a 10.0 mg/L sobre la amonio oxidación fue principalmente a nivel del consumo de amonio y/o de su oxidación a hidroxilamina y no en la oxidación de hidroxilamina a nitrito.

En los ensayos control con nitrito como fuente de energía en ausencia de Bt, se determinaron valores tras 10 h de incubación de EN-NO_2^- de $99.9\% \pm 0.1$ y $Y_{\text{N-NO}_3^-/\text{N-NO}_2^-}$ de 1, indicando que todo el nitrito alimentado fue oxidado a nitrato bajo las condiciones experimentales usadas en los cultivos en lote. En presencia de Bt de 0.1 a 10.0 mg/L, no existió diferencia significativa en los valores de EN-NO_2^- y $Y_{\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-}$. Sin embargo, a 0.1 y 0.3 mg Bt /L las velocidades específicas disminuyeron respecto a los ensayos control, con una disminución de 7 y 6% en la $q_{\text{N-NO}_2^-}$, y de 19 y 13% en la $q_{\text{N-NO}_3^-}$ respectivamente. Estos resultados confirmaron que el proceso de nitrito oxidación fue inhibido en presencia de Bt a concentraciones de 0.1 y 0.3 mg/L.

Los efectos fisiológicos e inhibitorios del Bt sobre los procesos amonio y nitrito oxidantes fueron diferentes dependiendo de la concentración inicial adicionada. Estos resultados indican que la presencia de Bt en aguas residuales puede alterar los procesos nitrificantes, favoreciendo la acumulación de amonio o nitrito.

A lo largo de los ensayos en lote y bajo las condiciones estudiadas, se determinó que, durante las 10 h que duraron las cinéticas, no existió un consumo por parte del lodo nitrificante, para ninguna concentración de Bt evaluada, concluyendo que este compuesto es altamente recalcitran

1. Introducción

El agua es uno de los recursos naturales que forma parte del desarrollo de cualquier país. Es el compuesto químico más abundante del planeta y resulta indispensable para el desarrollo de la vida. Su disponibilidad es paulatinamente menor debido a su contaminación, incluyendo a los mantos acuíferos, lo cual representa un desequilibrio ambiental, económico y social (*Esponda 2001*).

Se considera que el agua está contaminada cuando se ven alteradas sus características químicas, físicas y/o biológicas, por lo que pierde su potabilidad para consumo diario o para su utilización en actividades domésticas, industriales o agrícolas. Las aguas residuales se definen como aguas de composición variada provenientes de las descargas de usos municipales, industriales, comerciales, de servicios, agrícolas, pecuarios, domésticos, incluyendo fraccionamientos y en general, de cualquier otro uso, así como la mezcla de ellas (*Rodríguez-Monroy y Duran de Bazúa 2006*).

En México, se generan alrededor de 229.73 m³/s de aguas residuales, de las cuales reciben tratamiento sólo 52.7% (*CNA 2014*), lo que indica que se requiere de mayor infraestructura y recursos humanos para mejorar la calidad de este bien, además de propuestas innovadoras que permitan implementar el tratamiento en diferentes condiciones ambientales y socioeconómicas.

1.1. Composición de aguas residuales

La contaminación del agua se produce por el vertimiento en ella de un elemento o compuesto orgánico o inorgánico que, disuelto, disperso o suspendido, alcanza una concentración que exceda la tolerancia para un uso determinado. La fuente de dichos contaminantes puede tener origen doméstico, industrial, agrícola y a veces de origen natural. Las corrientes, lagos, bahías y demás masas de agua donde se disponen efluentes tienen capacidad de dilución y auto purificación de los contaminantes. Sin embargo, debido al aumento creciente de la población, de la actividad industrial, agropecuaria y las cargas contaminantes vertidas a las fuentes, cada vez más se exceden estas capacidades con el consecuente deterioro paulatino de este recurso, necesario para la actividad humana e industrial (*Jaramillo 2005*).

Entre los distintos contaminantes que contiene el agua residual, están la materia orgánica, elementos de naturaleza inorgánica que pueden ser de distinta composición desde nutrientes como el nitrógeno y fósforo hasta sustancias tóxicas y peligrosas. Estos compuestos pueden estar en forma coloidal o disuelta (*Gómez y Hontoria 2003*).

1.2 Contaminantes orgánicos emergentes (EOCs)

Se denominan contaminantes orgánicos emergentes (EOCs por sus siglas en inglés), o nuevos contaminantes, a aquellas sustancias cuya presencia en el ambiente no es necesariamente nueva, pero sí la preocupación por las posibles consecuencias de la misma, dado el factor de riesgo que presentan para los seres vivos (*Barceló 2003*).

La mayoría de estos contaminantes aún no están incluidos en la legislación de ningún país a nivel mundial, o no existe una regulación legal que determine las concentraciones máximas admisibles de los mismos en los efluentes. Sin embargo, en los últimos 20 años,

EFFECTO DEL BENZOTRIAZOL EN LOS PROCESOS AMONIO Y NITRITO OXIDANTES DE LA NITRIFICACIÓN.

han empezado a ser cuantificados en aguas y en otras matrices ambientales, reconociéndose como contaminantes potencialmente peligrosos que pueden producir daños a la población humana y a los ecosistemas, por lo que podrían ser candidatos para incluirlos en normativas específicas (*Kitamura et al., 2005*).

La lista de nuevos contaminantes incluye sustancias bioacumulables, persistentes y tóxicas; tales como productos de higiene y cuidado personal, productos farmacéuticos, drogas de abuso, surfactantes, aditivos industriales y una gran variedad de compuestos químicos. La incidencia y la contribución de riesgo para la mayoría de estos contaminantes se desconocen, debido principalmente, al desafío analítico que impone el gran número de sustancias a monitorear y su presencia en concentraciones traza (ng a mg/L). De ahí, la dificultad de predecir sus efectos sobre la salud del ser humano y del resto de seres vivos (*Oller et al., 2011*). No obstante, se ha probado que un gran número de EOCs son capaces de alterar el sistema endocrino, bloqueando o perturbando las funciones hormonales de los organismos, provocando la feminización y hermafroditismo de los mismos, la disminución de la fertilidad y de la eficacia del apareamiento (*Bolong et al., 2009*). En la Tabla 1, se resumen los principales efectos que producen algunas de estas sustancias sobre los seres vivos, incluido el ser humano.

Tabla 1. Efectos de EOCs sobre los seres vivos, incluido el ser humano (tomado de *Bolong et al., 2009* y *Farré et al., 2008*).

EOCs	Aplicaciones	Efectos sobre la salud
Fármacos y Drogas de abuso	• Esteroides • Anticonceptivos. • Antibióticos: ▪ Sulfonamidas ▪ Penicilina ▪ tetraciclina ▪ etc.	• Feminización en ratones machos. • Resistencia microbiana.
Aditivos industriales	• Bisfenol-A (fabricación de plásticos) • Ftalatos (fabricación de plásticos) • Alquifenoles (fabricación de detergentes)	• Actividad estrogénica en ratas y hormonal en seres humanos. • Aumento del riesgo de cáncer de mama. • Agente anti-andrógeno. Provoca feminización en machos. • Alteración en el embarazo y abortos involuntarios. • Alteración en el desarrollo del proceso reproductivo.
Productos de higiene y cuidado personal	• Fragancias • Parabenos • Desinfectantes • Antisépticos	• Poder cancerígeno en roedores. • Actividad estrogénica. • Resistencia microbiana y biocida.
Surfactantes	• Compuestos perfluorados	• Cancerígeno.

1.3 Benzotriazol

El benzotriazol (Bt) es un derivado heterocíclico de nitrógeno con fórmula molecular $C_6H_5N_3$ (masa molar de 119.1 g/mol) que contiene tres átomos de nitrógeno, cada uno con un par solitario de electrones no compartido, formando un anillo de cinco miembros que puede existir en las siguientes formas tautoméricas (Fig.1):

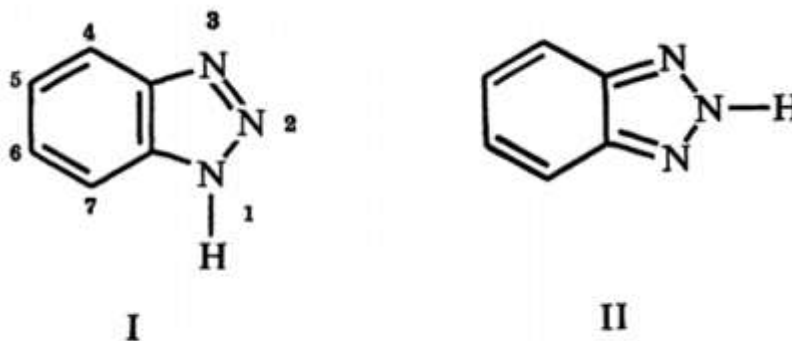


Figura 1. Benzotriazol y sus posibles formas tautoméricas.(tomado de Sease 1978).

En otras palabras, el protón migra rápidamente entre las posiciones 1 y 2 y nunca está unido a ninguna de las dos por ningún tiempo. Por lo tanto, el Bt puede actuar como un ácido débil que libera un protón o una base al aceptar un protón en uno de los pares de electrones solitarios del nitrógeno. La molécula de Bt puede utilizar estos pares solitarios de electrones para unirse a otras especies, por ejemplo, iones de cobre. De esta manera, se puede formar un compuesto de coordinación sobre la superficie de cobre que actúa como un inhibidor contra la corrosión. Estos complejos son estables e insolubles en agua y en la mayoría de los disolventes orgánicos. *Cotton (1967)* descubrió que el anillo de triazol juega un papel vital en la formación del complejo, puesto que el grupo NH, junto con al menos otro átomo de nitrógeno, necesita estar presente antes de que se forme el complejo. El Bt no modificado produce los mejores resultados como inhibidor de la corrosión. El Bt es específico para el cobre y parece estar fuertemente adsorbido sobre una superficie de óxido de cobre para formar una película de polímero de coordinación de cobre-Bt. Esta película es inerte, térmicamente estable y de larga duración, proporcionando una barrera protectora para el cobre. A pesar de las aplicaciones de la espectroscopia de reflexión infrarroja, espectroscopia de reflexión ultravioleta, difracción de rayos X, adsorción de gases y estudios electroquímicos, la estructura actual del Bt todavía no se entiende completamente (*Kokalj, et al., 2011*).

El Bt es sintetizado por una reacción de ortofenilendiamina con nitrito de sodio y ácido acético dando un polvo blanquecino a temperatura ambiente. Es suficientemente soluble (26 g/L) en soluciones acuosas para su uso como inhibidor de la corrosión. Los puntos de fusión y ebullición de Bt son de alrededor de 100 y 350 °C, respectivamente. La forma de la molécula en solución acuosa depende del pH y puede ser neutral, cargada negativamente o protonada. En ambientes ligeramente ácidos, el Bt está presente principalmente en la forma no disociada (*Kokalj et al., 2011*).

El Bt y derivados pertenecen a un grupo prominente de estabilizadores ultravioleta (UV) y se pueden polimerizar o copolimerizar con otras sustancias químicas. Estos productos químicos antropogénicos se han utilizado en productos de higiene personal, equipos deportivos, industriales y materiales de construcción, automóviles, componentes y agentes de tratamiento de agua en circulación para prevenir el amarillamiento y la degradación por UV (Becerril, 2009).

1.3.1 Presencia de benzotriazol en agua

Debido a su alto volumen de producción y amplia aplicación, el Bt ha sido frecuentemente detectado en varias matrices ambientales tales como aguas residuales municipales, lodos de aguas residuales, sedimentos, suelos e interiores en forma de polvo (Zhang *et al.*, 2011; Ruan *et al.*, 2012).

Es recalcitrante a la biodegradación (Rollinson y Calley, 1986; Breedveld *et al.*, 2002). Estas características pueden hacer que el Bt persista en el medio ambiente y cuerpos acuáticos durante mucho tiempo (Harris *et al.*, 2007).

Estudios realizados en aguas superficiales de Europa mostraron que las concentraciones de Bt oscilaban entre 7.9 y 38 ng/L (Giger *et al.*, 2006; Voutsas *et al.*, 2006). En Suiza, se detectaron concentraciones de hasta 100 mg/L en los efluentes secundarios provenientes de plantas de tratamiento de aguas residuales (Voutsas *et al.*, 2006). Estudios realizados en aguas superficiales de Europa mostraron que las concentraciones de Bt oscilaban entre 7.9 y 38 ng/L (Giger *et al.*, 2006; Voutsas *et al.*, 2006). En aguas subterráneas cercanas a un importante aeropuerto de América del Norte, se alcanzaron concentraciones de Bt de 126 mg/L (Cancilla *et al.*, 1998).

Recientemente, el Bt se detectó en agua potable en el Reino Unido con una concentración media de 30.9 ng/L (Janna *et al.*, 2011). Finalmente, se reportó también la presencia de Bt en la orina humana (Asimakopoulos *et al.*, 2012).

1.3.2 Estudios toxicológicos

Existe un aumento en los estudios toxicológicos desarrollados con Bt. Sin embargo, el conocimiento en relación con la toxicidad del Bt en el ser humano y la vida silvestre es todavía limitado (Hirata-Koizumi *et al.*, 2009). Sus propiedades persistentes y bioacumulativas hacen que el Bt se absorba fácilmente a través de la piel y se acumule en la sangre, lo que puede causar interacciones con las proteínas del plasma. El transporte, la distribución y los procesos metabólicos de muchos ligandos exógenos dependen en gran medida de su unión con albúmina de suero humano (HSA), la proteína de transporte más abundante en el plasma humano. La HSA actúa principalmente como la proteína transportadora para el acarreo de diversas moléculas exógenas y endógenas (Zhang *et al.*, 2013). Se sugiere la necesidad de una evaluación profunda a nivel molecular entre Bt y biomacromoléculas. No obstante, hasta ahora se han llevado a cabo aun pocos estudios al respecto.

Se ha demostrado que el Bt es tóxico para plantas de tomate plántulas de pepino y plantas de frijol arbustivo (EPA, 1977).

En un estudio con ratas macho, *Hirata Koizumi et al.* (2009) informaron de cambios histopatológicos tales como aumento de la fosfatasa alcalina en el suero (ALP), la albúmina y el peso relativo del hígado con la exposición crónica a la radiación con estabilizadores UV-320 con Bt en una dosis repetida de 2.5 mg/Kg día.

Estudios previos han demostrado también que a concentraciones efectivas de mg/L el Bt es tóxico para las bacterias luminiscentes y organismos acuáticos, incluyendo plantas, daphnia y peces (*Cancilla et al.*, 1997; *Cornell et al.*, 2000; *Pillard et al.*, 2001; *Kadar et al.*, 2010; *Seeland et al.*, 2012). Por ejemplo, el valor agudo (96 h) de la concentración letal media (CL₅₀) para peces carnero (*Pimephales promelas*) fue reportada de aproximadamente 65 mg/L (*Pillard et al.*, 2001). Recientemente, *Harris et al.* (2007) informaron que el Bt posee propiedades antiestrógenas en un estudio *in vivo* con minifaldas adultas (*Pimephales promelas*) expuestas a 0.01-1 mg/L de Bt durante dos semanas. Estos resultados sugieren que el Bt puede actuar como un compuesto antiestrogénico o estrogénico.

Hasta el momento, los estudios que investigan los efectos disruptores endocrinos del Bt en los organismos acuáticos siguen careciendo. Asimismo, los mecanismos de acción del Bt en organismos acuáticos no están bien documentados.

1.4 Tratamiento biológico por nitrificación

Uno de los contaminantes más importantes del agua es el nitrógeno, pues las actividades agrícolas e industriales han aumentado casi al doble la concentración de nitrógeno fijado anualmente en la biosfera (*Cervantes, 2009*). Parte importante de este contaminante llega a los diferentes cuerpos de agua en la forma de amonio, nitrato y nitrito, creando problemas de toxicidad para los organismos acuáticos, además de cambios ambientales como la eutrofización de lagos. Es necesario, entonces, encontrar sistemas de tratamiento que mantengan la concentración de compuestos nitrogenados dentro de niveles que no causen el deterioro de los ríos, lagos y mares (Fig. 2).

EFECTO DEL BENZOTRIAZOL EN LOS PROCESOS AMONIO Y NITRITO OXIDANTES DE LA NITRIFICACIÓN.

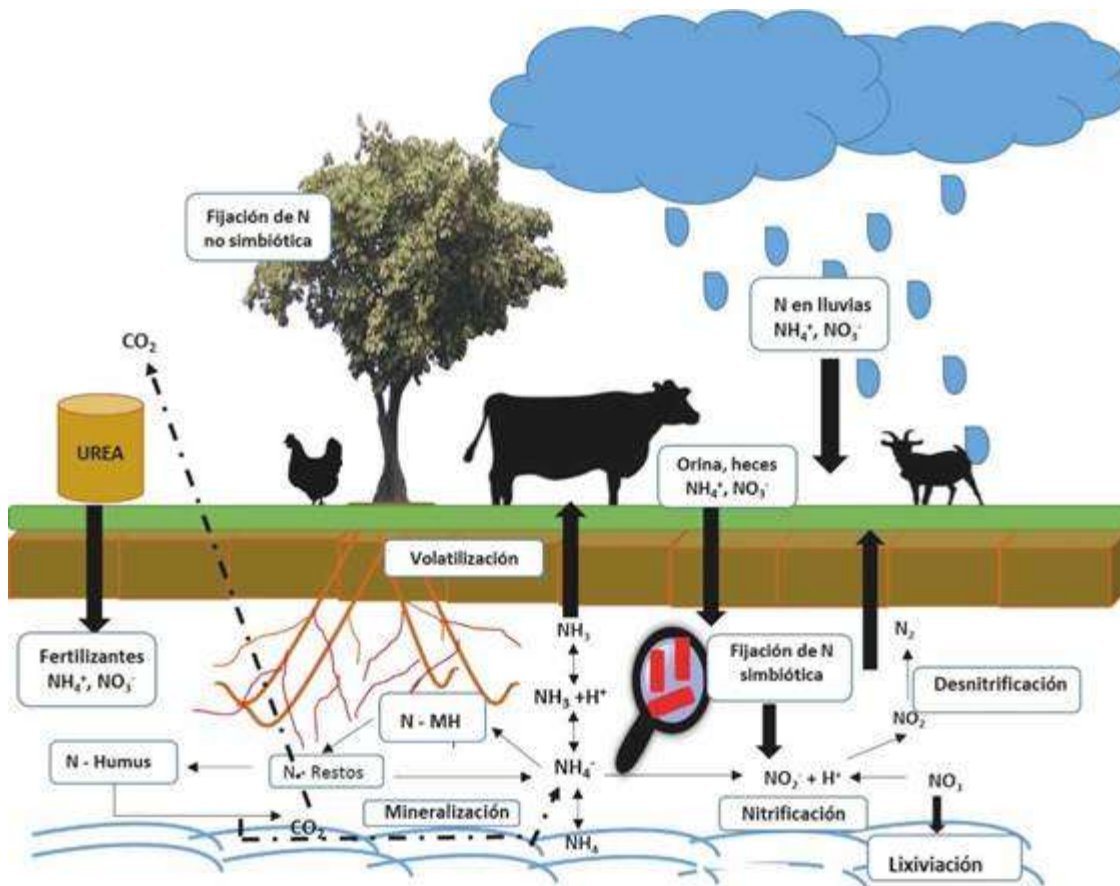


Figura 2. Ciclo del nitrógeno (tomado de Corrales et al., 2016).

Existen métodos fisicoquímicos y biológicos para la eliminación de nitrógeno del agua. Los primeros, en la mayoría de los casos, no resuelven el problema ya que trasladan el contaminante de un ambiente a otro. Los métodos biológicos sí lo eliminan y en condiciones idóneas, el producto final es N_2 . Los compuestos nitrogenados constituyen nutrientes clave para el crecimiento de los seres vivos, así que el nitrógeno puede ser eliminado del agua si es asimilado por microorganismos, pero el manejo de la biomasa producida de este modo resulta en sí otro problema. Por ello, los procesos biológicos no asimilativos, como la nitrificación y la desnitrificación, han constituido la forma más efectiva, sostenible y económicamente factible de eliminación de nitrógeno de las aguas residuales (Corrales et al., 2016).

1.4.1 Nitrificación

En los sistemas de ingeniería, tales como plantas de tratamiento de aguas residuales y los humedales construidos, la nitrificación y desnitrificación acoplada se consideran el principal mecanismo de eliminación de nitrógeno (Wrage et al., 2001; Tourna et al., 2008).

La nitrificación es un proceso aerobio realizado por bacterias amonio oxidantes (AOB por sus siglas en inglés) y nitrito oxidantes (NOB por sus siglas en inglés), Gram-negativas litoautótrofas que pertenecen a la familia *Nitrobacteriaceae*. Estos microorganismos no son esporulados y pueden ser esféricos, bacilares o espirales. Los cultivos nitrificantes

EFFECTO DEL BENZOTRIAZOL EN LOS PROCESOS AMONIO Y NITRITO OXIDANTES DE LA NITRIFICACIÓN.

generalmente tienden a formar estructuras denominadas flóculos, cuya estabilidad depende de la formación de sustancias exopoliméricas (Martinez *et al.*, 1998).

