

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD



Casa abierta al tiempo

**ESTUDIO DEL TOLUENO COMO FUENTE DE CARBONO EN LA
DESNITRIFICACIÓN EN UN REACTOR EN CONTINUO**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA:

SERGIO MARTÍNEZ HERNÁNDEZ

COMITÉ TUTORIAL:

DIRECTOR: DR. JORGE GÓMEZ HERNÁNDEZ

ASESORES: DRA. FLOR DE MARÍA CUERVO LÓPEZ

DR. HUGO RAMÍREZ SAAD

MÉXICO D.F.

NOVIEMBRE DEL 2003

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD



Casa abierta al tiempo

**ESTUDIO DEL TOLUENO COMO FUENTE DE CARBONO EN LA
DESNITRIFICACIÓN EN UN REACTOR EN CONTINUO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

SERGIO MARTÍNEZ HERNÁNDEZ

COMITÉ TUTORIAL:

DIRECTOR: DR. JORGE GÓMEZ HERNÁNDEZ

ASESORES: DRA. FLOR DE MARÍA CUERVO LÓPEZ

DR. HUGO RAMÍREZ SAAD

MÉXICO D.F.

NOVIEMBRE DEL 2003

Dedicatorias

A mi Madre, Gregoria Hernández Hernández, por el apoyo incondicional que me ha brindado durante mi existir. Quiero darte las gracias por todo el amor que me has dado, por inculcarme la existencia de un Ser divino, que en tiempos difíciles te obligan a pensar que lo mejor esta por venir.

A mi Padre, Abel Martínez Guzmán, por el ánimo para seguir luchando por un mejor bienestar. Por inculcarme la honradez, la honestidad, el amor al trabajo. Por enseñarme que lo más sencillo es la esencia de la vida.

Agradecimientos

A mis hermanos, Yolanda, Magdalena y Ángel, por en apoyo que me han brindado. Por compartir esa niñez que difícilmente se olvidará.

A mis abuelos Micaela y Leopoldo, por su apoyo durante buena parte de mi vida profesional.

A mis asesores, Dra. Flor de María Cuervo López, Dr. Jorge Gómez Hernández y Dr. Hugo Ramírez Saad, por su tiempo dedicado para tratar de entender el complejo mundo de la investigación.

Al H. jurado por la revisión y sugerencias a este trabajo y evaluación en la defensa del mismo.

A los compañeros del laboratorio Fer, Anne, Armando, Alejandro, Felipe, Arturo y Ricardo por compartir su amistad y experiencias en el laboratorio.

A los cuates, Luz, César, Oswaldo, Sergio y Toni, por brindarme su compañía y compartir momentos difíciles y agradables durante la maestría.

LA MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA ESTA INCLUIDA EN EL PADRÓN DE POSGRADOS DE EXCELENCIA DEL **CONACyT** Y ADEMÁS CUENTA CON APOYO DEL MISMO CONSEJO, CON EL CONVENIO: (CONVENIO ESPECÍFICO 400200-5-33668-U, CON TITULO “ELIMINACIÓN DE COMPUESTOS AROMÁTICOS POR NITRIFICACIÓN-DESNITRIFICACIÓN: ESTUDIO FISIOLÓGICO, BIOQUÍMICO Y FISICOQUÍMICO DEL PROCESO”)

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la unidad
Iztapalapa aprobó la comunicación de resultados