El proceso respiratorio nitrificante se lleva a cabo en dos etapas: 1) la oxidación de amonio como por las AOB a nitrito (amonio oxidación) y 2) la oxidación de nitrito por las NOB a nitrato (nitrito oxidación). En cada una de ellas, participan microorganismos de géneros diferentes, es decir, no se han identificado microorganismos que puedan convertir directamente el amonio a nitrato (Prosser, 1989). La oxidación del amonio se realiza por bacterias de los géneros *Nitrosomonas* y *Nitrosolobus*, entre otros.

En un primer paso, la enzima amonio monooxigenasa (AMO) transforma el amonio en hidroxilamina (NH₂OH), que posteriormente se convierte en nitrito, mediante la enzima hidroxilamina óxido-reductasa (HAO) (Fig 3).

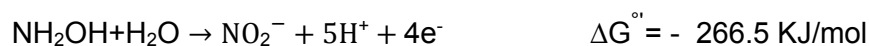
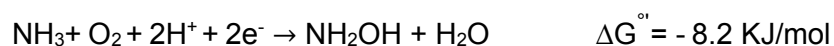


Figura 3. Reacción amonio oxidante en el proceso respiratorio nitrificante.

La enzima AMO es membranar, mientras que la HAO se localiza en el periplasma. La oxidación de la hidroxilamina a nitrito es la reacción que aporta la mayor parte de la energía en el proceso respiratorio amonio oxidante, liberando cuatro electrones, de los cuales dos son usados para la oxidación de amonio por la AMO (Fig 4). Por lo tanto, solamente dos electrones participan en la cadena respiratoria, limitando la generación de energía con valores bajos de energía libre de Gibbs (ΔG°), lo que explica por qué estas bacterias tienen un rendimiento de crecimiento muy bajo (Hooper *et al.*, 1997).

EFFECTO DEL BENZOTRIAZOL EN LOS PROCESOS AMONIO Y NITRITO OXIDANTES DE LA NITRIFICACIÓN.

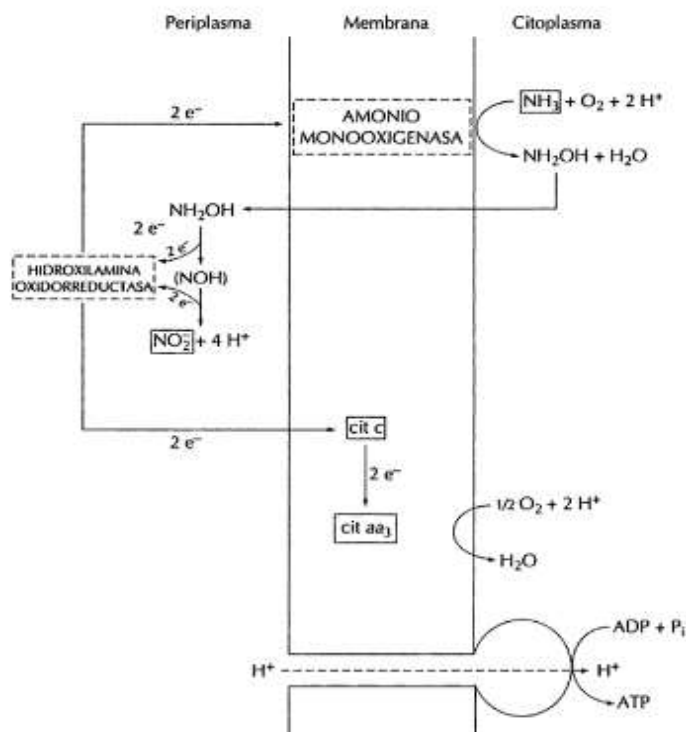


Figura 4. Oxidación de amonio y flujo de electrones (tomado de Farras y Juárez 1997).

La oxidación del nitrito a nitrato la pueden realizar bacterias de los géneros *Nitrobacter* y *Nitrosococcus*, por citar dos ejemplos, mediante la acción de la enzima nitrito óxido-reductasa (NOR) (Figs. 5 y 6).

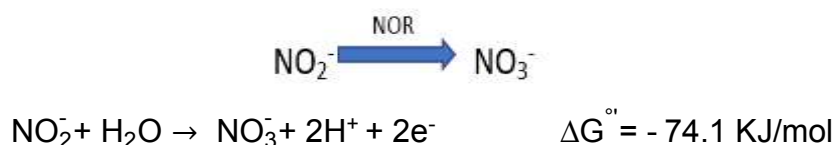


Figura 5. Reacción nitrito oxidante en el proceso respiratorio nitrificante.

Esta enzima es un complejo enzimático formado por el citocromo c, una quinona y una deshidrogenasa dependiente del NADH. Esta reacción implica la generación de un potencial redox de + 430 mV, el cual se emplea en la fosforilación oxidativa y para la reducción del NAD.

Si se comparan los valores de $\Delta G'^{\circ}$ de los procesos de amonio oxidación y nitrito oxidación, se nota que la generación de energía es mayor en el proceso respiratorio amonio oxidante. De esta forma, la disponibilidad energética es más limitada para las NOB que para las AOB.

EFFECTO DEL BENZOTRIAZOL EN LOS PROCESOS AMONIO Y NITRITO OXIDANTES DE LA NITRIFICACIÓN.

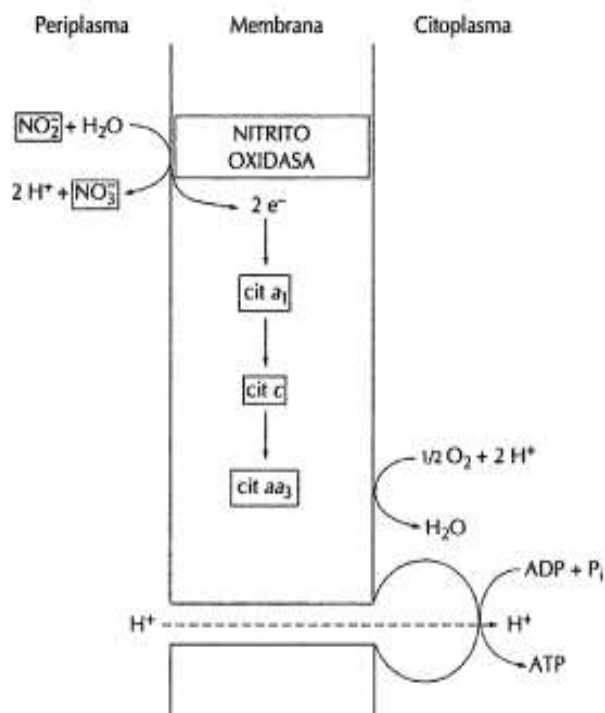


Figura 6. Oxidación de nitrito y flujo de electrones (tomado de Farras y Juárez 1997).

1.4.1.1 Bacterias amonio oxidantes

Las bacterias AOB, *Nitrosomonas* y *Nitrosolobus*, entre otras son un componente esencial en el ciclo del nitrógeno, responsable de la oxidación del amonio a nitrito, con hidroxilamina como producto intermedio, participando en la primera etapa de la nitrificación (Ward, 1986). Las bacterias AOB son quimiolitautotrófas obligadas que utilizan nitrógeno reducido en forma de amonio como fuente de energía, dióxido de carbono como fuente de carbono y oxígeno molecular como aceptor final de electrones, por lo que participan en la primera etapa de la nitrificación (Ward, 1986). Sin embargo, se ha reportado también que estos organismos pueden degradar numerosos compuestos orgánicos (Bock *et al.*, 1986; Hyman y Arp, 1989). Estas AOB quimiolitautotrófas comúnmente pertenecen a las Beta y Gamma-proteobacterias, incluyendo *Nitrosomonas*, *Nitrosospira* y *Nitrosococcus* (Nold *et al.*, 2000; Purkhold *et al.*, 2000). Desde el reconocimiento de las bacterias amonio y nitrito oxidantes, por Percy Faraday y Sergei Winogradsky, hace más de 100 años, sólo las proteobacterias de las subdivisiones Beta y Gamma se consideraron capaces de realizar la oxidación del amonio en aerobiosis (Purkhold *et al.*, 2000). Algunas AOB tienen un metabolismo anaeróbico (Bock *et al.*, 1995; Mulder *et al.*, 1995), lo que se traduce en producción de N_2 (Mulder *et al.*, 1995; Strous *et al.*, 1999).

Las AOB se encuentran, en ambientes naturales y su crecimiento es extremadamente lento, lo que hace que sean difíciles de detectar por los métodos de cultivo microbiológico tradicional (Ward, 1986). En las últimas décadas, se han desarrollado herramientas moleculares independientes de cultivo, fundamentadas en la caracterización del 16S ARNr para identificar AOB, existen varios reportes sobre la diversidad de estas bacterias en hábitats terrestres y marinos (Bothe *et al.*, 2000; Kowalchuk *et al.*, 2000). En estos estudios,

se han observado similitudes elevadas de secuencias parciales de 16S ARNr de AOB en muestras ambientales, lo que sugiere que la fisiología y el fenotipo también se deben considerar para distinguir entre todas las cepas oxidantes del amonio (Stephen *et al.*, 1996; Purkhold *et al.*, 2000). La enzima AMO es exclusiva del grupo de microorganismos integrados en las bacterias oxidantes del amonio (Hyman *et al.*, 1992). Se compone de tres subunidades: amoA, de 27- a 30- kDa, proteína unida a la membrana que contiene el sitio activo de la AMO; amoB, de 38- a 43- kDa, y amoC (Bergmann y Hooper, 1994). Todas las AOB pertenecientes al grupo de proteobacterias estudiadas hasta el momento parecen contener hasta tres copias casi idénticas del operón amo (Norton *et al.*, 1996). La identificación de genes para la AMO también se ha utilizado como marcador en el análisis molecular de bacterias oxidantes de amonio a fin de detectar su presencia en ambientes microbianos particulares (Norton *et al.*, 1996; Rotthauwe *et al.*, 1997).

1.4.1.2 Bacterias nitrito oxidantes

Las bacterias NOB contribuyen en el ciclo del nitrógeno a través de la oxidación del nitrito a nitrato, participando en la segunda etapa de la nitrificación (Ward, 1986). Las NOB son quimiolitautotrófas aerobias que utilizan el nitrito como fuente de energía, dióxido de carbono como fuente de carbono y oxígeno molecular como aceptor final de electrones. Hay cuatro géneros de NOB: *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospira* y *Nitrospina*. Solo el género *Nitrobacter* ha sido sometido a estudios taxonómicos y fisiológicos detallados. Contiene tres especies, *N. winogradskyi*, *N. hamburgensis* y una tercera especie se distingue sobre la base de los valores de % (G + C) y los estudios de hibridación de ADN (Bock *et al.*, 1986). El análisis de los citocromos de los géneros *Nitrosomonas* y *Nitrobacter* sugiere que están relacionados de forma lejana (Wood, 1986) y *Nitrobacter agilis* parece estar más estrechamente relacionado con *Rhodopseudomonas viridis*. Ambos organismos poseen complejos sistemas de membrana intra-citoplásmica que sugieren un fondo evolutivo común.

Una razón para la concentración de estudios sobre el género *Nitrobacter* es la incapacidad de aislar los miembros de otros géneros del suelo. Los géneros *Nitrococcus*, *Nitrospira* y *Nitrospina* generalmente están restringidos a ambientes marinos y crecen de manera óptima a altas concentraciones de sal. Una excepción es una cepa de *Nitrospira* aislada del suelo (Bock *et al.*, 1986). La aplicación de técnicas taxonómicas modernas a las bacterias nitrificantes es obstaculizada, como en los estudios fisiológicos, por las dificultades para obtener suficiente biomasa para los análisis. A pesar de esto, los valores de % (G + C), hibridación de ADN y los análisis de secuencia de ARN están produciendo información importante. *Nitrobacteriaceae* ahora se considera que contiene al menos tres grupos: *Nitrobacter*, oxidantes de nitrito y *Nitrococcus* (Woese *et al.*, 1984).

1.4.2 Factores que afectan la nitrificación

Para que la nitrificación pueda llevarse de manera completa, es decir la oxidación total de amonio hasta nitrato, ésta debe tener condiciones ambientales favorables de pH, oxígeno disuelto y temperatura.

1.4.2.1 Efecto del valor de pH en la nitrificación

Los valores de pH neutro-alcalino se consideran óptimos tanto para la oxidación de amonio como la de nitrito. Holt y col. (1994) reportó que el intervalo adecuado de pH para cultivos puros de AOB es de 5.8-8.5 y un intervalo de 6.5-8.5 para las NOB. La mayoría de los microorganismos nitrificantes tienen un pH óptimo para el crecimiento en el intervalo 7.5-8 y pueden crecer dentro de un intervalo de pH de aproximadamente 2 unidades. *N. europaea* es excepcional con un intervalo de pH para crecimiento de 5.8-8.5, lo que refleja la diversidad de cepas dentro de esta especie.

1.4.2.2 Efecto de la concentración de oxígeno

La nitrificación se describe clásicamente como un proceso aerobio con moléculas de oxígeno requeridas para la oxidación de amonio y para la respiración en ambas etapas, amonio y nitrito oxidación. Los requerimientos estequiométricos indican que se requieren 3.43 mg O₂/mg N-NH₄⁺ oxidado y 1.14 mg O₂/ mg N-NO₂, de tal forma que el requerimiento total es de 4.57 mg O₂/ mg N-Oxidado.

Hanaki et al. (1989) reportaron que, en un reactor completamente mezclado con un inóculo de microorganismos nitrificantes, la eficiencia de consumo de amonio a concentraciones cercanas a 6.0 mg/L de oxígeno disuelto no presentó diferencias comparado con una concentración de 0.5 mg/L de oxígeno disuelto. En contraste, la formación de nitrato disminuyó un 40% a concentraciones de 0.5 mg/L comparado con una concentración de 6.0 mg/L de oxígeno disuelto, indicando que los microorganismos nitrito oxidantes presentan mayor sensibilidad a concentraciones bajas de oxígeno disuelto.

En altas concentraciones, el oxígeno es inhibitorio (*Bernet y col., 2000*). Efectos inhibitorios en unidades de lodo activado a escala de laboratorio se manifestaron a concentraciones altas de oxígeno (*Painter y King, 1976; Charley et al., 1980; Jones y Paskins, 1982*). Sin embargo, esto parece deberse a una reducción de la eliminación de dióxido de carbono que conduce a la reducción del valor del pH. *Jones y Paskins* (1982) también encontraron que las bacterias nitrificantes podrían aclimatare a altas concentraciones de oxígeno, pero no a cambios repentinos de niveles normales a altos.

1.4.2.3 Efecto de la temperatura

Al igual que todos los procesos biológicos, la nitrificación se ve influida por la temperatura. La mayoría de las bacterias nitrificantes son mesófilas y su temperatura óptima de crecimiento está entre 28 y 36°C. Por lo tanto, las velocidades de crecimiento de las bacterias nitrificantes se reducirán con la disminución de las temperaturas. Sin embargo, la nitrificación es posible a temperaturas tan bajas como 5°C. La temperatura también tiene un efecto sobre la velocidad de las reacciones enzimáticas involucradas en el proceso respiratorio. Se sabe que es posible realizar la nitrificación a temperaturas tan bajas como 5°C. Sin embargo, la temperatura ideal para los microorganismos nitrificantes es de 25 a 35°C (*Villalobos y Fereres, 2017*).

1.4.2.4 Efecto de compuestos aromáticos sobre la nitrificación

Se sabe que hay un efecto negativo de la materia orgánica sobre la nitrificación, de tal manera que la estabilidad de los sistemas microbianos nitrificantes en el tratamiento de

EFECTO DEL BENZOTRIAZOL EN LOS PROCESOS AMONIO Y NITRITO OXIDANTES DE LA NITRIFICACIÓN.

aguas residuales puede ser alterada por la presencia de compuestos orgánicos tóxicos e inhibitorios (Schweighofer *et al.*, 1996).

Por otro lado, algunos cultivos nitrificantes han demostrado ser capaces de oxidar una amplia variedad de compuestos orgánicos que van desde compuestos simples como los ácidos grasos volátiles, hasta compuestos aromáticos, fenólicos y halogenados (Nevalainen *et al.*, 1993).

En la Tabla 2, se presentan algunos estudios, en los cuales se puede observar el efecto sobre la nitrificación en presencia de diferentes tipos de compuestos orgánicos y la capacidad de los cultivos para consumirlos.

Tabla 2. Efectos de contaminantes orgánicos en la nitrificación

Compuesto	Concentración (mg/L)	Inóculo	(Disminución) Efecto en la nitrificación	Consumo del compuesto orgánico	Referencia
Trimetilamina	206	Lodos activados nitrificantes	100% en el consumo de amonio	No determinado	Eilersen <i>et al.</i> , (1994)
Tolueno	14	<i>Nitrosomonas europaea</i>	80% en la producción de nitrito	84%	Keener <i>et al.</i> , (1994)
Benceno	10	Consorcio nitrificante	53% en la producción de nitrato	100%	Zepeda <i>et al.</i> , (2003)
Tolueno	5	Consorcio nitrificante	77% en la velocidad específica de consumo de amonio ($q_{NH_4^+}$)	50%	Zepeda <i>et al.</i> , (2007)
2-Clorofenol	5	Consorcio nitrificante	90% en la eficiencia de consumo de amonio 95% en la $q_{NH_4^+}$	100%	Martínez <i>et al.</i> , (2011)
Benzotriazol	10 μ g/g suelo	Suelo	77.8% en el consumo de amonio	No determinado	Puttana <i>et al.</i> , (1999)

Como se puede observar en la Tabla 2, la nitrificación se puede ver alterada a nivel de: eficiencias de consumo amonio, rendimientos de formación de nitrito y nitrato, así como en las velocidades específicas de consumo de amonio.

Los estudios realizados referentes al efecto inhibitorio del benzotriazol sobre la nitrificación son aún muy escasos. Por lo tanto, obtener información fisiológica y cinética del proceso respiratorio nitrificante en presencia de benzotriazol es necesaria para entender mejor el comportamiento de lodos nitrificantes en reactores biológicos alimentados con amonio y benzotriazol.

1.4.3 Efectos inhibitorios en procesos nitrificantes

Los efectos inhibitorios pueden cuantificarse a través de la disminución en las velocidades específicas del proceso biológico, tanto de consumo de sustratos como de formación de

EFFECTO DEL BENZOTRIAZOL EN LOS PROCESOS AMONIO Y NITRITO OXIDANTES DE LA NITRIFICACIÓN.

productos. Se ha reportado que los efectos inhibitorios pueden ser de diferente magnitud en los procesos respiratorios de amonio oxidación y nitrito oxidación, dependiendo del compuesto inhibitorio estudiado (Tabla 3).

Tabla 3. Efectos en cultivos nitrificantes en presencia de diferentes compuestos inhibitorios.

Compuesto	Cultivos con NH ₄ ⁺		Cultivos con NH ₂ OH		Referencia	
	μmol adicionado	% de disminución en NO ₂ ⁻ producido respecto al control sin inhibidor				
Disulfuro de carbono	0.1	77	5		Juliette et al. (1993)	
Dimetil sulfuro	0.5	14	0			
Dimetil disulfuro	0.5	24	0			
Etanotiol	0.5	100	36			
Compuesto	Cultivos con NH ₄ ⁺		Cultivos con NO ₂ ⁻			
	% de disminución en velocidades específicas					
	Conc. (mg/L)	q _{N-NH₄⁺}	q _{N-NO₃⁻}	q _{N-NO₂⁻}		q _{N-NO₃⁻}
2-Clorofenol	2.5	100	100	19	9	Pérez-Alfaro et al. (2013)
	5.0	100	100	0	0	
	10.0	100	100	57	54	
Sulfuro	2.5	36	-	70	-	Bejarano-Ortiz et al. (2015)
	3.5	53	-	80	-	
	5.0	75	-	82	-	

Juliette et al. (1993) evaluó el efecto de diferentes compuestos azufrados en el proceso amonio oxidante utilizando cultivos axénicos de *Nitrosomonas europaea*. Los autores realizaron dos tipos de ensayo, unos cultivos con amonio como sustrato y otros con hidroxilamina como fuente de energía para evaluar la amonio oxidación en sus dos reacciones oxidativas. En este estudio, la inhibición se definió como una disminución en la producción de nitrito respecto a los ensayos control sin compuesto azufrado. De acuerdo con sus resultados, concluyeron que los cuatro compuestos fueron inhibitorios de la oxidación de amonio por *N. europaea*, siendo mayor su efecto sobre la oxidación de amonio que sobre la oxidación de hidroxilamina. Estudios en los que utilizan cultivos axénicos de AOB o NOB, sólo es posible evaluar un proceso respiratorio de la nitrificación, la amonio oxidación o la nitrito oxidación. El uso de consorcios con respiración nitrificante fisiológicamente estable ha permitido estudiar los efectos inhibitorios en los dos procesos respiratorios de la nitrificación. Un ejemplo es el estudio realizado por Pérez-Alfaro et al. (2013) donde se evaluó el efecto del 2-clorofenol en cultivos en lote utilizando un lodo nitrificante. Se utilizó amonio como fuente de energía para evaluar los efectos inhibitorios del 2-clorofenol sobre la amonio oxidación y nitrito como fuente de energía para evaluar la inhibición sobre la nitrito oxidación. Los autores encontraron que el 2-clorofenol inhibió en un 100% la amonio oxidación a todas las concentraciones iniciales ensayadas mientras que la inhibición de la nitrito oxidación fue significativamente menor. Otro estudio en lote con lodo nitrificante fue realizado por Bejarano-Ortiz et al. (2015) para evaluar el efecto del sulfuro sobre la nitrificación. De la misma manera, los autores evaluaron las dos etapas de

la nitrificación a través de cultivos en lote por separado con amonio o nitrito como única fuente de energía. Observaron que el sulfuro provocó efectos inhibitorios mayores en la nitrito oxidación que en la amonio oxidación, reduciéndose más la velocidad de consumo de nitrito que la velocidad de consumo de amonio en sus ensayos respectivos.

De acuerdo con estos antecedentes, la nitrificación no debe ser estudiada como un proceso de una sola vía, sino como dos procesos respiratorios que pueden ser inhibidos en diferente grado ante la presencia de diferentes compuestos. Otro aspecto importante es que pocos trabajos se enfocan al estudio de las dos reacciones involucradas en la amonio oxidación: la oxidación del amonio a hidroxilamina por la AMO y la oxidación de la hidroxilamina a nitrito por la HAO y no se da seguimiento a la acumulación de hidroxilamina. El conocer el grado de inhibición en los diferentes procesos oxidativos de la nitrificación podría ser útil en el tratamiento de aguas residuales ya que, en función de los efectos inhibitorios, se puede propiciar la acumulación de amonio, hidroxilamina y/o nitrito.

2 Justificación

La falta de cultura por el cuidado del medio ambiente, el desarrollo de un gran número de industrias, así como el crecimiento poblacional descontrolado favorecen día a día el deterioro del medio ambiente. La descarga de aguas residuales se ha convertido en un problema de la vida cotidiana por el contenido en contaminantes de las mismas, principalmente por materia orgánica, compuestos nitrogenados, azufrados, fosforados, así como metales pesados, convirtiéndose en una emergencia ambiental.

La presencia de compuestos orgánicos emergentes en aguas residuales es cada vez más común, pero se desconoce el efecto que pudiesen tener en los procesos biológicos utilizados para el tratamiento de aguas residuales. La nitrificación es uno de los procesos biológicos del ciclo del nitrógeno ampliamente usado para la eliminación de amonio de aguas residuales a través de su oxidación a nitrito por el proceso respiratorio amonio oxidante y la posterior oxidación del nitrito a nitrato por el proceso respiratorio nitrito oxidante. En el tratamiento de aguas residuales, la nitrificación acoplada a la desnitrificación permite la conversión del amonio a nitrógeno molecular. Sin embargo, está ampliamente documentado que el proceso nitrificante es sensible a la presencia de compuestos orgánicos, los cuales pueden alterar su eficiencia, rendimiento y provocar efectos inhibitorios que ralentizan el proceso y favorecen la acumulación de amonio o nitrito.

El benzotriazol es uno de los EOCs detectado en efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales. Sin embargo, se desconoce su efecto en la eliminación de amonio de las aguas residuales por nitrificación, así como el papel que puedan tener los lodos nitrificantes en su eliminación. Además, aún no se cuenta con suficiente información de los posibles efectos fisiológicos e inhibitorios del benzotriazol en cada una de las etapas de oxidación de la nitrificación. Por todo lo anterior, es necesario generar más conocimiento al respecto para entender mejor cómo la presencia de EOCs como el benzotriazol en el agua pueda alterar el proceso nitrificante en el tratamiento de aguas.

3 Hipótesis

La presencia de benzotriazol tendrá efectos fisiológicos e inhibitorios de diferente magnitud en los procesos amonio y nitrito oxidantes de la nitrificación.

4 Objetivo

- ✓ Evaluar la capacidad metabólica de un lodo nitrificante para realizar la oxidación de amonio a nitrato en presencia de benzotriazol.

4.1 Objetivos particulares

- ✓ Evaluar los efectos fisiológicos e inhibitorios del benzotriazol sobre los procesos amonio y nitrito oxidantes de la nitrificación.
- ✓ Evaluar la biotransformación del benzotriazol en el proceso de la nitrificación

5 Metodología

5.1 Reactor nitrificante en continuo

Para los ensayos realizados en lote se requirió de biomasa con actividad nitrificante fisiológicamente estable, de tal forma que el inóculo utilizado se tomó de un reactor en estado semicontinuo de tanque agitado en régimen estacionario (Microferm Fermentor, New Brunswick Scientific, mod. MF-114) con un volumen nominal de 10 L y un volumen de operación de 6 L (Fig. 7). Se operó con una agitación de 300 rpm, un tiempo de residencia hidráulico de 3.2 d y una concentración de oxígeno disuelto promedio de 5.4 ± 0.1 mg/L. El reactor fue operado a temperatura ambiente, mientras que el pH se mantuvo a un valor promedio de 7.7 ± 0.3 y fue ajustado con soluciones de ácido clorhídrico (HCl) o hidróxido de sodio (NaOH). El reactor fue alimentado con una fuente de nitrógeno y otra de carbono como se describe en la Tabla 4. La velocidad de carga de nitrógeno de amonio fue de 60.3 ± 1.1 mg/Ld, mientras que la velocidad de carga de carbono de bicarbonato fue de 192.96 ± 1.8 mg/Ld, dando una relación C/N de 3.2. El reactor fue acoplado a un sedimentador donde se concentra la biomasa nitrificante y parte de ella fue recirculada al tanque agitado de tal manera que la concentración en biomasa dentro del reactor permaneció a una concentración de 400.0 ± 25.2 mg/L de proteína microbiana. Durante todo el periodo del estudio en ensayos en lote, se evaluó constantemente el comportamiento fisiológico del lodo del reactor semicontinuo, para asegurar que la actividad nitrificante fuera completa y se encontrara en estado estacionario.

Tabla 4. Composición del medio de cultivo para alimentar el reactor nitrificante.

Fuente de nitrógeno Composición de sales	Concentración (g/L)	Fuente de carbono Composición de sales	Concentración (g/L)
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.5	NaHCO ₃	14
NH ₄ Cl	1.2	CaCl ₂	0.04
KH ₂ PO ₄	2.4		
MgSO ₄	0.5		
NaCl	0.8		

EFECTO DEL BENZOTRIAZOL EN LOS PROCESOS AMONIO Y NITRITO OXIDANTES DE LA NITRIFICACIÓN.



Figura 7. Reactor en continuo con biomasa nitrificante.

5.2 Cultivos en lote

Todos los cultivos en lote se realizaron en botellas serológicas de volumen nominal de 160 mL y un volumen de trabajo de 100 mL. Se realizaron cuatro series de cultivos: 1) ensayo control sin Bt en presencia de amonio (100 mg N-NH₄⁺/L) como fuente de energía para evaluar el proceso respiratorio de amonio oxidación, 2) ensayo control sin Bt en presencia de nitrito (100 mg N-NO₂⁻/L) para evaluar el proceso respiratorio de nitrito oxidación, 3) ensayo con amonio (100 mg N-NH₄⁺/L) como fuente de energía con adición de Bt a concentraciones iniciales de Bt de 0.1, 0.3, 2.5, 5.0 y 10.0 mg/L, 4) ensayo con nitrito (100 mg N-NO₂⁻/L) como fuente de energía con adición de Bt a concentraciones iniciales de 0.1, 0.3, 2.5, 5.0 y 10.0 mg/L. Se agregaron 250 ± 2 mg/L de biomasa como proteína microbiana en cada botella además del medio de cultivo descrito en la Tabla 5. Se pasó un flujo de oxígeno puro (99% de pureza) al medio de cultivo durante 3 minutos y posteriormente al espacio de cabeza con el mismo tiempo. Finalmente, las botellas fueron selladas y colocadas en incubación a 30°C con agitación constante a 300 rpm como se muestra en la Fig. 8.

Tabla 5. Composición del medio de cultivo.

Fuente de nitrógeno Composición de sales	Concentración (g/L)	Fuente de carbono Composición de sales	Concentración (g/L)
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.5	NaHCO ₃	12
NH ₄ Cl	1.2	CaCl ₂	0.03
KH ₂ PO ₄	2.4		
MgSO ₄	0.5		
NaCl	0.8		

EFECTO DEL BENZOTRIAZOL EN LOS PROCESOS AMONIO Y NITRITO OXIDANTES DE LA NITRIFICACIÓN.



Figura 8. Adición de oxígeno a botellas serológicas y posterior incubación.

Se recolectaron muestras independientes de las botellas serológicas en los tiempos de 15, 30 y 45 min durante la primera hora y cada hora a partir de la segunda hora, hasta completar 10 horas de ensayo. Las muestras fueron filtradas a $0.45\ \mu\text{m}$ y almacenadas un tiempo menor a 2 días en refrigeración.

5.3.1 Métodos analíticos

Para evaluar el efecto del benzotriazol sobre las diferentes variables de respuesta de los procesos respiratorios de la amonio y nitrito oxidación, así como su consumo por el lodo nitrificante, fue necesario el uso de técnicas analíticas que permitieran determinar las concentraciones de amonio, hidroxilamina, nitrito, nitrato, Bt y proteína microbiana.

5.3.1 Cuantificación de amonio (Electrodo selectivo)

Para cuantificar el amonio, se utilizó un electrodo selectivo de amoniaco (Phoenix electrode Co). Se construyó una curva de calibración con cinco concentraciones conocidas de NH_4Cl : 2, 10, 50, 100 y 120 mg $\text{N-NH}_4^+/\text{L}$, a partir de la cual se determinó la concentración de amonio en las muestras (Fig. 9). La lectura del potencial generado por el electrodo se registró con un potenciómetro (Cole-Parmer). Se tomó un volumen de muestra de 50 mL y se alcalinizó con 0.5 mL de solución de NaOH (10N) para desprotonar el ion amonio formándose el amoniaco. Bajo agitación constante y temperatura ambiente, se tomó la lectura del potencial cuando fue estable (aproximadamente 5 minutos después de agregar la solución de NaOH).

EFFECTO DEL BENZOTRIAZOL EN LOS PROCESOS AMONIO Y NITRITO OXIDANTES DE LA NITRIFICACIÓN.

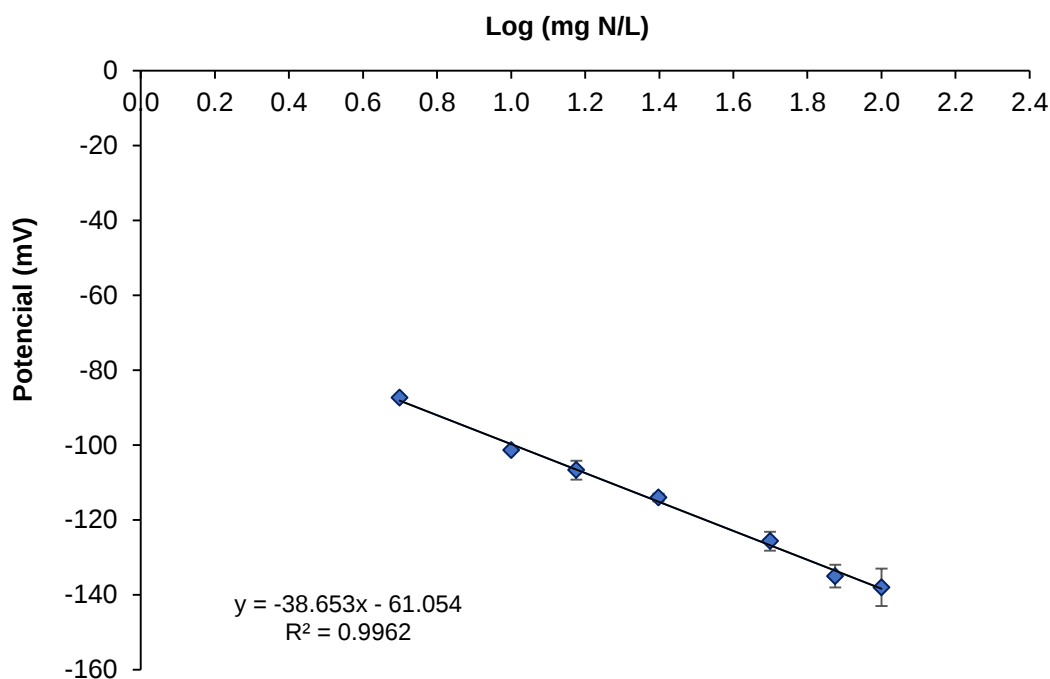


Figura 9. Curva de calibración de amonio por electrodo selectivo.

5.3.2 Cuantificación de hidroxilamina

Para la cuantificación de hidroxilamina por espectrofotometría se prepararon las siguientes soluciones:

- Solución de 8-quinolinol (1%). Disolver 1 g de 8-quinolinol en 100 mL de alcohol etílico absoluto.
- Solución de Na_2CO_3 1M. Disolver 10.6 g de Na_2CO_3 por cada 100 mL de agua destilada.
- Solución de ácido tricloroacético (12%). Disolver 12 g de CCl_3COOH en 100 mL de agua destilada.
- Solución buffer de fosfato (pH 6.8). Ajustar el pH de una solución de fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4) 0.05 M a pH 6.8 con una solución de fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4) 0.05 M.

Una vez preparadas las soluciones se elaboró una curva de calibración a partir de la cual se pudo medir NH_2OH a concentraciones de 0 a 1.8 mg/L

Posteriormente, se adicionó 1 mL de la solución de carbonato y se agitó vigorosamente.

Se calentaron los tubos de ensaye en baño María durante 1 min a 90°C . Después se dejó enfriar a temperatura ambiente (30 min) y se midió la absorbancia a 705 nm.

EFFECTO DEL BENZOTRIAZOL EN LOS PROCESOS AMONIO Y NITRITO OXIDANTES DE LA NITRIFICACIÓN.

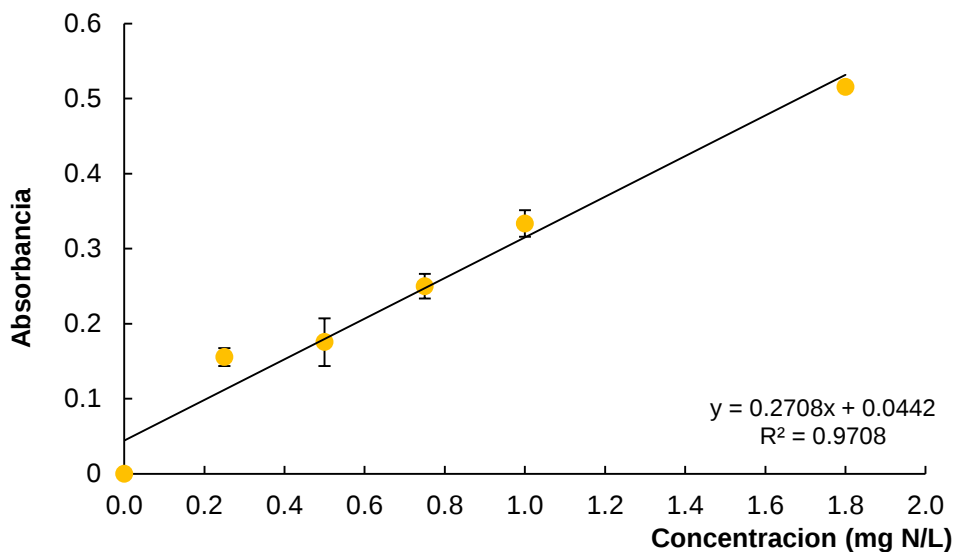


Figura 10. Curva de calibración de hidroxilamina por espectrofotometría.

5.3.3 Cuantificación de nitrito y nitrato (HPLC)

Para la cuantificación de nitrito y nitrato, se utilizó un cromatógrafo de líquidos (HPLC, Perkin Elmer serie 200) con una columna de intercambio iónico (Waters IC-Pak Anion HC, 4.6 x 150 mm) y un detector UV-visible. La longitud de onda fue de 214 nm y el flujo de la fase móvil de 2 mL/min. La fase móvil consistió en una mezcla de butanol, acetonitrilo y una solución concentrada de borato-gluconato (20:120:20, v:v:v) diluidos con agua desionizada a un volumen de 1 L. La solución borato-gluconato fue preparada con 16 g de gluconato de sodio, 18 g de ácido bórico, 25 g de tetraborato decahidratado de sodio, 250 mL de glicerol y llevados a 1 L con agua desionizada. Se construyó una curva de calibración con soluciones estándares de N-NO_2^- y N-NO_3^- a las concentraciones de: 0, 2.5, 5, 10, 25, 50, 75 y 100 mg N/L (Figs. 11 y 12).

EFFECTO DEL BENZOTRIAZOL EN LOS PROCESOS AMONIO Y NITRITO OXIDANTES DE LA NITRIFICACIÓN.

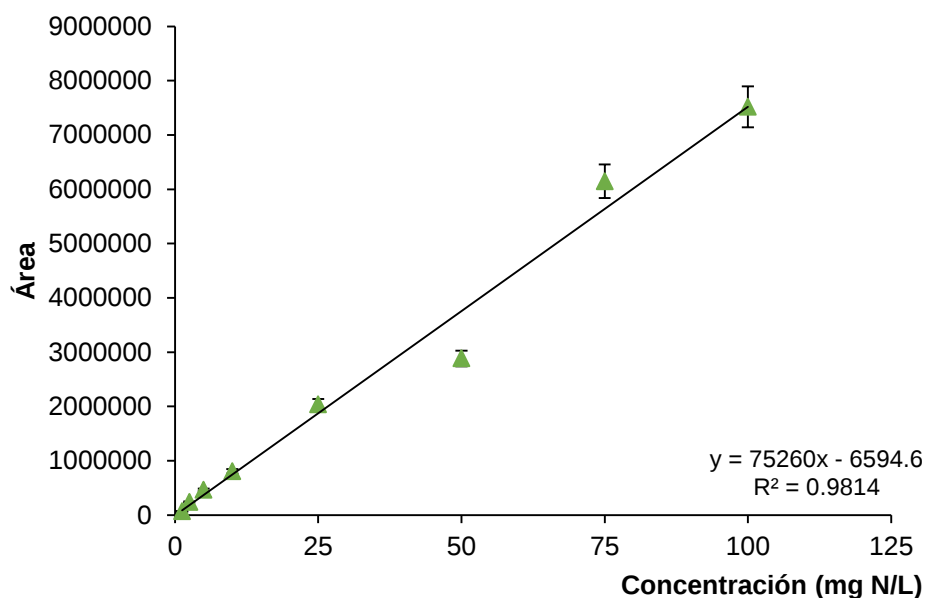


Figura 11. Curva de calibración de nitrito por HPLC.

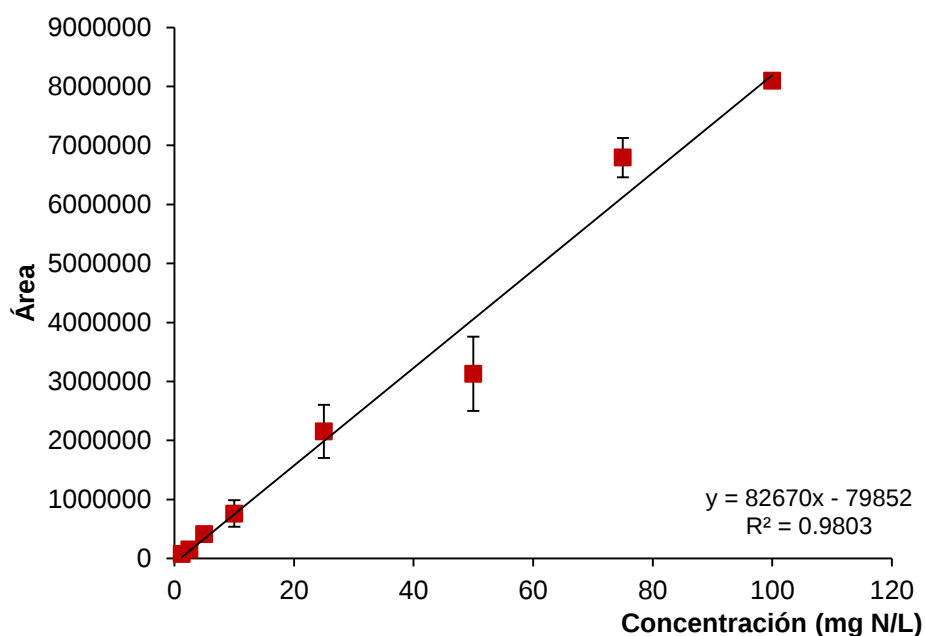


Figura 12. Curva de calibración de nitrato por HPLC.

5.3.4 Cuantificación de nitrito y nitrato (Electroforesis capilar)

La electroforesis capilar se basa en la migración de los iones en solución bajo la influencia de un campo eléctrico, hacia el electrodo con la carga opuesta a ellos. La fuerza conductora de una partícula está relacionada con su carga y la intensidad del campo eléctrico aplicado, así como con la composición del electrolito, el cual funciona como el medio de separación que proporciona una resistencia (Weinberger, 1993). El equipo utilizado fue un analizador

EFECTO DEL BENZOTRIAZOL EN LOS PROCESOS AMONIO Y NITRITO OXIDANTES DE LA

 NITRIFICACIÓN.

capilar de iones (CIA, Beckman Coulter) con un detector UV (arreglo de diodos) y se trabajó a una longitud de onda de 240 nm. Las condiciones de operación fueron: voltaje de 12 KV, tiempo de corrida de 5 min y temperatura de 25°C. El capilar utilizado tiene un recubrimiento de sílica fundida de 60 cm de largo y 75 µm de diámetro interno. El electrolito se preparó tomando 5 mL de las siguientes soluciones: sulfato de sodio anhidro (0.1 M), cloruro de sodio (10 mM) y CIA Pak OFM anion-BT (Waters), finalmente se llevó a un volumen de 50 mL con agua desionizada. Las muestras fueron filtradas por una membrana de nylon (0.20 µm) y se realizaron diluciones para que las muestras no superen las concentraciones de 100 mg N/L al momento de ser analizadas. Para comprobar la linealidad del método, se construyeron curvas de calibración (0 a 100 mg N/L). Las Figs. 13 y 14 son un ejemplo de éstas.