**Estudio del tolueno como fuente de carbono en la
desnitrificación en un reactor en continuo**

Que presentó

Sergio Martínez Hernández

H. Jurado:

Director: Dr. Jorge Gómez Hernández _____

Asesor: Dra. Flor de María Cuervo López _____

Asesor: Dr. Hugo C. Ramírez Saad _____

Sinodal: Dra. Florina Ramírez Vives _____

Sinodal: Dr. Alejandro Olmos Dichara _____

ÍNDICE

Lista de Figuras.....	3
Lista de tablas.....	4
Resumen.....	5
Abstract.....	6
1. Revisión bibliográfica	
1.1 Características generales del tolueno.....	7
1.1.1 Fuente y usos del tolueno.....	7
1.1.2. Características fisicoquímicas del tolueno.....	8
1.1.3 Toxicidad del tolueno.....	10
1.1.4. Métodos de eliminación del tolueno.....	11
1.1.4.1 Métodos fisicoquímicos.....	11
1.1.4.2 Métodos biológicos.....	11
1.1.4.2.1 Métodos aerobios.....	11
1.1.4.2.2 Métodos anóxicos.....	14
1.2 Eliminación de nitrógeno.....	15
1.2.1 Ciclo del nitrógeno.....	15
1.2.2 Métodos fisicoquímicos para la eliminación de nitrógeno.....	16
1.2.2.1 Arrastre con aire.....	16
1.2.2.2 Rompimiento por cloración.....	17
1.2.2.3 Intercambio de iones.....	17
1.2.3 Métodos biológicos de eliminación de nitrógeno.....	17
1.2.3.1 Nitrificación.....	17
1.2.3.2 Desnitrificación.....	18
1.2.3.2.1 Microbiología de la desnitrificación.....	18
1.2.3.2.2 Bioquímica de la desnitrificación.....	20
1.2.3.2.3 Factores que afectan la desnitrificación.....	22
1.3 Referencias.....	25
2. Justificación	34
3. objetivos	36

4. Material y Métodos	37
4.1 Materiales.....	37
4.1.1 Diseño y operación del reactor UASB.....	37
4.1.2 Inóculo.....	38
4.1.3 Medio de cultivo.....	39
4.2 Cultivo.....	39
4.3 Métodos analíticos.....	40
4.3.1 Compuestos nitrogenados.....	40
4.3.1.1 Medición de nitrato y nitrito.....	40
4.3.1.2 Medición de nitrógeno molecular y óxido nitroso.....	42
4.3.2 Compuestos carbonados.....	43
4.3.2.1 Medición de carbono total y orgánico.....	43
4.3.2.2 Medición de acetato.....	44
4.3.2.3 Medición de bióxido de carbono y metano.....	45
4.3.2.4 Medición de tolueno.....	45
4.3.2.5 Medición de sólidos suspendidos volátiles.....	46
4.4 Referencias.....	48
5. Resultados y discusión	49
5.1 Desnitrificación heterótrofa con acetato.....	49
5.1.1 Perfil de los compuestos carbonados.....	49
5.1.2 Perfil de los compuestos nitrogenados.....	51
5.1.3 Discusión.....	53
5.1.4 Referencias.....	56
5.2 Desnitrificación heterótrofa con acetato y tolueno.....	57
5.2.1 Consumo de tolueno y acetato en el reactor desnitrificante UASB.....	57
5.2.1.1 Ensayos abióticos con tolueno.....	58
5.2.1.2 Perfil de los compuestos carbonados.....	60
5.2.1.3 Perfil de los compuestos nitrogenados.....	63
5.2.1.4 Discusión.....	65
5.2.1.5 Referencias.....	73
6. Conclusiones	78

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1. Revisión bibliográfica

Figura 1.1 Diversas rutas aerobias que emplean microorganismos del género <i>Pseudomonas</i> para la oxidación de tolueno.....	13
Figura 1.2 Ciclo del nitrógeno.....	15
Figura 1.3 Etapas de la desnitrificación y enzimas involucradas en cada una de éstas....	20

Capítulo 4. Material y métodos

Figura 4.1 Esquema del reactor UASB.....	38
Figura 4.2 Curva de calibración para la determinación de nitrato.....	41
Figura 4.3 Curva de calibración para la determinación de carbono total.....	44
Figura 4.4 Curva de calibración para la determinación de acetato.....	45
Figura 4.5 Curva de calibración para la determinación de tolueno.....	46

Capítulo 5. Resultados y discusión

5.1 Desnitrificación heterótrofa con acetato

Figura 5.1.1 Comportamiento de compuestos carbonados.....	50
Figura 5.1.2 Concentración de sólidos suspendidos volátiles.....	51
Figura 5.2.3 Comportamientos de compuestos nitrogenados.....	52
Figura 5.2.4 Rendimientos desnitrificantes.....	53

5.2 Desnitrificación heterótrofa con acetato y tolueno

Figura 5.2.1 Perfil de los compuestos carbonados.....	60
Figura 5.2.2 Concentración de sólidos suspendidos volátiles.....	62
Figura 5.2.1 Perfil de los compuestos nitrogenados.....	63