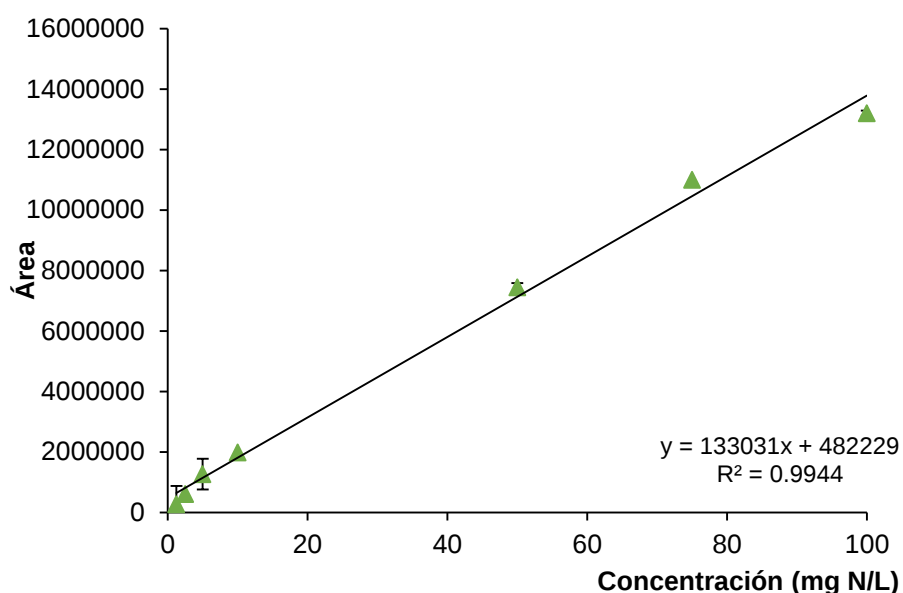


Figura 13. Curva de calibración de nitrito por electroforesis capilar.

EFFECTO DEL BENZOTRIAZOL EN LOS PROCESOS AMONIO Y NITRITO OXIDANTES DE LA NITRIFICACIÓN.

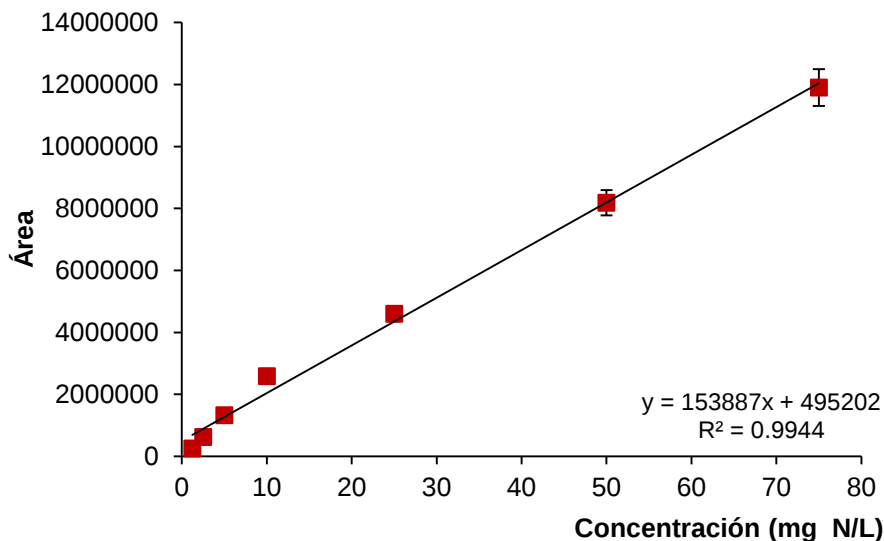


Figura 14. Curva de calibración de nitrato por electroforesis capilar.

5.3.5 Cuantificación de benzotriazol (HPLC)

Para la cuantificación del Bt se utilizó cromatografía de líquidos (HPLC, Perkin Elmer serie 200). La separación de los compuestos aromáticos está determinada por la fuerza de las interacciones con la fase estacionaria que forma parte de la columna de separación, así como por la composición de la fase móvil. Se utilizó un cromatógrafo de líquidos empleando una columna C18 (Phenomenex). El equipo cuenta con un detector UV/VIS y se fijó la longitud de onda a 274 nm. La fase móvil fue una mezcla de metanol y agua (60:40 v/v) y se trabajó a un flujo de 1.0 mL/min. El tiempo de corrida fue de 5 min. Las muestras fueron filtradas con una membrana de 0.2 μ m y colocadas en viales para su análisis. La Fig. 15 muestra un ejemplo de las curvas de calibración (0 a 11 mg/L de Bt) para la cuantificación de benzotriazol.

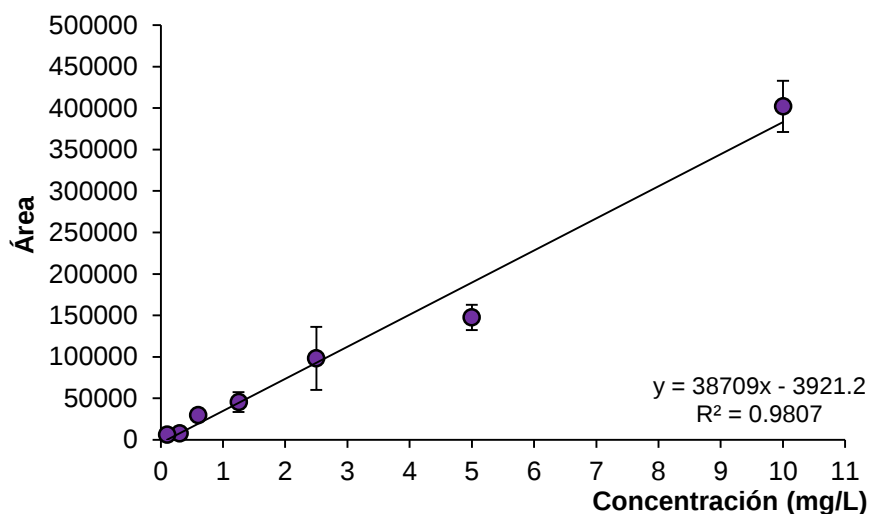


Figura 15. Curva de calibración de benzotriazol por HPLC.

5.3.6 Determinación de proteína microbiana

El método colorimétrico de Lowry modificado (Lowry y col., 1951; Martínez y col., 2000) fue utilizado para determinar la concentración de proteína microbiana en el reactor y en los ensayos en lote. El método se basa en la reacción para formar un complejo Cu-proteína y la posterior reducción de este complejo por el reactivo de Folin-Ciocalteu, donde se obtiene un color azul en un ambiente alcalino (pH de 10). El reactivo de Folin-Ciocalteu (Hycel) está formado por molibdato, fosfato y tungstato de sodio y produce un máximo de absorción a 750 nm. Esta técnica requiere de proteínas que contengan péptidos con grupos fenólicos que puedan enlazarse con el Cu^{2+} . Para cada serie de muestras analizadas, se preparó una curva de calibración de albúmina (Sigma, 96-99%) de 0 a 500 mg/L. Las muestras y los estándares recibieron el mismo tratamiento. Se tomó 1 mL de muestra y se colocó en tubos de ensaye con tapa de rosca de 10 mL. Se adicionó 0.1 mL de NaOH (10 N). Posterior a la agitación mediante un vortex, se calentaron los tubos por 20 min a 90°C. Se necesitaron tres soluciones: (a) Na_2CO_3 0.19 M en NaOH 0.1N, (b) CuSO_4 al 1% y (c) tartrato de sodio y potasio al 2%. Las soluciones (a) y (b) fueron utilizadas para formar una solución básica y una posterior reacción con el cobre, la solución (c) mantiene estable el ion cobre de la solución. Se agregó 1 mL de las soluciones b y c, aforando a 50 mL con la solución a, formando la solución ABC, agregando 5 mL de esta última a cada tubo. Los tubos se agitaron y posteriormente se dejaron reposar los tubos por 30 min en la oscuridad. Posteriormente, se agregó 1 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu, dejando reposar nuevamente en la oscuridad por 1 h, para finalmente medir la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro UV/VIS (Shimadzu, mod. UV-1601). La Fig. 16 muestra un ejemplo de las curvas de calibración obtenidas.

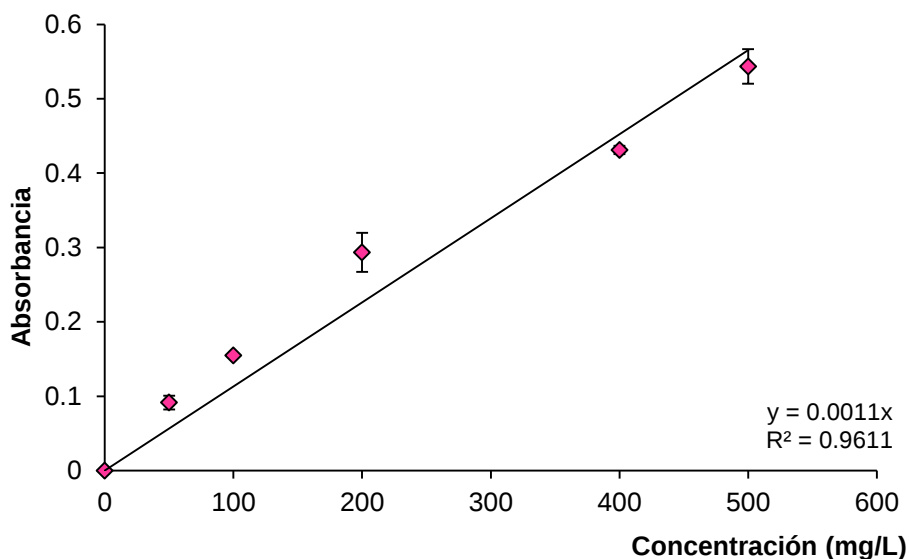


Figura 16. Curva de calibración de proteína microbiana por el método de Lowry.

5.3.7 Determinación de pH y oxígeno disuelto (Electrodo selectivo)

El oxígeno disuelto fue cuantificado mediante un medidor de oxígeno disuelto (Hanna, HI 98186) con un electrodo polarográfico (HI76407/4F). Este equipo tiene integrado un sensor de temperatura y un barómetro que compensa automáticamente las lecturas de oxígeno disuelto. El valor de pH fue determinado mediante un medidor portátil (Digi-Sense, Cole Palmer) acoplado a un electrodo.

5.3.8 Resumen de los métodos analíticos

Se realizaron los diferentes métodos analíticos obteniendo de cada uno de ellos curvas de calibración que permitieron obtener los resultados presentados en la Tabla 6.

Tabla 6. Valores de coeficiente de determinación (R^2), pendientes (m) y coeficientes de variación en las pendientes (CV) obtenidos de las curvas de calibración de los diferentes métodos analíticos.

COMPUESTO	R^2	M	CV (%)
NH_4^+	0.988 ± 0.001	-53.76 ± 3.63	6.8
Hidroxilamina	0.970 ± 0.051	0.2708 ± 1.23	2.6
NO_2^- (HPLC)	0.977 ± 0.014	62122 ± 8.48	0.1
NO_3^- (HPLC)	0.963 ± 0.018	65283 ± 8.3	1.0
NO_2^- (CIA)	0.925 ± 0.022	635 ± 7.07	1.1
NO_3^- (CIA)	0.977 ± 0.032	1216 ± 5.65	0.4
Bt	0.982 ± 0.007	63128 ± 2.82	0.1
Proteína microbiana	0.958 ± 0.039	564.5 ± 3.53	0.6

Se observa que todos los métodos descritos tuvieron valores de R^2 mayores a 0.9 y coeficientes de variación respecto a la pendiente menores a 6.8%, de tal manera, se puede concluir que los métodos utilizados fueron precisos, lineales y reproducibles.

5.4 Variables de respuesta

A continuación, se presentan las variables de respuesta utilizadas en este trabajo para evaluar el comportamiento fisiológico y cinético de los procesos amonio y nitrito oxidantes.

5.4.1 Eficiencia

El consumo de un sustrato tiene dos rutas metabólicas posibles, puede ser utilizado para procesos asimilativos (formación de componentes celulares) o desasimilativos (formación de productos asociada a la formación de energía). La eficiencia se define como la relación entre el sustrato consumido e inicial, de manera que este valor nos permite saber el consumo de un componente a nivel de porcentaje. En este trabajo, se determinó la eficiencia de consumo de amonio ($E_{N-NH_4^+}$) en los ensayos con amonio como fuente de

energía y la eficiencia de consumo de nitrito ($E_{N-NO_2^-}$) en los ensayos con nitrito como fuente de energía.

$$\text{Eficiencia de consumo} = \left(\frac{[\text{Sustrato inicial}] - [\text{Sustrato final}]}{[\text{Sustrato inicial}]} \right) (100)$$

5.4.2 Rendimiento

La formación de un producto a partir de un sustrato consumido se define como rendimiento, esta variable es la que indica el tipo de ruta metabólica (asimilativa o desasimilativa) que puede seguir el consumo de sustrato en un proceso biológico. Matemáticamente expresa la relación entre el producto formado y el sustrato consumido. En este trabajo, se determinaron los rendimientos de nitrato a partir de amonio consumido ($Y_{N-NO_3^-/N-NH_4^+}$), el rendimiento de nitrito a partir de amonio consumido ($Y_{N-NO_2^-/N-NH_4^+}$) en los ensayos con amonio y el rendimiento de nitrato a partir de nitrito consumido ($Y_{N-NO_3^-/N-NO_2^-}$) en los ensayos con nitrito.

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{mg Producto formado}}{\text{mg Sustrato consumido}}$$

5.4.3 Velocidad volumétrica y específica

La velocidad de carga (Q_e) con la que un sustrato ingresa a un reactor en régimen continuo y las velocidades de descarga (Q_s) del sustrato residual y de los productos formados son velocidades volumétricas que permiten evaluar el estado fisiológico en el que se encuentra la biomasa contenida en el reactor. En este estudio, se determinaron las velocidades de carga y descarga de amonio, así como las velocidades de descarga de nitrito, nitrato y biomasa del reactor nitrificante en continuo, esto para establecer el balance de nitrógeno y evaluar la actividad nitrificante del lodo.

$$Q = \frac{\text{mg sustrato entrada/salida}}{\text{Volumen} \times \text{tiempo}}$$

La velocidad específica de consumo de sustrato o formación de producto se relaciona a una cantidad de biomasa, caracterizando el comportamiento cinético de un proceso biológico bajo diferentes condiciones experimentales (en ausencia o presencia de un compuesto inhibitorio), además de que indica el grado de inhibición del proceso.

$$q = \frac{\text{mg consumido o producido}}{\text{mg proteína microbiana tiempo}}$$

En este trabajo, se calcularon las velocidades volumétricas y específicas de consumo de amonio ($q_{N-NH_4^+}$) y producción de nitrato ($q_{N-NO_3^-}$) en los ensayos con amonio y las velocidades de consumo de nitrito ($q_{N-NO_2^-}$) y formación a nitrato en los ensayos con nitrito. Las velocidades volumétricas de consumo y producción se determinaron mediante regresión lineal ($r^2 \geq 0.901$) analizando los cambios en las pendientes, a partir de los perfiles

cinéticos de consumo de N-NH_4^+ y N-NO_2^- y de formación de N-NO_3^- para los ensayos control y a diferentes concentraciones de Bt. Las velocidades específicas se calcularon dividiendo los valores de velocidades volumétricas por la concentración en biomasa como proteína microbiana.

5.5 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en los cultivos en lote fueron analizados estadísticamente con un ANOVA de un factor con un valor $p=0.01$, para determinar si existieron diferencias significativas entre los valores de las variables de respuesta utilizadas en este estudio a las diferentes concentraciones de Bt evaluadas, así como una prueba de Tukey para entender cuáles valores de eficiencias y rendimientos son diferentes con respecto al cultivo control y las diferentes concentraciones de Bt estimadas con un $\alpha=0.05$. Así como también, las posibles diferencias en las velocidades específicas, las cuales fueron analizadas mediante la prueba de homogeneidad de coeficientes. Todos los análisis ser llevaron a cabo utilizando el programa IBM SPSS Statistics 24. (Apéndices I y II).

6 Resultados y discusión

Para poder desarrollar este trabajo, se utilizó un reactor en continuo como fuente de biomasa con actividad nitrificante, con la cual se realizaron los ensayos en lote.

6.1 Reactor nitrificante en continuo

Se operó un reactor semicontinuo con el fin de obtener un inóculo con actividad nitrificante en estado estacionario. A continuación, se presentan en la Fig. 17 y la Tabla 7, las velocidades volumétricas de amonio a la entrada ($Q_{\text{E-NH}_4^+}$) y salida ($Q_{\text{S-NH}_4^+}$), además de las velocidades volumétricas de producción de nitrito ($Q_{\text{S-NO}_2^-}$) y nitrato ($Q_{\text{S-NO}_3^-}$), obtenidas en el reactor nitrificante en semicontinuo durante un tiempo de 15 días. A lo largo de la experimentación, los perfiles de las velocidades volumétricas y el balance de nitrógeno fueron similares a los resultados presentados en la Fig. 17 y la Tabla 7. El reactor fue alimentado con una velocidad $Q_{\text{E-NH}_4^+}$ de 60.3 ± 1.1 mg N/Ld, mientras que la de descarga $Q_{\text{S-NH}_4^+}$ fue de cero. Por otra parte, la $Q_{\text{S-NO}_3^-}$ fue de 58.2 ± 1.1 mg N/Ld. Finalmente, la velocidad de formación de nitrito $Q_{\text{S-NO}_2^-}$ no fue significativa. Se puede observar que la velocidad de descarga de $Q_{\text{S-NO}_3^-}$ se mantuvo constante a través del tiempo, teniendo un coeficiente de variación de 2%, indicando que el cultivo nitrificante alcanzó el régimen estacionario.

EFFECTO DEL BENZOTRIAZOL EN LOS PROCESOS AMONIO Y NITRITO OXIDANTES DE LA NITRIFICACIÓN.

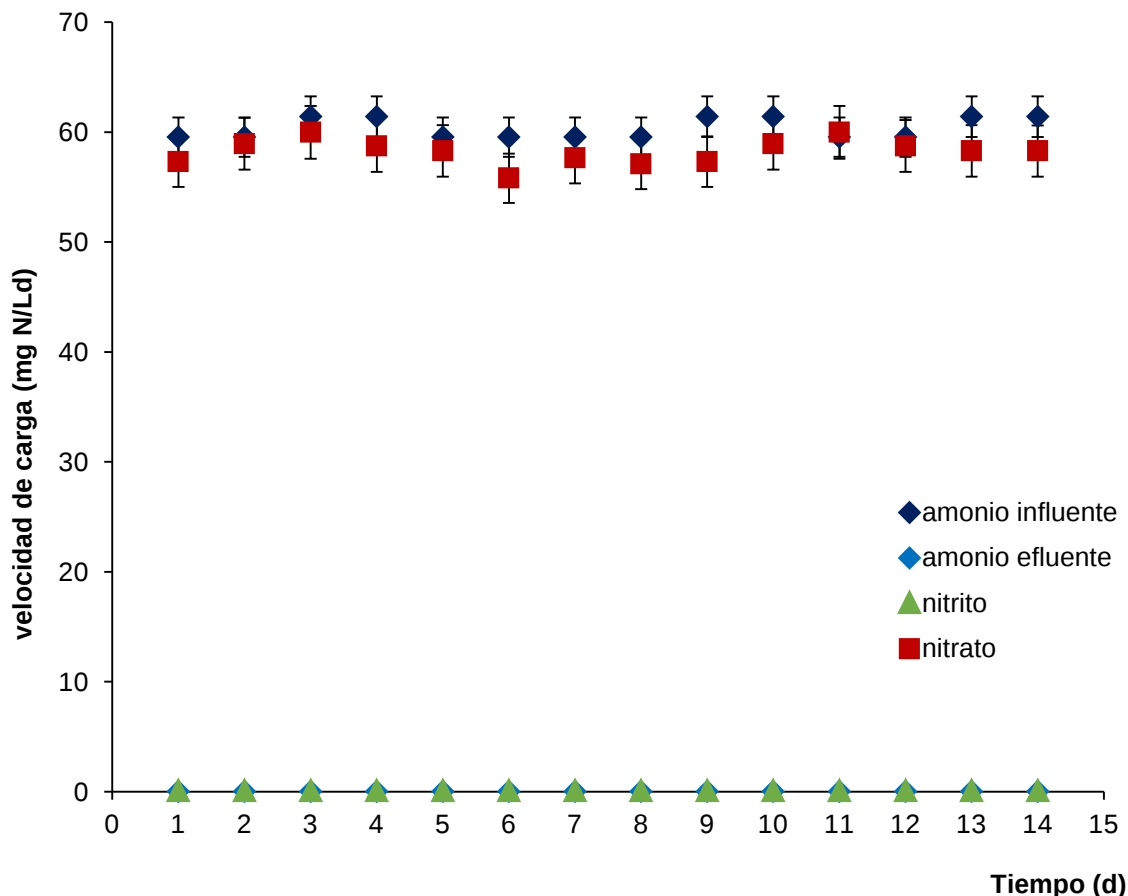


Figura 17. Perfil de la actividad nitrificante en el reactor.

Tabla 7. Balance de nitrógeno en el reactor nitrificante en continuo.

$Q_{N-NH_4^+}$ (mg N/Ld)	$Q_{N-NH_4^+}$ (mg N/Ld)	$Q_{N-NO_2^-}$ (mg N/Ld)	$Q_{N-NO_3^-}$ (mg N/Ld)	$Q_{N-Biomasa}$ (mg N/Ld)
60.3 ± 1.1	0	0	58.2 ± 1.1	1.6 ± 0.1

Bajo estas condiciones, la $E_{N-NH_4^+}$ fue de $99.9\% \pm 0.1$ y el $Y_{N-NO_3^-/N-NH_4^+}$ de 0.97 ± 0.02 . Se encontró que el rendimiento de producción de proteína microbiana ($Y_{Biomasa}$) fue de 0.03 ± 0.01 mg N-proteína/mg N- NH_4^+ consumido. Los altos rendimientos de formación de nitrato, así como el bajo rendimiento de formación de biomasa indicaron que el proceso nitrificante fue netamente desasimilativo. Cabe mencionar que la obtención de energía que puede alcanzar el proceso nitrificante tiene un máximo de -348.8 kJ/mol (Beristain-Cardoso et al., 2009).

El valor promedio de pH fue 7.7 ± 0.3 , siendo el bicarbonato de sodio un componente del medio que actuó como un amortiguador.

El lodo nitrificante del reactor en continuo pudo utilizarse para inocular los ensayos en lote manteniendo eficiencias altas de consumo de amonio, así como altos rendimientos de formación de nitrato.

6.2 Cultivos con amonio como fuente de energía

En los cultivos en lote con amonio como única fuente de energía ($100 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{L}$), se evaluó el proceso respiratorio amonio oxidante del lodo a través de la obtención de los perfiles de consumo de amonio y la formación de de hidroxilamina. Se dio también seguimiento a la acumulación transitoria de nitrito, producto de la hidroxilamina oxidación y sustrato de la nitrito oxidación. En estos ensayos, la nitrito oxidación se evaluó también a través de la producción de nitrato en los cultivos nitrificantes. Las variables de respuesta utilizadas para el análisis de los resultados fueron la $E_{\text{N-NH}_4^+}$ y $q_{\text{N-NH}_4^+}$, los rendimientos de $Y_{\text{N-NO}_2^-/\text{N-NH}_4^+}$ y $Y_{\text{N-NO}_3^-/\text{N-NH}_4^+}$, así como la $q_{\text{N-NO}_3^-}$. Se usaron diferentes pruebas estadísticas para la comparación de las variables obtenidas tanto en los ensayos control en ausencia de Bt como en los ensayos en presencia de diferentes concentraciones iniciales de Bt.

6.2.1 Consumo de amonio

La Fig. 18 presenta los perfiles de consumo de amonio en ausencia de Bt (ensayo control) y en presencia de diferentes concentraciones iniciales de Bt (0.1 - 10.0 mg/L). En el ensayo control sin Bt, se puede observar que los $100 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{L}$ agregados al inicio del ensayo fueron consumidos totalmente en un tiempo de 8 horas. Los ensayos con concentraciones de 0.1 y 0.3 mg/L de Bt mantuvieron un comportamiento similar a los ensayos control, debido a que el consumo total de amonio fue en un tiempo de 7-8 horas. Los ensayos con concentraciones desde 2.5 a 10 mg/L de Bt no presentaron un consumo total de amonio a lo largo de las 10 horas, existiendo un residual de hasta $23 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{L}$.

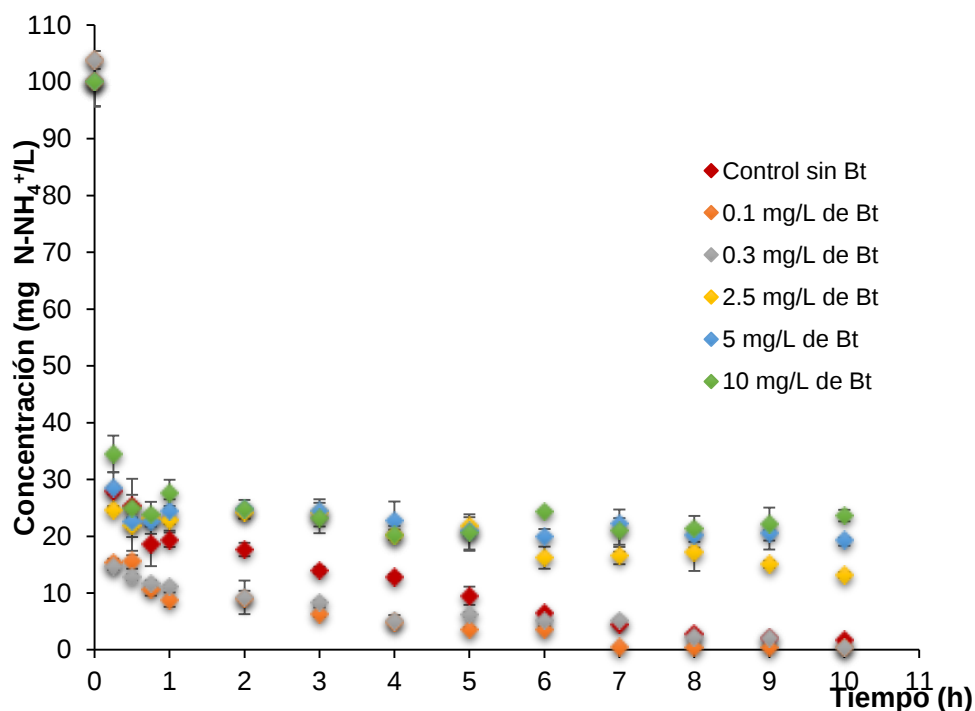


Figura 18. Consumo de amonio a diferentes concentraciones iniciales de Bt.

En la Tabla 8, se resumen los valores de las eficiencias ($E_{N-NH_4^+}$) y velocidades específicas ($q_{N-NH_4^+}$) obtenidas. El ensayo control (sin Bt) mostró una $E_{N-NH_4^+}$ de $99.7\% \pm 0.1$, es decir el amonio agregado fue consumido totalmente. Con concentraciones de 0.1 y 0.3 mg/L de Bt, la $E_{N-NH_4^+}$ no presentó diferencias significativas respecto al control, pero con concentraciones mayores de 2.5 y hasta 10.0 mg/L de Bt, la $E_{N-NH_4^+}$ disminuyó de 12 a 24%.

Tabla 8. Proceso amonio oxidante: eficiencias y velocidades específicas de consumo de amonio.

Concentración de benzotriazol (mg/L)	$E_{N-NH_4^+}$ (%)	$q_{N-NH_4^+}$ (mg N/mg proteína h)
0.0	99.7 ± 0.1	1.15 ± 0.08
0.1	99.5 ± 0.1	1.44 ± 0.08
0.3	99.5 ± 0.1	1.43 ± 0.07
2.5	87.1 ± 0.1	1.19 ± 0.06
5.0	80.9 ± 0.1	0.93 ± 0.06
10.0	75.6 ± 0.1	0.63 ± 0.05

La $q_{N-NH_4^+}$ para el control fue de 1.15 ± 0.08 mg N/mg proteína h. Comparando las $q_{N-NH_4^+}$ a diferentes concentraciones de Bt, los cambios fueron significativos $\alpha=0.025$ para las concentraciones de 0.1, 0.3 y 10.0 mg/L de Bt, mostrando que la presencia del mismo provocó un cambio en las pendientes de los perfiles de consumo de amonio en las cinéticas realizadas. A la concentración de 10.0 mg/L de Bt, hubo una disminución de 45% en el valor de $q_{N-NH_4^+}$, indicando una posible inhibición en el proceso amonio oxidante.

Pérez-Alfaro *et al.* (2013) encontraron que la amonio oxidación se veía completamente inhibida en presencia de 2.5-10 mg C/L de 2-clorofenol en ensayos en lote utilizando amonio como fuente de energía con un consorcio nitrificante, ya que no existió consumo de amonio en presencia de este compuesto reportando valores de $E_{N-NH_4^+}$ y $q_{N-NH_4^+}$ cercanos a cero. En el presente estudio, la presencia de benzotriazol a concentraciones mayores que 2.5 mg/L afectó el proceso amonio oxidante en menor medida que el efecto del 2-clorofenol.

6.2.2 Formación de hidroxilamina

El primer metabolito intermediario de la amonio oxidación es la hidroxilamina. Durante los ensayos en lote, se determinó la concentración de dicho intermediario (Fig. 19). Se puede observar que, en todos los casos e independientes de la adición de Bt, las concentraciones de hidroxilamina presente en el medio fueron relativamente bajas (0.87 ± 0.28 mg N/L) respecto a los 100 mg/L de $N-NH_4^+$ inicialmente agregados a los ensayos. Por lo tanto, el Bt no tuvo algún efecto en la acumulación de hidroxilamina, mostrando que el Bt no inhibió la oxidación de hidroxilamina a nitrito realizada por la enzima hidroxilamina óxido reductasa (HAO).

EFFECTO DEL BENZOTRIAZOL EN LOS PROCESOS AMONIO Y NITRITO OXIDANTES DE LA NITRIFICACIÓN.

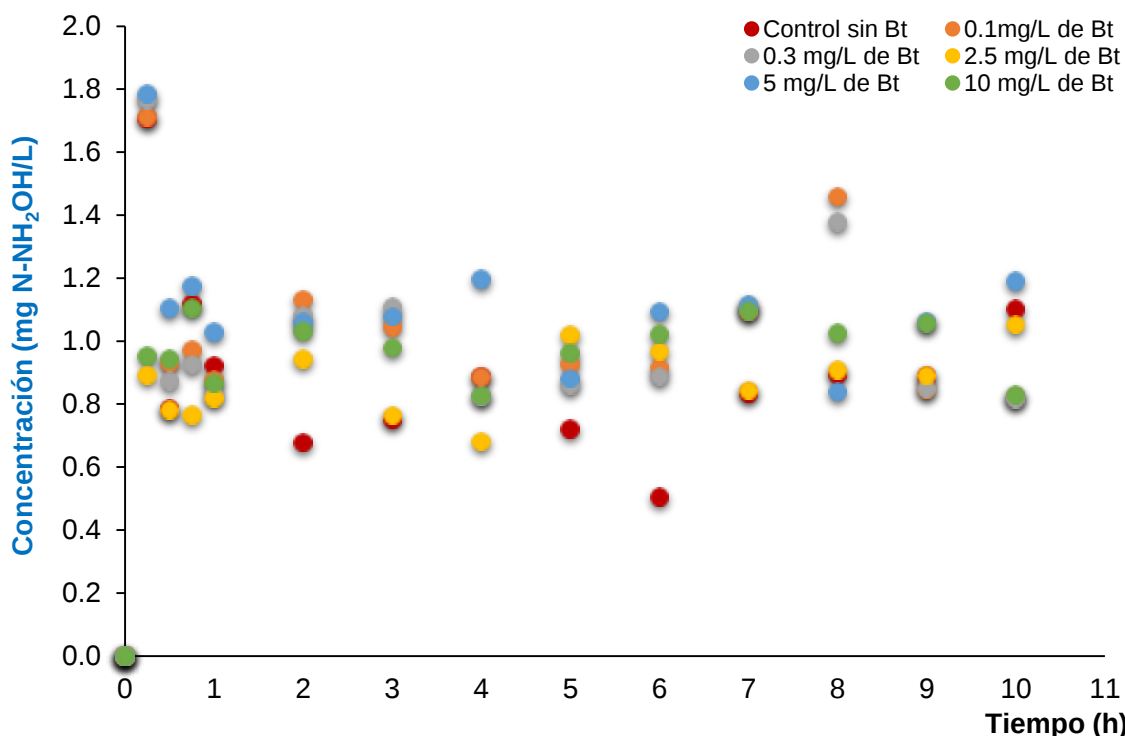


Figura 19. Formación de hidroxilamina a diferentes concentraciones iniciales de Bt.

La información en la literatura sobre el efecto inhibitorio de compuestos orgánicos en el proceso de amonio oxidación se centra generalmente en el estudio de la conversión de amonio a nitrito y pocos estudios han evaluado el efecto sobre la HAO. Juliette *et al.*, (1993) evaluaron el efecto de distintos tioéteres sobre las dos enzimas de la amonio oxidación (AMO y HAO) en cultivos axénicos de *Nitrosomonas europaea*. Los autores reportaron que el efecto de este tipo de compuestos azufrados fue principalmente sobre la enzima AMO, la cual fue relacionada con la oxidación de los compuestos orgánicos azufrados evaluados en ese estudio. En el presente trabajo, se obtuvieron resultados que indican que el Bt tendría un efecto inhibitorio en la oxidación de amonio a hidroxilamina, pero no en la oxidación de hidroxilamina a nitrito.

Los efectos de la adición de Bt sobre la eficiencia y la velocidad de consumo de amonio a concentraciones entre 2.5 y 10.0 mg/L observados sobre la amonio oxidación podrían deberse a un efecto a nivel del sistema de transporte del amonio y/o sobre el primer paso de oxidación de amonio a hidroxilamina por la enzima AMO. Está claro que para entender mejor los mecanismos de inhibición del Bt sobre la amonio oxidación, sería necesario hacer una evaluación más específica de su efecto con cultivos axénicos, extractos celulares y/o enzimas purificadas.

6.2.3 Formación de nitrito

El segundo metabolito y producto final del proceso amonio oxidante es el nitrito. Durante los ensayos en lote, se determinaron los perfiles de concentraciones de dicho compuesto a través del tiempo (fig. 20).

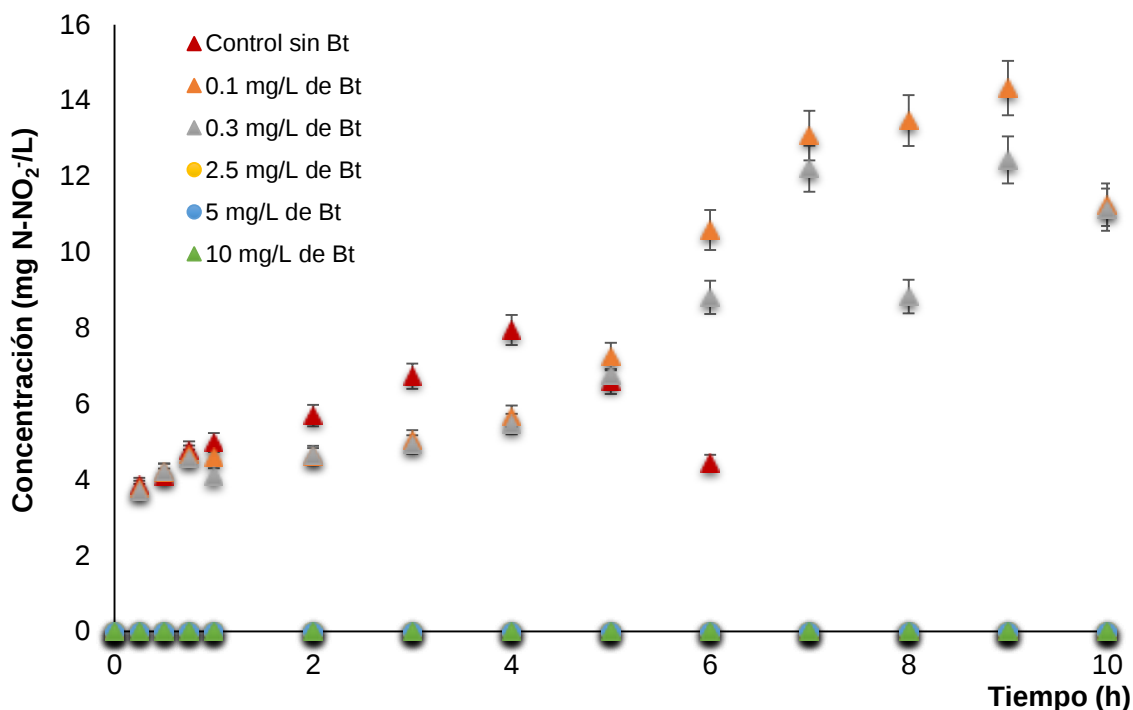


Figura 20. Formación de nitrito a diferentes concentraciones iniciales de Bt.

En el ensayo control sin Bt, el nitrito se acumuló transitoriamente durante las primeras 6 h de cultivo, alcanzando una concentración máxima cercana a 8 mg N-NO₂⁻/L a las 4 h. Después, la concentración de nitrito fue disminuyendo a través del tiempo y no se detectó a partir de 7 h. Cabe recordar que, en los cultivos realizados con lodo nitrificante y amonio como sustrato, ocurrieron tanto los procesos amonio y nitrito oxidantes. En estos ensayos, el nitrito formado por las AOB fue subsecuentemente oxidado a nitrato por las NOB y como consecuencia solamente se detectó una acumulación transitoria de nitrito en los cultivos. En los ensayos con Bt, se observó que con concentraciones de 0.1 y 0.3 mg/L de Bt existió una mayor acumulación de nitrito respecto al control de hasta 14 mg N-NO₂⁻/L, la cual perduró durante las 10 h de cultivo. Dicha acumulación de nitrito se resume en la Tabla 9, en la cual únicamente los ensayos con concentraciones de 0.1 y 0.3 mg/L de Bt presentan rendimientos $Y_{N-NO_2^-/N-NH_4^+}$ de 0.10 ± 0.10 . Con concentraciones desde 2.5 hasta 10.0 mg/L de Bt, no se detectó nitrito en el medio durante las 10 h de incubación. Estos resultados indican que a concentraciones de 0.1 y 0.3 mg/L, el Bt favoreció la acumulación de nitrito, lo cual podría ser indicio de que el Bt afectó también la oxidación de nitrito.

La acumulación de nitrito es indeseable en reactores nitrificantes ya que el mismo nitrito puede inhibir los procesos amonio y nitrito oxidantes de la nitrificación y provocar una mayor

acumulación de amonio y nitrito (*Silva et al., 2011*). *Beristain-Cardoso et al.* (2010) señalaron que el azufre elemental formado por la oxidación parcial del sulfuro en un reactor nitrificante podría afectar el transporte intracelular de nitrito o sobre la difusión hacia el interior de la biopelícula, favoreciendo la acumulación de nitrito en el sistema. En el presente estudio, además de un posible efecto del Bt en el transporte de nitrito, no se puede descartar tampoco un efecto sobre la actividad enzimática de la NOR. Por lo cual, es evidente que más estudios en este tema son necesarios.

Tabla 9. Proceso amonio oxidante: rendimiento de formación de nitrito.

Concentración de benzotriazol (mg/L)	$Y_{N-NO_2^-/N-NH_4^+}$
0.0	0
0.1	0.10 ± 0.10
0.3	0.10 ± 0.10
2.5	0
5.0	0
10.0	0

6.2.4 Formación de nitrato

Se dio seguimiento a la formación de nitrato como producto final de la nitrificación (Fig. 21). En el ensayo control sin Bt, el amonio fue oxidado completamente hasta nitrato en un tiempo de 10 horas. Los ensayos con concentraciones iniciales desde 2.5 hasta 10.0 mg/L de Bt mantuvieron un comportamiento similar a los observados en los ensayos control, ya que a las 10 horas que duraron las cinéticas se alcanzaron concentraciones de nitrato superiores a 70 mg N-NO₃⁻/L. Desde los primeros 15 min de cultivo y la formación de nitrato se mantuvo alta. Sin embargo, en los ensayos con 0.1 y 0.3 mg/L de Bt se presentaron perfiles cinéticos de formación de nitrato diferentes a los del ensayo control, con una menor formación de nitrato. En la Tabla 10, se puede observar que el valor de $Y_{N-NO_3^-/N-NH_4^+}$ obtenido en los cultivos en lote control fue de 0.96 ± 0.01 , es decir el amonio consumido fue casi totalmente oxidado hasta nitrato. No obstante, con concentraciones iniciales de 0.1 y 0.3 mg/L de Bt, los valores de $Y_{N-NO_3^-/N-NH_4^+}$ disminuyeron un 27 y 17%, respectivamente. Con 10 mg/L de Bt se registró una disminución de 9% mientras que a concentraciones de 2.5 y 5.0 mg/L de Bt, no existieron cambios significativos $p=0.01$ respecto a los ensayos control. Estos resultados en conjunto con los resultados de la acumulación de nitrito confirman un efecto fisiológico en el proceso de la nitrito oxidación a concentraciones de Bt de 0.1 y 0.3 mg/L. De la misma manera, se puede observar que las $q_{N-NO_3^-}$ disminuyeron hasta un 53% en presencia de concentraciones de 0.1 y 0.3 mg/L de Bt, existiendo un efecto inhibitorio en el mismo proceso.