LISTA DE TABLAS

Capítulo 1. Revisión bibliográfica

Tabla 1.1 Características fisicoquímicas de los BTEX.....	9
Tabla 1.2 Estequiometría y energía libre generada por la oxidación de tolueno en procesos anóxicos.....	14
Tabla 1.3 Algunos géneros que incluyen bacterias desnitrificantes.....	19

Capítulo 4. Material y métodos

Tabla 4.1 Concentración de sólidos suspendidos de la planta de tratamiento de aguas residuales de la UAM-Iztalapa.....	38
Tabla 4.2 Composición química del medio de cultivo.....	39
Tabla 4.3 Velocidades de carga de carbono ensayadas durante los experimentos.....	40

Capítulo 5. Resultados y discusión

5.1 Desnitrificación heterótrofa con acetato

5.2 Desnitrificación heterótrofa con acetato y tolueno

Tabla 5.2.1 Ensayo abiótico: Proporción de carbono de tolueno en fase líquido/gas en recipientes de alimentación.....	58
Tabla 5.2.2 Ensayo abiótico: Cuantificación de carbono de tolueno en recipiente de alimentación y en el reactor UASB.....	59
Tabla 5.2.3 Eficiencias de consumo de carbono.....	61
Tabla 5.2.4 Rendimientos de carbono.....	62
Tabla 5.2.5 Eficiencias de consumo de nitrógeno.....	64
Tabla 5.2.6 Rendimientos de nitrógeno.....	65

Resumen

Se evaluaron diferentes velocidades de carga de tolueno sobre un lodo desnitrificante utilizando un reactor continuo UASB. El trabajo consistió en dos etapas. La primera consistió en alimentar el lodo con acetato como fuente reductora y nitrato como fuente oxidante, sin adición de hidrocarburos aromáticos. La velocidad de carga de acetato fue de 250 mg C/l.d y la de nitrato de 178 mg N/l.d, lo que dio una relación C/N de 1.4. En la segunda etapa, la C/N se mantuvo al mismo valor y la velocidad de carga de carbono (VCC) fue de 250 mg C/l.d, pero el carbono de acetato fue siendo sustituido por carbono de tolueno. El intervalo valorado de carbono de tolueno fue de 25 a 125 mg C/l.d. Cuando el lodo sólo fue alimentado con acetato la eficiencia de consumo de carbono fue de $98.6\% \pm 0.6$ y el rendimiento ($Y_{\text{HCO}_3^-}$) fue de 0.99 ± 0.5 , con rendimiento desnitrificante (Y_{N_2}) de 0.98 ± 0.6 . El proceso fue claramente desasimilativo. En el intervalo de 25 y 50 mg C/l.d de tolueno, la eficiencia de consumo de nitrógeno fue de $95\% \pm 1.5$, pero a VCC de 125 mg C/l.d disminuyó a $86\% \pm 2.1$. A todas las velocidades de carga de tolueno, el Y_{N_2} fue de 0.87 ± 0.05 . Los resultados muestran que el acetato y el tolueno reducen simultáneamente el nitrato a N_2 . Es decir, tanto el acetato, como el tolueno fueron mineralizados a CO_2 por medio de la desnitrificación. La evidencia también mostró que la eliminación del tolueno fue posible a través de la desnitrificación.

Abstract

On a denitrifying sludge the effect of different loading rates of toluene as electron sources on the respiratory process was studied in continuous UASB reactor. This work consisted of two stages, the first was the feeding of the sludge with acetate and nitrate as donor and acceptor electrons, without aromatic hydrocarbons. The acetate loading rate was of 250 mg C/l.d and nitrate loading rate was of 178 mg N/l.d, for giving a C/N ratio of 1.4. In the second stage the ratio was kept at same value and the carbon loading rate (CLR) was of 250 mg C/l.d, but the C-toluene was replacing to the C-acetate. The studied range of loading rates of toluene was from 25 to 125 mg C/l.d. When acetate was used as electron donors, in steady state condition, the carbon consumption efficiency was $98.6\% \pm 0.6$, the yield ($Y_{\text{HCO}_3^-}$) was of 0.99 ± 0.05 and denitrifying yield (Y_{N_2}) was of 0.98 ± 0.06 . Clearly a dissimilative process. At the different CLR of toluene the consumption efficiency was of $95\% \pm 3.5$. In the range from 25 to 50 mg C/l.d of toluene the nitrogen consumption efficiency was $95\% \pm 1.5$, but at the CLR of 125 mg C/l.d the efficiency for N-NO_3^- decreased to $86\% \pm 2.1$. Under all toluene loading rates the Y_{N_2} was 0.87 ± 0.05 . The results evidence that acetate and toluene reduce simultaneously the nitrate to N_2 . Namely, as the acetate as toluene were mineralized to CO_2 by denitrification. The evidence also showed that the removal of toluene was possible by denitrification.