EFFECTO DEL BENZOTRIAZOL EN LOS PROCESOS AMONIO Y NITRITO OXIDANTES DE LA NITRIFICACIÓN.

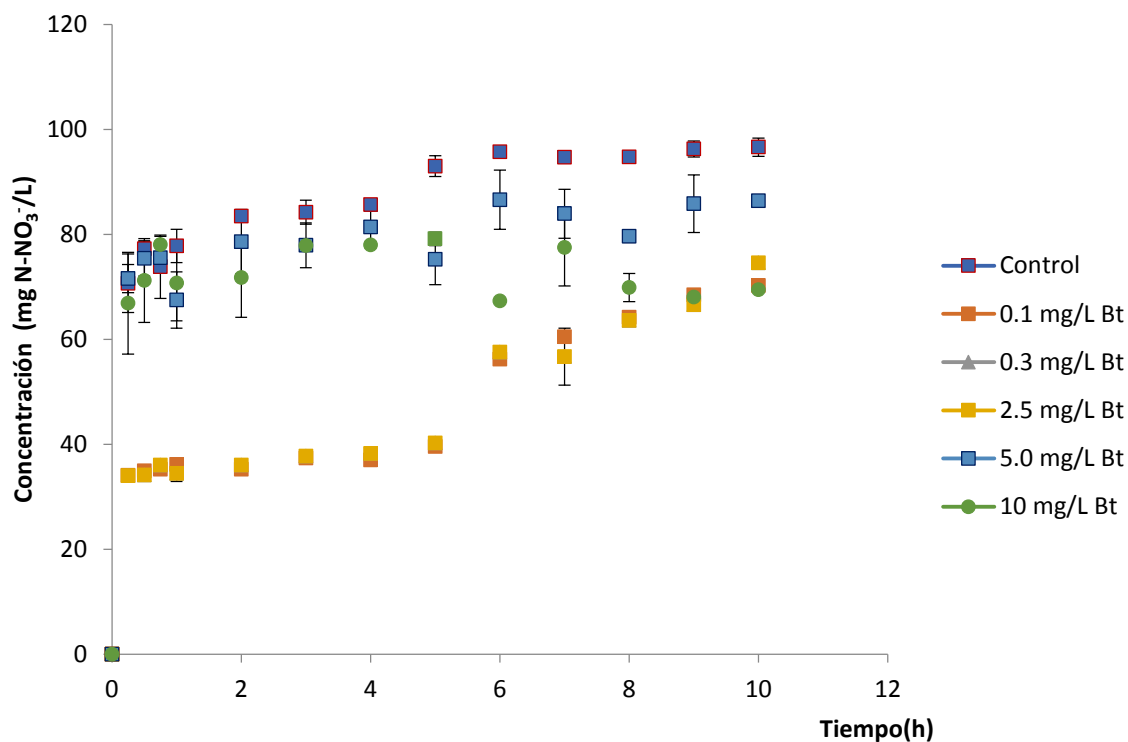


Figura 21. Formación de nitrato a diferentes concentraciones iniciales de Bt.

Tabla 10. Proceso amonio oxidante: rendimiento y velocidad específica de formación de nitrato.

Concentración de benzotriazol (mg/L)	$Y_{N-NO_3^-/N-NH_4^+}$	$q_{N-NO_3^-}$ (mg N/mg proteína h)
0.0	0.96 ± 0.01	1.13 ± 0.01
0.1	0.70 ± 0.05	0.53 ± 0.05
0.3	0.79 ± 0.01	0.53 ± 0.01
2.5	0.96 ± 0.01	1.12 ± 0.01
5.0	0.90 ± 0.03	1.15 ± 0.03
10.0	0.87 ± 0.03	1.04 ± 0.03

6.2.5 Resumen de resultados (cultivos nitrificantes con amonio)

La Tabla 11 presenta un resumen de las variables de respuesta determinadas para la evaluación de los cultivos nitrificantes con amonio como fuente de energía.

Tabla 11. Resumen de las variables de respuesta de los cultivos nitrificantes, utilizando amonio como fuente de energía.

Concentración de benzotriazol (mg/L)	$E_{N-NH_4^+}$ (%)	$Y_{N-NO_2^-/N-NH_4^+}$	$Y_{N-NO_3^-/N-NH_4^+}$	$q_{N-NH_4^+}$ (mg N/mg proteína.h)	$q_{N-NO_3^-}$ (mg N/mg proteína.h)
0.0	99.7 ± 0.1	0	0.96 ± 0.01	1.15 ± 0.08	1.13 ± 0.01
0.1	99.5 ± 0.1	0.10 ± 0.10	0.70 ± 0.05	1.44 ± 0.08	0.53 ± 0.05
0.3	99.5 ± 0.1	0.10 ± 0.10	0.79 ± 0.01	1.43 ± 0.07	0.53 ± 0.01
2.5	87.1 ± 0.1	0	0.96 ± 0.01	1.19 ± 0.06	1.12 ± 0.01
5.0	80.9 ± 0.1	0	0.90 ± 0.03	0.93 ± 0.06	1.15 ± 0.03
10.0	75.6 ± 0.1	0	0.87 ± 0.03	0.63 ± 0.05	1.04 ± 0.03

En primer lugar, se puede observar que las $E_{N-NH_4^+}$ disminuyen a mayores concentraciones de Bt, esto indica que el proceso amonio oxidante fue afectado a partir de 2.5 mg Bt/L. Conjuntamente, se presentan los datos obtenidos de $q_{N-NH_4^+}$, donde se puede observar que a la concentración de 10.0 mg/L de Bt, se exhibió una disminución significativa $p=0.01$ respecto a los ensayos control, indicando una inhibición en el proceso amonio oxidante a esta única concentración.

En cuanto a la variable $Y_{N-NO_2^-/N-NH_4^+}$, se observó que para concentraciones de 0.1 y 0.3 mg/L de Bt se presentó un aumento significativo $p=0.01$ en su valor, traduciéndose en la acumulación de nitrito, lo que conlleva a concluir que el consumo de nitrito debido a la nitrito oxidación fue afectada de manera negativa por la presencia de Bt bajo estas condiciones experimentales. Este resultado obtenido, sobre el $Y_{N-NO_2^-/N-NH_4^+}$ está estrechamente relacionado a los rendimientos de formación de nitrato ya que éstos disminuyeron significativamente $p=0.01$ a las mismas concentraciones de 0.1 y 0.3 mg Bt/L. En otras palabras, al acumularse nitrito en el cultivo, disminuye el rendimiento de formación de nitrato. Se evidenció también una disminución de las $q_{N-NO_3^-}$ a concentraciones de Bt de 0.1 y 0.3 mg/L, reafirmando el efecto inhibitorio del Bt en sobre la nitrito oxidación.

De tal forma, podemos concluir que los efectos sobre los valores de las variables de respuesta utilizadas para evaluar el comportamiento fisiológico y cinético de la nitrificación fueron diferentes en función de la concentración inicial de Bt. Por ejemplo, a concentraciones de 0.1 y 0.3 mg/L, el proceso amonio oxidante no fue alterado registrándose altas $E_{N-NH_4^+}$ y $q_{N-NH_4^+}$, mientras que el proceso nitrito oxidante fue inhibido, traduciéndose en una disminución significativa $\alpha=0.025$ en $q_{N-NO_3^-}$ y en el $Y_{N-NO_3^-/N-NH_4^+}$, además de una acumulación de nitrito ($Y_{N-NO_2^-/N-NH_4^+}$ cercano a 0.10). A concentraciones mayores de 2.5 a 10.0 mg/L de Bt el proceso amonio oxidante fue el mayormente afectado con una disminución significativa $\alpha=0.025$ en la $E_{N-NH_4^+}$ y un efecto inhibitorio significativo sobre la $q_{N-NH_4^+}$ a la concentración de 10 mg Bt/L, mientras que la nitrito oxidación no se vio

EFECTO DEL BENZOTRIAZOL EN LOS PROCESOS AMONIO Y NITRITO OXIDANTES DE LA NITRIFICACIÓN.

afectada, ya que se mantuvieron altos los valores de $Y_{N-NO_3^-/N-NH_4^+}$ y sin cambios significativos $p=0.01$ en las $q_{N-NO_3^-}$ ni acumulación final de nitrato.

Para corroborar los resultados obtenidos del efecto del Bt sobre el proceso respiratorio nitrato oxidante a menores concentraciones (0.1 y 0.3 mg/L) se llevaron a cabo cultivos con nitrato como única fuente de energía, resultados que se presentan en la sección 6.3.

6.2.6 Benzotriazol

Para todos los ensayos con amonio como sustrato inicial, se evaluó el consumo del Bt a través del tiempo (Fig. 22). Se puede observar que para las diferentes concentraciones evaluadas de Bt, no existió consumo por parte del lodo nitrificante bajo las condiciones experimentales utilizadas en este estudio. Los datos de la Tabla 12 confirman que se mantuvieron constantes las concentraciones de Bt a través de las 10 h de cultivo.

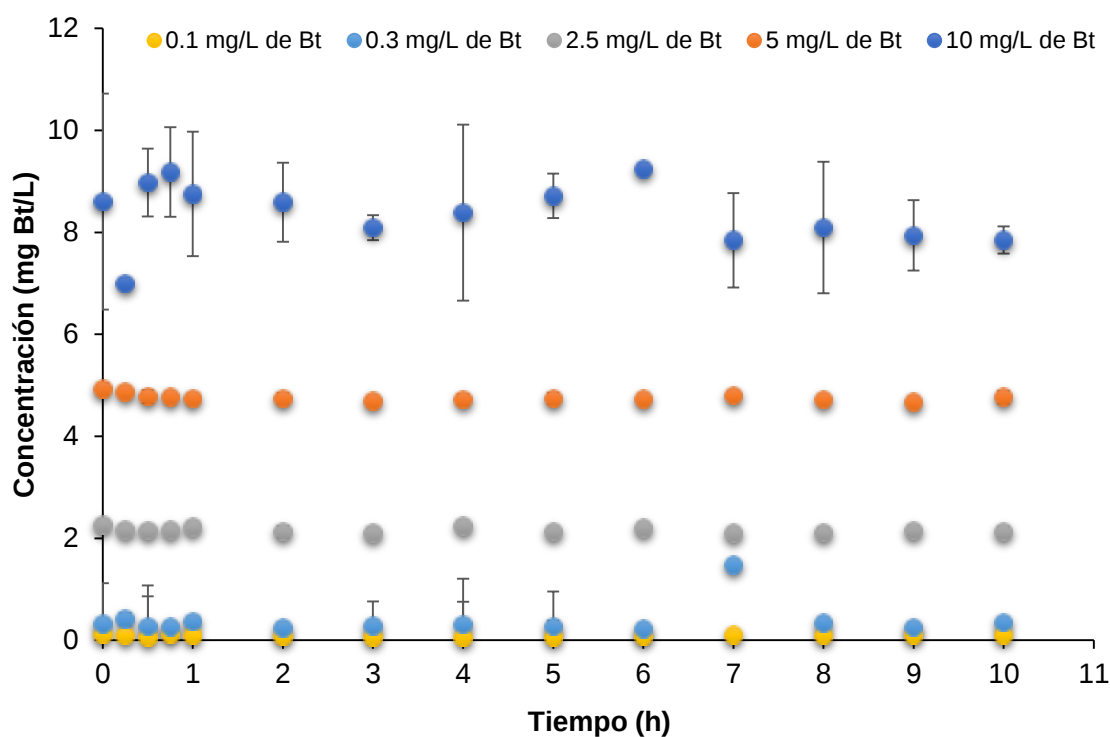


Figura 22. Concentración de Bt en los cultivos nitrificantes de 10 h.

Tabla 12. Concentraciones promedio de Bt en 10 horas de cultivo nitrificante.

Tiempo (h)	Concentración de benzotriazol (mg/L)				
	0.1	0.3	2.5	5	10
10	0.08 ± 0.02	0.30 ± 0.03	2.36 ± 0.05	4.76 ± 0.07	8.88 ± 0.61

En un estudio previo de *Aceves Zamora* (2017) realizado en un reactor SBR con un lodo nitrificante alimentado con amonio y Bt, se obtuvieron resultados similares, ya que en el primer ciclo de operación con adición de Bt al sistema no hubo consumo del mismo, mostrando un alta recalcitrancia del compuesto orgánico. Sin embargo, en este mismo trabajo, se observó que después de 7 ciclos de operación, el lodo nitrificante adquirió la capacidad metabólica para degradar totalmente el Bt (5 mg/L) en solamente 5 h. Además, se obtuvo un aumento en las velocidades específicas de consumo de Bt a través de los ciclos de operación, mostrando la adaptación metabólica del lodo para consumir el Bt.

Con otros compuestos orgánicos, *Nevalainen et al.* (1993) utilizando lodos activados con actividad nitrificante encontraron que el 2,4,6-triclorofenol, no tuvo efecto sobre la oxidación de NH_4^+ a NO_3^- , ya que se obtuvo un consumo del 100% del compuesto aromático. *Eiroa et al.* (2004) en un estudio con formaldehído y también utilizando lodos activados nitrificantes, determinaron una eficiencia de consumo del 100% de este compuesto orgánico, además de una alta formación de NO_2^- y NO_3^- .

Estos resultados evidencian que el lodo nitrificante utilizado en el presente trabajo no presentó la capacidad para oxidar el Bt, pero no se puede descartar la posibilidad de que pudiera adquirirla en sistemas dinámicos.

6.3 Cultivos con nitrito como fuente de energía

El proceso nitrito oxidante consiste en la oxidación biológica de nitrito como fuente de energía en presencia de oxígeno, para su conversión a nitrato, efectuado por bacterias nitrito oxidantes. En los cultivos en lote con nitrito como única fuente de energía (100 mg $\text{N-NO}_2^-/\text{L}$), se evaluó el proceso respiratorio nitrito oxidante del lodo a través del consumo de nitrito y la formación de nitrato. Las variables de respuesta utilizadas para el análisis de los resultados fueron la EN-NO_2^- y $q_{\text{N-NO}_2^-}$ de consumo, el rendimiento $Y_{\text{N-NO}_3^-/\text{N-NO}_2^-}$, así como la velocidad específica $q_{\text{N-NO}_3^-}$. Se usaron diferentes pruebas estadísticas para la comparación de las variables obtenidas tanto en los ensayos control en ausencia de Bt como en los ensayos en presencia de diferentes concentraciones iniciales de Bt.

6.3.1 Consumo de nitrito

La Fig. 23 presenta los perfiles cinéticos de consumo de nitrito en ausencia de Bt (ensayo control) y en presencia de diferentes concentraciones iniciales de Bt (0.1-10.0 mg/L). En el ensayo control sin Bt, se puede observar que los 100 mg $\text{N-NO}_2^-/\text{L}$ agregados al inicio del ensayo fueron consumidos totalmente en un tiempo de 1 hora. Por otra parte, los ensayos con concentraciones de 0.1 y 0.3 mg/L de Bt, tuvieron un consumo total de nitrito en un tiempo de 2 horas, mientras que los cultivos con concentraciones por arriba de los 2.5 mg/L de Bt mantuvieron un comportamiento similar al del ensayo control.

EFFECTO DEL BENZOTRIAZOL EN LOS PROCESOS AMONIO Y NITRITO OXIDANTES DE LA NITRIFICACIÓN.

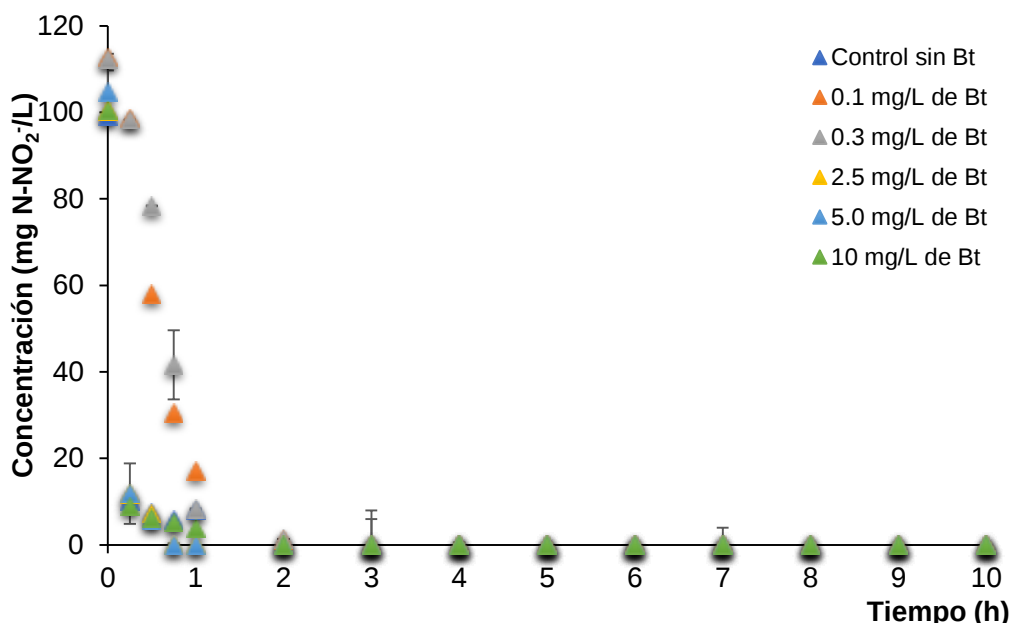


Figura 23. Consumo de nitrato a diferentes concentraciones iniciales de Bt.

En la Tabla 13, se puede observar los valores de $EN-NO_2^-$ de consumo, en los cuales no existió diferencia significativa entre las diferentes concentraciones de Bt y los ensayos control. Sin embargo, para concentraciones de 0.1 y 0.3 mg/L de Bt, la $q_{N-NO_2^-}$ disminuyó un 7 y 6%, respectivamente. Esto corrobora los resultados obtenidos previamente obtenidos en los cultivos con amonio como única fuente de energía, es decir, la nitrato oxidación se vio inhibida en presencia de Bt a estas concentraciones.

Tabla 13. Proceso nitrato oxidante: eficiencias y velocidades específicas de consumo de nitrato.

Concentración de benzotriazol (mg/L)	$EN-NO_2^-$ (%)	$q_{N-NO_2^-}$ (mg N/mg proteína h)
0.0	99.9 ± 0.08	1.46 ± 0.08
0.1	99.8 ± 0.06	1.35 ± 0.07
0.3	99.9 ± 0.03	1.37 ± 0.08
2.5	99.8 ± 0.05	1.45 ± 0.05
5.0	99.9 ± 0.03	1.44 ± 0.08
10.0	99.8 ± 0.04	1.44 ± 0.07

6.3.2 Formación de nitrato

En los ensayos en lote con nitrato inicial también se dio seguimiento a la formación de nitrato como producto final de la nitrato oxidación (Fig. 24). Para el ensayo control sin Bt el nitrato fue oxidado completamente hasta nitrato en un tiempo de 10 horas. Por otra

EFFECTO DEL BENZOTRIAZOL EN LOS PROCESOS AMONIO Y NITRITO OXIDANTES DE LA NITRIFICACIÓN.

parte, a cualquier concentración de Bt, los perfiles cinéticos de formación de nitrato mostraron una tendencia similar a la del ensayo control.

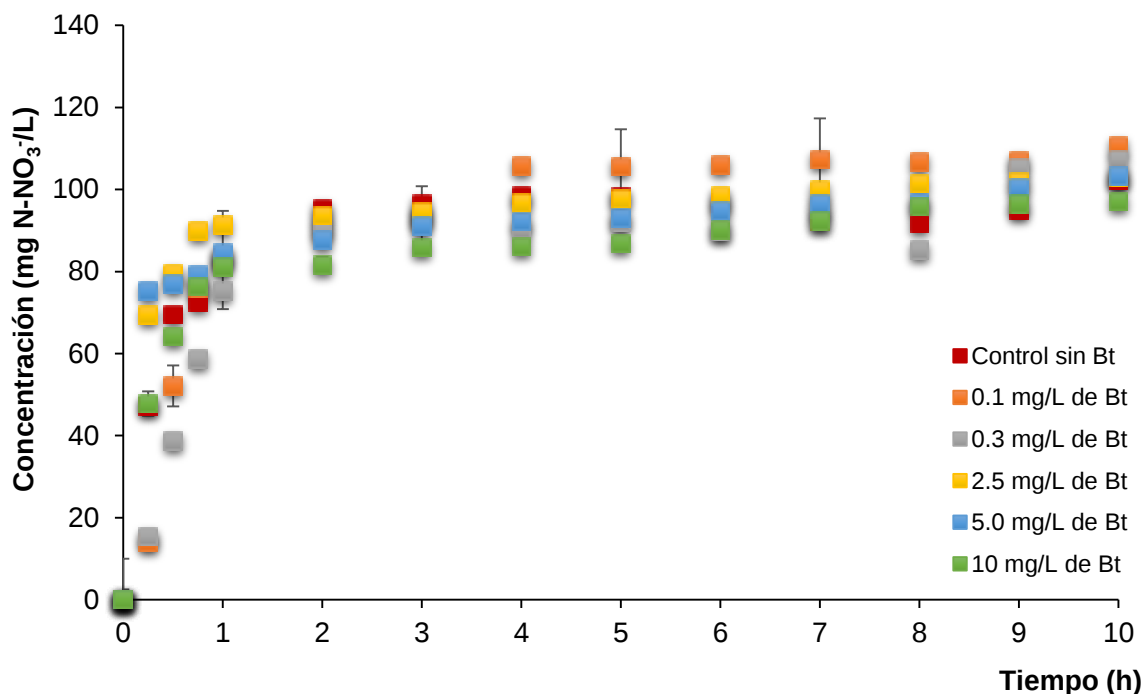


Figura 24. Formación de nitrato a diferentes concentraciones iniciales de Bt.

La Tabla 14 muestra las variables de respuesta asociadas a la formación de nitrato en presencia de Bt, sin que existan diferencias significativas en los $Y_{N-NO_3^-/N-NO_2^-}$. Con concentraciones de 0.1 y 0.3 mg Bt/L la $q_{N-NO_3^-}$ disminuyó un 19 y 13% respectivamente, esto respecto a los ensayos control, confirmando que la inhibición del proceso nitrato oxidante de la nitrificación se dio a estas concentraciones iniciales de Bt.

Tabla 14. Proceso nitrato oxidante: rendimientos y velocidades específicas de formación de nitrato.

Concentración de benzotriazol (mg/L)	$Y_{N-NO_3^-/N-NO_2^-}$	$q_{N-NO_3^-}$ (mg N/mg proteína h)
Control	1.00 ± 0.01	1.07 ± 0.04
0.1	0.97 ± 0.10	0.87 ± 0.03
0.3	0.95 ± 0.10	0.93 ± 0.04
2.5	1.00 ± 0.01	1.05 ± 0.06
5.0	0.98 ± 0.01	1.06 ± 0.06
10.0	0.99 ± 0.03	1.07 ± 0.02

6.3.3 Resumen de resultados (cultivos nitrificantes con nitrito)

La Tabla 15 presenta un resumen de las variables de respuesta determinadas para la evaluación de los cultivos nitrificantes con nitrito como fuente de energía.

Tabla 15. Resumen de las variables de respuesta en el proceso nitrito oxidante, utilizando nitrito como fuente de energía.

Concentración de benzotriazol (mg/L)	$E_{N-NO_2^-}$ (%)	$Y_{N-NO_3^-/N-NO_2^-}$	$q_{N-NO_2^-}$ (mg N/mg proteína h)	$q_{N-NO_3^-}$ (mg N/mg proteína h)
0.0	99.9 ± 0.08	1.00 ± 0.01	1.46 ± 0.08	1.07 ± 0.04
0.1	99.8 ± 0.06	0.97 ± 0.10	1.35 ± 0.07	0.87 ± 0.03
0.3	99.9 ± 0.03	0.95 ± 0.10	1.37 ± 0.08	0.93 ± 0.04
2.5	99.8 ± 0.05	1.00 ± 0.01	1.45 ± 0.05	1.05 ± 0.06
5.0	99.9 ± 0.03	0.98 ± 0.01	1.44 ± 0.08	1.06 ± 0.06
10.0	99.8 ± 0.04	0.99 ± 0.03	1.44 ± 0.07	1.07 ± 0.02

Respecto a las eficiencias de consumo de nitrito y los rendimientos de formación de nitrato, tanto del ensayo control como a diferentes concentraciones de Bt, no existió diferencias significativas $p=0.01$. Sin embargo, las velocidades específicas de consumo de nitrito y formación de nitrato a concentraciones de 0.1 y 0.3 mg/L de Bt disminuyeron significativamente $p=0.01$ respecto al ensayo control.

Los resultados anteriores confirmaron que la nitrito oxidación puede ser inhibida por la presencia de Bt a bajas concentraciones.

6.3.4 Consumo de benzotriazol

De la misma manera que en la evaluación de los cultivos nitrificantes con amonio, se evaluó el consumo del Bt a través del tiempo en los cultivos adicionados con nitrito (Fig. 25). Se puede observar que para las diferentes concentraciones evaluadas de Bt y bajo las condiciones experimentales utilizadas, el lodo no mostró capacidad metabólica para consumir el Bt. Asimismo, los datos de la Tabla 16 confirman que se mantuvieron prácticamente constantes las concentraciones de Bt a través de las 10 h de cultivo.

EFFECTO DEL BENZOTRIAZOL EN LOS PROCESOS AMONIO Y NITRITO OXIDANTES DE LA NITRIFICACIÓN.

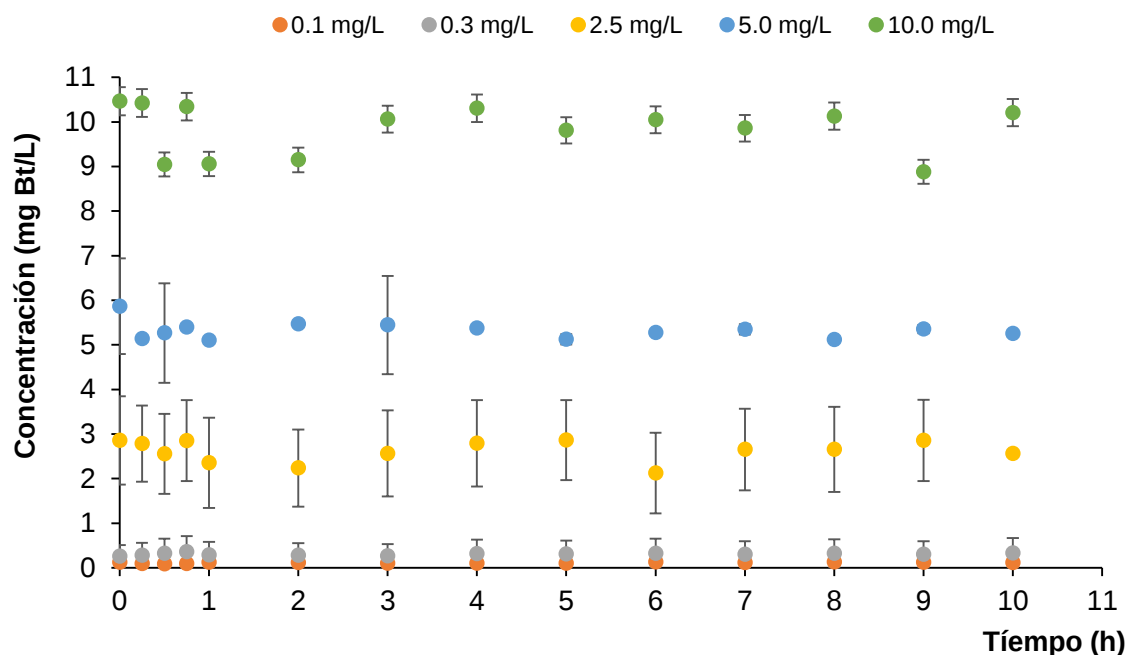


Figura 25. Concentración de Bt en los cultivos nitrato oxidantes de 10 h.

Tabla 16. Concentraciones promedio de Bt en 10 horas de cultivo nitrato oxidante.

Tiempo (h)	Concentración de benzotriazol (mg/L)				
	0.1	0.3	2.5	5	10
10	0.109 ± 0.01	0.303 ± 0.02	2.62 ± 0.24	5.32 ± 0.19	9.84 ± 0.56

Bajo las condiciones experimentales utilizadas, en presencia de amonio o nitrato como única fuente de energía, el Bt no pudo ser eliminado en 10 horas de cultivo. Existen algunos trabajos que han sugerido que la capacidad microbiana para eliminar compuestos recalcitrantes puede deberse a mecanismos como la inducción de enzimas, mutaciones, intercambio genético (que transfiere nuevas capacidades metabólicas) o crecimiento de microorganismos específicos (Spain et al., 1980; Schmidt et al., 1983; Button y Robertson, 1985). Para evaluar si el lodo pudiera adquirir la capacidad metabólica para degradar el Bt por algunos de estos mecanismos de adaptación, se necesitaría desarrollar estudios con periodos de evaluación mayores a 10 h en sistemas dinámicos como reactores en continuos o de lotes secuenciados, los cuales pueden promover la adaptación metabólica de lodos para la degradación de compuestos recalcitrantes.

7 Conclusiones

- ✓ Se obtuvo un lodo con respiración nitrificante en estado estacionario en un reactor en semicontinuo, con una eficiencia de consumo de amonio de $99.9\% \pm 0.1$ y un rendimiento de nitrato de 0.97 ± 0.02 , el cual fue utilizado como inóculo para los ensayos en lote.
- ✓ La presencia de benzotriazol afectó los procesos amonio oxidante y nitrito oxidante de la nitrificación en diferente grado y sus efectos fisiológicos y cinéticos fueron estrechamente relacionados con la concentración presente del mismo en el medio, modificando en diferente magnitud las eficiencias de consumo de sustratos, los rendimientos de conversión a productos, así como las velocidades de consumo de sustratos y formación de producto.
- ✓ A bajas concentraciones de 0.1 a 0.3 mg/L de Bt, el proceso amonio oxidante no fue alterado en su eficiencia ni en la velocidad de consumo de amonio, mientras que el proceso nitrito oxidante fue inhibido con disminuciones significativas en sus velocidades específicas.
- ✓ En cultivos nitrificantes con amonio como sustrato y Bt a 0.1 y 0.3 mg/L, la oxidación de N-NH_4^+ a N-NO_3^- por nitrificación se vio afectada, con una disminución de 17 a 27% en el rendimiento de nitrato y una acumulación de nitrito ($Y_{\text{N-NO}_2^-/\text{N-NH}_4^+} = 0.10$).
- ✓ A mayores concentraciones de 2.5 a 10.0 mg/L de Bt, el proceso de amonio oxidación fue afectado con una disminución de 12 a 24% en su eficiencia de consumo de amonio y una inhibición de 45% en la $q_{\text{N-NH}_4^+}$ a 10 mg Bt/L.
- ✓ En cultivos nitrificantes con amonio como sustrato y Bt de 2.5 a 10.0 mg/L, la oxidación de N-NH_4^+ a N-NO_3^- por nitrificación no se vio afectada con valores de rendimiento de nitrato cercanos a 1 y sin cambios significativos en la velocidad de formación de nitrato respecto al control.
- ✓ En cultivos nitrificantes con nitrito como sustrato y Bt de 2.5 a 10.0 mg/L, no existió efecto en la eficiencia, rendimiento ni en velocidades de la nitrito oxidación.
- ✓ No se observaron cambios significativos en la formación de hidroxilamina en el ensayo control ni en presencia de Bt.
- ✓ Para todos los cultivos en lote con amonio o nitrito como sustrato, se observó que el lodo bajo las condiciones experimentales usadas no mostró la capacidad metabólica para consumir el Bt.

Los resultados de este trabajo mostraron que la presencia de benzotriazol en procesos nitrificantes puede tener un impacto en el tratamiento de aguas residuales, específicamente en los procesos amonio y nitrito oxidantes, los cuales son alterados en diferente manera y magnitud dependiendo de la concentración de Bt presente en el medio, propiciando la acumulación de compuestos nitrogenados como amonio y nitrito debido a los efectos fisiológicos e inhibitorios causados sobre estos dos procesos biológicos.

8 Bibliografía

- ❖ Aceves Zamora. (2017). Efecto del benzotriazol sobre la nitrificación en un reactor de lote secuenciado (SBR). Tesis de maestría Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México.
- ❖ Asimakopoulou, A.G., Bletsou, A.A., Wu, Q., Thomaidis, N.S., Kannan, K (2012). Determination of benzotriazoles and benzothiazoles in human urine by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 85: 441–448.
- ❖ Barceló, D. (2003). Emerging pollutants in water analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*.14-16.
- ❖ Becerril, José. Contaminantes Emergentes en el Agua. (2009). Revista Digital Universitaria Vol. 10. N° 8. p. 1-7.
- ❖ Bergmann, D. J. and A. B. Hooper. 1994. Sequence of the gene, amoB, for the 43-kDa polypeptide of ammonia monooxygenase of *Nitrosomonas europaea*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 204: 759-762.
- ❖ Bejarano-Ortiz, D. I., Huerta-Ochoa, S., Thalasso, F., De María Cuervo-López, F. & Texier, A.-C (2015). Kinetic constants for biological ammonium and nitrite oxidation processes under sulfide inhibition. *Applied Biochemistry and Biotechnology*.177: 1665–1675.
- ❖ Beristain-Cardoso R., Gómez J. y Méndez-Pampín R. (2010). The behavior of nitrifying sludge in presence of sulfur compounds using a floating biofilm reactor. *Biores Technol.* 101: 8593–8598.
- ❖ Beristain-Cardoso R., Texier A.-C., Razo-Flores E., Méndez-Pampín R. y Gómez J (2009). Biotransformation of aromatic compounds from wastewaters containing N and/or S, by nitrification/denitrification: a review. *Rev Environ Sci Biotechnol.* 8: 325–342.
- ❖ Breedveld, G. D., Roseth, R., Sparrevik, M., Hartnik, T., & Hem, L. J. (2003). Persistence of the deicing additive benzotriazole at an abandoned airport. *Water, Air, & Soil Pollution, Focus*.3: 91–101.
- ❖ Bolong, N., Ismail, A.F., Salim, M.R., Matsuura, T., 2009. A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. *Desalination.* 239: 229–246.
- ❖ Bothe, H., G. Jost, M. Schlöter, B. B. Ward, and K. Witzel. 2000. Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments. *FEMS Microbiol. Rev.* 24: 673-690.

EFFECTO DEL BENZOTRIAZOL EN LOS PROCESOS AMONIO Y NITRITO OXIDANTES DE LA
NITRIFICACIÓN.

- ❖ Bock, E., I. Schmidt, R. Stueven and D. Zart. 1995. Nitrogen loss caused by denitrifying Nitrosomonas cells using ammonium or hydrogen as electron donors and nitrite as electron acceptor. *Arch. Microbiol.* 163:16-20.
- ❖ Button D.K. y Robertson B.R (1985). Effect of toluene exposure time and concentration on induction of high affinity values for toluene oxidation by bacteria of estuarine seawater samples. *Marine Ecology Progress Series.* 26: 187-193.
- ❖ Caffrey JM, Sloth NP, Kaspar H, Blackburn TH. (1993). Effect of organic loading on nitrification and denitrification in a marine sediment microcosm. *FEMS Microbiol Ecol.* 12: 159–167.
- ❖ Cancilla, D.A., Holtkamp, A., Matassa, L., Fang, X., (1997). Isolation and characterization of Microtox_-active components from aircraft deicing/antiicing fluids. *Environ. Toxicol. Chem.* 16: 430–434.
- ❖ Cervantes F.J. (2009). Anthropogenic sources of N-pollutants and their impact on the environment and on public health. En: *Environmental Technologies to Treat Nitrogen Pollution*, Cervantes (Ed.), pp. 1-22, IWA Publishing, London, UK.
- ❖ CNA (2014). Situación del subsector agua potable, alcantarillado y saneamiento. Comisión Nacional del Agua. SEMARNAT. México D.F. 235 pp.
- ❖ Cornell, J.S., Pillard, D.A., Hernandez, M.T. (2000). Comparative measures of the toxicity of component chemicals in aircraft deicing fluid. *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 1465–1472.
- ❖ Corrales LC, Arévalo ZY. Moreno VE. Solubilización de fos-fatos: una función microbiana importante en el desarrollo vegetal. *NOVA.* 2014; 12(21):67-79.
- ❖ COTTON, J. B. (1963). The Control of Surface Reactions on Copper by Means of Organic Reagents', *Proceedings of the Second International Congress on Metallic Corrosion*, New York, 590-596.
- ❖ Eiroa M., Kennes C. y Veiga M.C (2004). Formaldehyde biodegradation and its inhibitory effect on nitrification. *J Chem Technol Biotechnol.* 79: 499–504.
- ❖ Eilersen et al., 1994 A. Eilersen, M. Henze, L. Kløft Effect of volatile fatty acids and trimethylamine on nitrification in activated sludge *Wat. Res.*, 28 (1994), pp. 1329-1336.
- ❖ Erguder T.H., Boon N., Vlaeminck S.E. y Verstrate W. (2008). Partial nitrification achieved by pulse sulfide doses in a sequential batch reactor. *Environ Sci Technol.* 42: 8715–8720.
- ❖ Esponda A. (2001). Arranque de un sistema experimental de flujo vertical a escala piloto de tipo humedal artificial para el tratamiento de aguas residuales. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México, México.

EFFECTO DEL BENZOTRIAZOL EN LOS PROCESOS AMONIO Y NITRITO OXIDANTES DE LA
NITRIFICACIÓN.

- ❖ Farré, M., Pérez, S., Kantiani, L., Barceló, D., 2008. Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. *Trends Anal. Chem.* 27: 991–1007.
- ❖ Francisco J. Villalobos y Elías Fereres Fitotecnia: principios de agronomía para una agricultura sostenible Editorial: Mundiprensa 2007.
- ❖ Giger, W., Schaffner, C., Kohler, H.P.E. (2006). Benzotriazole and tolyltriazole as aquatic contaminants. 1. Input and occurrence in rivers and lakes. *Environ. Sci. Technol.* 40: 7186–7192.
- ❖ Gómez Nieto, M.A. y Hontoria García (2003). E. Técnicas analíticas en el control de la ingeniería ambiental. España: Universidad de Granada.
- ❖ Harris, C.A., Santos, E.M., Janbakhsh, A., Pottinger, T.G., Tyler, C.R., Sumpter, J.P. (2001). Nonylphenol affects gonadotropin levels in the pituitary gland and plasma of female rainbow trout. *Environ. Sci. Technol.* 35: 2909–2916.
- ❖ Hanaki K., Wantawin C., Ohgaki S. (1990b). Effects of the activity of heterotrophs on nitrification in a suspended-growth reactor. *Wat. Res.* 24(3); 289-296.
- ❖ Hirata-Koizumi, M., Fujii, S., Ono, A., et al., 2011b. Evaluation of the reproductive and developmental toxicity of aluminium ammonium sulfate in a two- generation study in rats. *Food Chem. Toxicol.* 49: 1948-1959.
- ❖ Hyman MR, Arp DJ. $^{14}\text{C}_2\text{H}_2$ - and $^{14}\text{CO}_2$ -labeling studies of the de novo synthesis of polypeptides by *Nitrosomonas europaea* during recovery from acetylene and light inactivation of ammonia monooxygenase. *J Biol Chem.* 1992 267:1534–1545.
- ❖ Hooper, A., T. Vannelli, D. Bergmann and D. Arciero. 1997. Enzymology of the oxidation of ammonia to nitrite by bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 71:59-67.
- ❖ Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.A., Stanley J.T. y Williams S.T. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9 na Edición. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia. 447-450.
- ❖ Janna, H., Scrimshaw, M.D., Williams, R.J., Churchley, J., Sumpter, J.P., (2011). From dishwasher to tap Xenobiotic substances benzotriazole and tolyltriazole in the environment. *Environ. Sci. Technol.* 45: 3858–3864.
- ❖ Jaramillo, O. A. (2005). En Bioingeniería de Aguas Residuales Teoría y Diseño (págs. 1-5).
- ❖ Juliette L.Y., Hyman M.R. and Arp D.J. (1993). Inhibition of ammonia oxidation in *Nitrosomonas europaea* by sulfur compounds: thioethers are oxidized to sulfoxides by ammonia monooxygenase. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 3718-3727.

EFFECTO DEL BENZOTRIAZOL EN LOS PROCESOS AMONIO Y NITRITO OXIDANTES DE LA
NITRIFICACIÓN.

- ❖ Kadar, E., Dashfield, S., Hutchinson (2010). Developmental toxicity of benzotriazole in the protochordate *Ciona intestinalis* (Chordata, Ascidiace). *Anal. Bioanal. Chem.* 396: 641–647.
- ❖ Kiss, A., Fries (2009). Occurrence of benzotriazoles in the rivers Main, Hengstbach, and Hegbach (Germany). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 16: 702–710.
- ❖ Kitamura S., Suzuki, T.; Sanoh, S.; Kohta, R.; Jinno, N.; Sugihara, K. (2005). Comparative Study of the Endocrine-Disrupting Activity of Bisphenol A and 19 Related Compounds. *Toxicological Sciences*, 249-259.
- ❖ Kokalj, A., Kovačević, N., Peljhan, S., Finšgar, M., Lesar, A., Milošev, I. (2011). Triazole, benzotriazole, and naphthotriazole as copper corrosion inhibitors: I. Molecular electronic and adsorption properties. *Chem. Phys. Chem.* 12: 3547-3555.
- ❖ Kowalchuk, G.A., Stienstra A.W., Heilig G.H., Stephen J.R., J.W. Woldendorp. (2000). Changes in the community structure of ammonia oxidizing bacteria during secondary succession of calcareous grasslands. *Environ. Microbiol.* 2: 99-110.
- ❖ Loos, R., Gawlik, B.M., Locoro, G., Rimaviciute, E., Contini, S., Bidoglio, G. (2009). EU wide survey of polar organic persistent pollutants in European river waters. *Environ. Pollut.* 157: 561-568.
- ❖ Lowry, O.H., Rosen Brough, N.J., Farr, A.L., Randall R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- ❖ Martinez, O.F., Soriano, S.J., Gómez, J. (1998). Análisis químico y electroforético de un lodo nitrificante asociado al IVL. IV Iberian Congress on Biotechnology, Ilbero American Meeting on Biotechnology, Braga, Portugal.
- ❖ Martínez-Hernández, S., Texier, A-C., Cuervo-López, F.M., Gómez, J. (2011). 2-Chlorophenol consumption and its effect on the nitrifying sludge. *J. Hazard. Mat.* 185: 1592-1595.
- ❖ Mulder, A., Van de Graaf, A.A., Robertson, L.A., Kuenen, J.G. (1995). Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiol. Ecol.* 16: 177-183.
- ❖ Nevalainen, I., Kostyal, E., Nurmiäho-Lassila, E-L., Puhakka, J., Salkinoja-Salonen, M. (1993). Deschlorination of 2,4,6-trichlorophenol by a nitrifying biofilm. *Water Res.* 5: 757-767.
- ❖ Nold, S.C., Zhou, J., Devol, A.H., Tiedje, J.M. (2000). Pacific Northwest marine sediments contain ammonia-oxidizing bacteria in the beta subdivision of the Proteobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4532-4535.
- ❖ Norton, J.M., Low, J.M., Klotz, M.G. (1996). The gene encoding ammonia monooxygenase subunit A exists in three nearly identical copies in *Nitrosospira* sp. NpAV. *FEMS Microbiol. Lett.* 139: 181-188.