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 Características generales del tolueno

1. 1.1 Fuente y usos del tolueno

El tolueno es un hidrocarburo monoaromático, que junto con el benceno, etilbenceno e isómeros del xileno, constituyen el grupo de los hidrocarburos monoaromáticos comúnmente denominados BTEX.


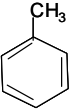
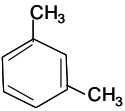
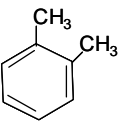
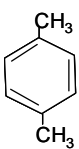
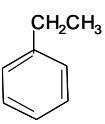
La fuente principal del tolueno es el petróleo, otra fracción importante deriva de la destilación del alquitrán de hulla, producto líquido generado de los hidrocarburos que se producen durante la coquificación del carbón (Morrison y Boyd, 1988). Algunos hallazgos también sugieren que el tolueno puede ser formado biológicamente. Por ejemplo, Jutter y Henatsch (1986), detectaron bajas concentraciones de tolueno en ambientes prístinos de lagos anóxicos.

El tolueno junto con el resto de los BTEX, son usados como aditivos antidetonantes en diversos productos del petróleo, tales como la gasolina y el diesel. Por ejemplo, en una gasolina común, se estima que los BTEX representan alrededor del 20%, en donde el tolueno, constituye el 25% (Phelps y Young, 2001). El tolueno también se utiliza como solvente en la elaboración de pinturas, resinas, pegamentos, thinner, entre otros productos. Se sabe que estos solventes contienen hasta el 85% de tolueno (Fornazzari y col., 2003). También es utilizado como materia prima para la fabricación de productos farmacéuticos, colorantes, polímeros, entre otros. Aunado a esto, los BTEX son utilizados como ingredientes inactivos en productos agroquímicos. Muchos pesticidas contienen niveles sustanciales de estos solventes en su formulación. Estos hidrocarburos pueden constituir entre el 7 y el 14% de la composición de un pesticida común. (Phelps y Young, 2001).

1.1.2 Propiedades fisicoquímicas del tolueno y demás hidrocarburos monoaromáticos

En la Tabla 1.1 se presentan algunas propiedades fisicoquímicas del tolueno y demás hidrocarburos monoaromáticos (Christensen y Elton, 1996). Los BTEX son compuestos no polares, razón por la cual son poco solubles en agua, pero solubles en solventes no polares como el éter. Se observa que el compuesto de menor peso molecular es el benceno, seguido del tolueno, los isómeros del xileno y el etilbenceno. Generalmente la solubilidad en agua de un compuesto disminuye al aumentar su peso molecular. Así pues, el benceno muestra mayor solubilidad que el tolueno y el resto de estos hidrocarburos. De hecho, se ha encontrado que de los hidrocarburos que componen los diversos productos de petróleo, el grupo de los BTEX son los compuestos más hidrosolubles (Evans y col., 1991). Como consecuencia los BTEX son los contaminantes más comunes de los cuerpos hídricos y mantos freáticos debido a derrames petroleros o a fugas en los tanques de almacenamiento de los distintos productos del petróleo. También se observa que estos compuestos son menos densos que el agua, lo que les da cierta flotabilidad en ésta. El menor coeficiente de partición octanol/agua se muestra en el benceno, el cual es seguido de tolueno. Los compuestos más polares tiene un coeficiente de partición más bajo. La constante de la ley de Henry es relativamente menor para benceno y tolueno. Estos valores describen el movimiento de un compuesto entre las fases agua y aire, los valores más bajos se presentan en los compuestos que tienden a mantenerse en la fase acuosa. Otra característica que presentan los BTEX, es que son compuestos relativamente resistentes a la oxidación, esto se debe básicamente a la estabilidad química que le confiere el anillo aromático (Gibson y Harwood, 2002).

Tabla 1.1 Características fisicoquímicas de los BTEX (Christensen y Elton, 1996).