EFFECTO DEL BENZOTRIAZOL EN LOS PROCESOS AMONIO Y NITRITO OXIDANTES DE LA
NITRIFICACIÓN.

- ❖ Oller, I., Malato, S., Sánchez-Pérez, J.A. (2011). Combination of Advanced Oxidation Processes and biological treatments for wastewater decontamination A review. *Sci. Tot. Environ.* 409: 4141-4166.
- ❖ Orozco Jaramillo Alvaro (2005). Bioingeniería de aguas residuales. Teoría y diseño. Asociación Colombiana de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Bogota. Colombia.
- ❖ Painter, H.A. (1970). A review of literature on inorganic nitrogen metabolism in microorganisms. *Water Res.* 4, 393-450.
- ❖ Pérez, J.E. (2010). Efecto del 2-clorofenol sobre la nitrificación. Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México.
- ❖ Prosser, J. (1989). Autotrophic nitrification in bacteria. In: Rose, A. and Tempest, D. (Eds.) *Advances in microbial physiology*. p. 125-181. Academic Press, London.
- ❖ Pervova, M.G., Kirichenko, V.E., Saloutin, V.I. (2010). Determination of 1,2,3-benzotriazole in aqueous solutions and air by reaction-gas-liquid chromatography. *J. Anal. Chem.* 65: 276-279.
- ❖ Pillard, D.A., Cornell, J.S., DuFresne, D.L., Hernandez, M.T. (2001). Toxicity of benzotriazole and benzotriazole derivatives to three aquatic species. *Water Res.* 35: 557-560.
- ❖ Puttanna, K. y Prakasa Rao, E.V.S. (1993). Determination of nitrate in soil by second derivative ultraviolet spectrometry. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 24: 737-743.
- ❖ Purkhold, U., Wagner, M., Timmermann, G., Pommerening-Roser, A., Koops, H.P. (2003). 16S rRNA and amoA-based phylogeny of 12 novel betaproteobacterial ammonia-oxidizing isolates: Extension of the dataset and proposal of a new lineage within the nitrosomonads. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 1485-1494.
- ❖ Rodríguez-Monroy, J. y Durán de Bazúa, C. (2006). Remoción de nitrógeno en un sistema de tratamiento de aguas residuales usando humedales artificiales de flujo vertical a escala de banco. *Tecnol. Ciencia Ed.* 21: 25-33.
- ❖ Ramón Parés i Farràs, Antonio Juárez Giménez, *Bioquímica de los microorganismos*: Editorial Reverté, 1997.
- ❖ Rollinson, G., Callely, A.G. (1986). No evidence for the biodegradation of benzotriazole by elective culture or continuous enrichment. *Biotechnol. Lett.* 8: 303-304.
- ❖ Rotthauwe, J.H., Witzel, K.P., Liesack, W. (1997). The ammonia monooxygenase structural gene amoA as a functional marker: Molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4704-4712.
- ❖ Ruan, Y.L. (2012). Signaling roles of sucrose metabolism in plant development. *Mol. Plant* 5: 763-765.

EFFECTO DEL BENZOTRIAZOL EN LOS PROCESOS AMONIO Y NITRITO OXIDANTES DE LA NITRIFICACIÓN.

- ❖ Strous, M., Fuerst, J.A., Kramer, E.H.M., Logemann, S., Muyzer, G., van de Pas-Schoonen, K.T., Webb, R., Kuenen, J.G., Jetten, M.S.M. (1999). Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature* 400: 446-449.
- ❖ Sease, C. (1978). "Benzotriale: A Review for conservation" *Studies in conservation* 23: 76-85
- ❖ Schweighofer, P., Nowak, O., Svardal, K., Kroiss, H. (1996). Steps towards the upgrading of a municipal WWTP affected by nitrification inhibiting compounds-A case study. *Water Sci. Technol.* 33(12): 39-46.
- ❖ Seeland, A., Oetken, M., Kiss, A., Fries, E., Oehlmann, J. (2012). Acute and chronic toxicity of benzotriazoles to aquatic organisms. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 19: 1781-1790.
- ❖ Schmidt, I., Sliemers, O., Schmid, M., Bock, E., Fuerst, J., Kuenen, J.G., Jetten, M., Strous, M. (2003). New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater. *FEMS Microbiol. Rev.* 27: 481-492.
- ❖ Stephen, J.R., McCaig, A.E., Smith, Z., Prosser, J.I., Embley, T.M. (1996). Molecular diversity of soil and marine 16S rRNA gene sequences related to beta-subgroup ammonia oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4147-4154.
- ❖ Silva, C.D., Cuervo-López, F.M., Gómez, J., Texier, A-C. (2011). Nitrite effect on ammonium and nitrite oxidizing processes in a nitrifying sludge. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 27: 1241-1245.
- ❖ Silva, C.D. (2007). Estudio fisiológico de la nitrificación en presencia de *p*-cresol. Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.
- ❖ Spain, J.C., Pritchard, P.H., Bourquin, A.W. (1980). Effects of adaptation on biodegradation rates in sediment/water cores from estuarine and freshwater environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 40(4): 726-734.
- ❖ Tourna, M., Freitag, T.E., Nicol, G.W., Prosser, J.I. (2008). Growth, activity and temperature responses of ammonia oxidizing archaea and bacteria in soil microcosms. *Environ. Microbiol.* 10: 1357-1364.
- ❖ Voutsas, D., Hartmann, P., Schaffner, C., Giger, W. (2006). Benzotriazoles, alkylphenols and bisphenol A in municipal wastewaters and in the Glatt River, Switzerland. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 13: 333-341.
- ❖ Ward, B.B. (2000). Nitrification and the marine nitrogen cycle. In: Kirchman D (ed). *Microbial Ecology*. Wiley-Liss: New York, pp 427-454.

EFFECTO DEL BENZOTRIAZOL EN LOS PROCESOS AMONIO Y NITRITO OXIDANTES DE LA
NITRIFICACIÓN.

- ❖ Wolschke, H., Xie, Z., Möller, A., Sturm, R., Ebinghaus, R. (2011). Occurrence, distribution and fluxes of benzotriazoles along the German large river basins into the North Sea. *Water Res.* 45: 6259–6266.
- ❖ Woese, C.R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51: 221-271.
- ❖ Wrage, N., Velthof, G.L., van Beusichem, M.L., Oenema, O. (2001). Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide. *Soil Biol. Biochem.* 33: 1723-1732.
- ❖ Zepeda, A., Texier, A-C., Gómez, J. (2003). Benzene transformation in nitrifying batch culture. *Biotechnol. Prog.* 19: 789-793.
- ❖ Zepeda, A., Texier, A-C., Gómez, J. (2006). Kinetic and metabolic study of benzene, toluene and *m*-xylene in nitrifying batch cultures. *Water Res.* 40: 1643-1649.
- ❖ Zhang, M., Zheng, X., Song, S. *et al.* (2011). Spatiotemporal manipulation of auxin biosynthesis in cotton ovule epidermal cells enhances fiber yield and quality. *Nat. Biotechnol.* 29: 453-458.

EFFECTO DEL BENZOTRIAZOL EN LOS PROCESOS AMONIO Y NITRITO OXIDANTES DE LA NITRIFICACIÓN.

I. Apéndice I

ANOVA

En este apartado se muestra el ANOVA One-Way utilizado para realizar la comparación entre los cultivos en lote control y en presencia de benzotriazol con un $p=0.05$, así como las pruebas de comparaciones para observar las diferencias entre los grupos, utilizando Tukey-Kramer con un $\alpha=0.05$

		ANOVA				
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
E _{N-NH₄⁺}	Entre grupos	1718.274	5	343.655	1844.851	.001
	Dentro de grupos	2.235	12	.186		
	Total	1720.509	17			
Y _{N-NO₂⁻/N-NH₄⁺}	Entre grupos	.039	5	.008	73.316	.001
	Dentro de grupos	.001	12	.000		
	Total	.040	17			
Y _{N-NO₃⁻/N-NH₄⁺}	Entre grupos	.155	5	.031	242.087	.001
	Dentro de grupos	.002	12	.000		
	Total	.156	17			
E _{N-NO₂⁻}	Entre grupos	.033	5	.007	1.732	.201
	Dentro de grupos	.045	12	.004		
	Total	.078	17			
(Y _{NO₃⁻/NH₄⁺})	Entre grupos	.004	5	.001	10.971	.001
	Dentro de grupos	.001	12	.000		
	Total	.005	17			

EFFECTO DEL BENZOTRIAZOL EN LOS PROCESOS AMONIO Y NITRITO OXIDANTES DE LA NITRIFICACIÓN.

Cultivos con amonio

Eficiencia de consumo de amonio ($E_{N-NH_4^+}$)

HSD Tukey

Bt (mg/L)	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
10.0	3	75.5867			
5.0	3		80.9833		
2.5	3			87.1000	
0.1	3				99.5333
0.3	3				99.5333
0.0	3				99.7233
Sig.		1.000	1.000	1.000	.993

Rendimiento de formación de nitrito

($Y_{N-NO_2^-/N-NH_4^+}$)

HSD Tukey

Bt mg/L	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
0.0	3	.0000	
2.5	3	.0000	
5.0	3	.0000	
10.0	3	.0000	
0.3	3		.0967
0.1	3		.1000
Sig.		1.000	.998

EFFECTO DEL BENZOTRIAZOL EN LOS PROCESOS AMONIO Y NITRITO OXIDANTES DE LA NITRIFICACIÓN.

Rendimiento de formación de nitrato ($Y_{N-NO_3^-/N-NH_4^+}$)

HSD Tukey

Bt mg/L	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
0.1	3	.7000			
0.3	3		.7900		
10.0	3			.8733	
5.0	3			.9000	
0.0	3				.9567
2.5	3				.9600
Sig.		1.000	1.000	.108	.999

Cultivos con nitrito

Eficiencia de consumo de nitrito ($E_{N-NO_2^-}$)

HSD Tukey

Bt mg/L	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		1
2.5	3	99.8000
10.0	3	99.8367
0.1	3	99.8400
5.0	3	99.9033
0.3	3	99.9067
0.0	3	99.9100
Sig.		.307

EFFECTO DEL BENZOTRIAZOL EN LOS PROCESOS AMONIO Y NITRITO OXIDANTES DE LA NITRIFICACIÓN.

Rendimiento de formación de nitrato

$$(Y_{N-NO_3^-/N-NO_2^-})$$

HSD Tukey

Bt mg/L	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
0.3	3	.9533		
0.1	3	.9700	.9700	
5.0	3	.9767	.9767	.9767
10.0	3		.9867	.9867
0.0	3			.9967
2.5	3			.9967
Sig.		.061	.260	.129

II. Apéndice II

Regresión lineal y prueba de homogeneidad de coeficientes

Se muestran los resultados obtenidos a partir de las velocidades específicas de consumo de amonio y nitrito, así como velocidades específicas de formación de nitrato, para comparar el cambio de las pendientes que representan cambios de velocidades, tanto para los controles como a distintas concentraciones de Bt.

Modelos descritos en regresión lineal

Cultivos con amonio

Consumo de amonio				
Concentración de Benzotriazol (mg/L)	R ²	B	S	gl
0.0	0.901	293.1	8.0	3
0.1	0.905	355.0	2.9	3
0.3	0.991	354.9	3.1	3
2.5	0.990	306.6	8.1	3
5	0.998	288.3	9.7	3
10	0.974	285.7	8.6	3

Formación de nitrato				
Concentración (mg/L)	R ²	B	S	gl
control (0)	0.902	286.8	9.8	3
0.1	0.932	139.0	2.6	3
0.3	0.942	137.1	1.6	3
2.5	0.970	280.3	2.4	3
5	0.995	285.8	2.4	3
10	0.995	284.3	4.0	3

Cultivos con nitrito

Consumo de nitrito				
Concentración (mg/L)	R ²	B	S	gl
control (0)	0.990	365.8	3.7	3
0.1	0.991	338.6	1.6	3
0.3	0.991	342.5	3.3	3
2.5	0.995	363.1	1.7	3
5	0.992	361.9	2.2	3
10	0.993	362.2	2.2	3

EFFECTO DEL BENZOTRIAZOL EN LOS PROCESOS AMONIO Y NITRITO OXIDANTES DE LA NITRIFICACIÓN.

Formación de nitrato				
Concentración (mg/L)	R ²	B	S	gl
control (0)	0.998	269.8	4.2	3
0.1	0.996	219.1	5.2	3
0.3	0.995	232.8	0.8	3
2.5	0.994	262.5	2.4	3
5	0.993	267.0	3.5	3
10	0.990	268.2	2.1	3

R²=Coeficiente de determinación

B= Coeficientes de regresión

S=Error del coeficiente

gl=grados de libertad

Comparación mediante prueba de homogeneidad de coeficientes

La comparación de las pendientes obtenidas en los cultivos en lote con Bt para consumo de sustratos y formación de producto se realizó utilizando como hipótesis nula (H₀): igualdad en las pendientes vs hipótesis alternativa (H_a): que las pendientes son diferentes utilizando un $\alpha = 0.025$. Implicando que un cambio en la pendiente, indica un cambio de las velocidades.

$$H_0: \beta_0 = \beta_0'$$

$$H_a: \beta_0 \neq \beta_0'$$

$$t = \frac{B - B'}{\sqrt{S^2 + S'^2}}$$

EFFECTO DEL BENZOTRIAZOL EN LOS PROCESOS AMONIO Y NITRITO OXIDANTES DE LA NITRIFICACIÓN.

Consumo de amonio (Cultivo con amonio)

Control		
Concentración de Bt (mg/L)	t (calculada)	t (tablas)
0.1	-7.18	3.1824
0.3	-7.11	
2.5	-1.17	
5	0.37	
10	0.62	

0.1 (mg/L) Bt		
Concentración de Bt (mg/L)	t (calculada)	t (tablas)
Control	7.18	3.1824
0.3	0.003	
2.5	4.2	
5	0.3759	
10	5.84	

0.3 (mg/L) Bt		
Concentración de Bt (mg/L)	t (calculada)	t (tablas)
Control	7.18	3.1824
0.1	-0.003	
2.5	4.19	
5	5.25	
10	5.84	

2.5 (mg/L) Bt		
Concentración de Bt (mg/L)	t (calculada)	t (tablas)
Control	1.56	3.1824
0.1	-5.56	
0.3	-4.19	
5	1.44	
10	1.76	

5 (mg/L) Bt		
Concentración (mg/L) Bt	t (calculada)	t (tablas)
Control	-0.553	3.1824
0.1	-7.66	
0.3	-5.78	
2.5	-1.44	
10	0.22	

10 (mg/L) Bt		
Concentración (mg/L) Bt	t (calculada)	t (tablas)
Control	-0.83	3.1824
0.1	-7.97	
0.3	-6.01	
2.5	-1.65	
5	-0.22	

EFFECTO DEL BENZOTRIAZOL EN LOS PROCESOS AMONIO Y NITRITO OXIDANTES DE LA NITRIFICACIÓN.

Formación de nitrato (Cultivo con amonio)

Control		
Concentración de Bt (mg/L)	t (calculada)	t (tablas)
0.1	10.65	3.1824
0.3	14.71	
2.5	0.6505	
5	0.1	
10	0.2495	

0.1 mg/L Bt		
Concentración de(mg/L) Bt	t (calculada)	t (tablas)
Control	10.65	3.1824
0.3	0.18	
2.5	-14.26	
5	-14.52	
10	14.35	

0.3 mg/L Bt		
Concentración (mg/L) Bt	t (calculada)	t (tablas)
Control	10.78	3.1824
0.1	-0.18	
2.5	-14.39	
5	-14.71	
10	-14.54	

2.5 mg/L Bt		
Concentración de (mg/L) Bt	t (calculada)	t (tablas)
Control	-0.4663	3.1824
0.1	13.89	
0.3	-14.39	
5	-0.53	
10	-0.38	

5 mg/L Bt		
Concentración (mg/L) Bt	t (calculada)	t (tablas)
Control	-0.07	3.1824
0.1	14.43	
0.3	0.548	
2.5	0.1491	
10	-0.38	

10 mg/L Bt		
Concentración de (mg/L) Bt	t (calculada)	t (tablas)
Control	-0.18	3.1824
0.1	14.28	
0.3	0.39	
2.5	-0.14	
5	-0.38	

EFFECTO DEL BENZOTRIAZOL EN LOS PROCESOS AMONIO Y NITRITO OXIDANTES DE LA NITRIFICACIÓN.

Consumo de nitrito (Cultivo con nitrito)

Control		
Concentración (mg/L) Bt	t (calculada)	t (tablas)
0.1	6.71	3.1824
0.3	4.62	
2.5	0.65	
5	0.9	
10	0.842	

0.1 mg/L Bt		
Concentración (mg/L) Bt	t (calculada)	t (tablas)
Control	6.71	3.1824
0.3	-0.78	
2.5	-5.99	
5	-5.4	
10	-5.45	

2.5 mg/L Bt		
Concentración (mg/L) Bt	t (calculada)	t (tablas)
Control	-0.66	3.1824
0.1	4.88	
0.3	5.03	
5	0.27	
10	0.22	

0.3 mg/L Bt		
Concentración (mg/L) Bt	t (calculada)	t (tablas)
Control	5.73	3.1824
0.1	0.78	
2.5	-5.03	
5	-4.48	
10	-4.54	

5 mg/L Bt		
Concentración (mg/L)	t (calculada)	t (tablas)
Control	-0.95	3.1824
0.1	4.64	
0.3	4.73	
2.5	-0.27	
10	-0.05	

10 mg/L Bt		
Concentración (mg/L) Bt	t (calculada)	t (tablas)
Control	-0.89	3.1824
0.1	4.69	
0.3	4.79	
2.5	-0.22	
5	-0.05	

EFFECTO DEL BENZOTRIAZOL EN LOS PROCESOS AMONIO Y NITRITO OXIDANTES DE LA NITRIFICACIÓN.

Formación de nitrato (Cultivo con nitrato)

Control		
Concentración de Bt (mg/L)	t (calculada)	t (tablas)
0.1	7.48	3.1824
0.3	8.47	
2.5	1.47	
5	0.5	
10	0.33	

0.1 mg/L Bt		
Concentración (mg/L) Bt	t (calculada)	t (tablas)
Control	7.48	3.1824
0.3	-3.1324	
2.5	-8.81	
5	-8.64	
10	-10.23	

0.3 mg/L Bt		
Concentración (mg/L) Bt	t (calculada)	t (tablas)
Control	5.46	3.1824
0.1	3.13	
2.5	-6.03	
5	-6.17	
10	-7.38	

2.5 mg/L Bt		
Concentración (mg/L) Bt	t (calculada)	t (tablas)
Control	-1.07	3.1824
0.1	9.94	
0.3	6.03	
5	-0.8	
10	-1.17	

5 mg/L Bt		
Concentración (mg/L) Bt	t (calculada)	t (tablas)
Control	-0.41	3.1824
0.1	10.96	
0.3	6.94	
2.5	-0.8	
10	-1.17	

10 mg/L Bt		
Concentración (mg/L) Bt	t (calculada)	t (tablas)
Control	-0.23	3.1824
0.1	11.23	
0.3	7.18	
2.5	1.01	
5	-0.24	

•

EFFECTO DEL BENZOTRIAZOL EN LOS PROCESOS AMONIO Y NITRITO OXIDANTES DE LA NITRIFICACIÓN.

 Casa abierta al tiempo UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA		ACTA DE EXAMEN DE GRADO	
EFECTO DEL BENZOTRIAZOL EN LOS PROCESOS AMONIO Y NITRITO OXIDANTES DE LA NITRIFICACIÓN		En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 5 del mes de septiembre del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado: DRA. LILIA ARELY DE JESUS PRADO BARRAGAN DR. JESUS EMMANUEL PEREZ ALFARO DR. DIEGO IVAN BEJARANO ORTIZ DRA. FLOR DE MARIA CUERVO LOPEZ	
 DANIEL MATURANO CARRERA ALUMNO		Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de: MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA DE: DANIEL MATURANO CARRERA y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron: <u>Aprobar</u> Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.	
REVISÓ  LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES			
DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS  DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE		PRESIDENTA  DRA. LILIA ARELY DE JESUS PRADO BARRAGAN	
VOCAL  DR. JESUS EMMANUEL PEREZ ALFARO	VOCAL  DR. DIEGO IVAN BEJARANO ORTIZ	SECRETARIA  DRA. FLOR DE MARIA CUERVO LOPEZ	