	Benceno	tolueno	<i>m</i> -xileno	<i>o</i> -xileno	<i>p</i> -xileno	etilbenceno
Estructura Química						
Fórmula química	C ₆ H ₆	C ₇ H ₈	C ₈ H ₁₀	C ₈ H ₁₀	C ₈ H ₁₀	C ₈ H ₁₀
Peso molecular (g/mol)	78	92	106	106	106	106
Solubilidad en agua (mg/l)	1700	515	-	175	198	152
Presión de vapor (a 20° C) (mg Hg)	95.2	28.4	-	6.6	-	9.5
Densidad específica (a 20° C)	0.87	0.86	0.86	0.88	0.86	0.86
Coefficiente de partición octanol-agua a 20° C	2.13	2.69	3.2	2.77	3.15	3.15
Constante de la ley de Henry (a 25° C) (kPa m ³ /mol)	0.55	0.67	0.70	0.50	0.71	0.80
Punto de ebullición (° C)	80	111	144	139	138	136
Punto de fusión (° C)	5.5	- 95	- 25	- 4 8	13	-95
Polaridad	no polar	no polar	no polar	no polar	no polar	no polar

1.1.3 Toxicidad del tolueno

El tolueno es un compuesto considerado como un contaminante prioritario por la Agencia de Protección al Medio Ambiente en los Estados Unidos, ya que se ha observado que tiene efectos nocivos tanto en la salud humana y como en el medio ambiente (Frazer y col., 1995).

Se ha encontrado que este compuesto ejerce efectos negativos sobre los microorganismos, al alterar de forma drástica la estructura y función de las propiedades de la membrana. Diversos trabajos muestran que este hidrocarburo altera de forma considerable la parte lipídica de la membrana y en consecuencia, también afecta diversas proteínas que allí se localizan (Sikkema y col., 1995). Los efectos del tolueno también se observan en la pérdida de la fuerza proto motriz y daños notables en macromoléculas como RNA y proteínas (Heipieper y de Bont, 1994). Los efectos negativos del tolueno han sido mitigados por diversos mecanismos de tolerancia desarrollados por algunos microorganismos. Estudios en *Pseudomonas putida* S12 (Isken y de Bont, 1996), muestran que este microorganismo ha desarrollado un sistema de bombeo de solventes que es dependiente de energía. Este mecanismo le permite mantener al tolueno y otros solventes orgánicos fuera del interior celular. Los genes obtenidos por la caracterización e identificación molecular de esta posible bomba de expulsión, muestran una gran similitud con genes que codifican para proteínas que se conocen están involucradas en un sistema de expulsión de drogas (por ejemplo resistencia a antibióticos), la cual es dependiente de una fuerza proto motriz (Kieboom y col., 1998). Otro mecanismo de defensa fue observado por Kobayashi y col. (2000), en *Pseudomonas putida* IH 2000. Se encontró que la membrana externa de esta cepa secreta vesículas compuestas principalmente de fosfolípidos y lipopolisacáridos (donde se adhiere el tolueno), cuando es crecida con altas concentraciones de este hidrocarburo.

Respecto a los efectos del tolueno en humanos, los estudios indican que no es un compuesto carcinogénico (Dean, 1985). Aunque si muestra efectos nocivos sobre el sistema nervioso central. Se ha encontrado que la inhalación persistente del tolueno provoca daños a nivel del cerebelo y tallo cerebral (Fornazzari y col., 2003). También se ha observado que el abuso crónico de solventes como el thinner, que contiene una gran cantidad de tolueno (hasta 85% v/v), causa severos deterioros en diversos sistemas del cuerpo humano, incluyendo el cardiovascular, respiratorio, renal, hepático y sistema inmune (Fornazzari y col., 2003).

1.1.4 Métodos de eliminación de tolueno

Los métodos de eliminación de tolueno del agua los podemos dividir en dos grupos: fisicoquímicos y biológicos.

1.1.4.1 Métodos fisicoquímicos

Habitualmente el agua o suelos contaminados por BTEX son tratados por métodos convencionales. Muchos de estos tratamientos se basan en la inyección de aire en las zonas contaminadas. Este tipo de sistemas simplemente transfiere el problema de un medio a otro, en lugar de convertir el contaminante en un producto inocuo. Otra alternativa de tratamiento es el uso de carbón activado. En este proceso el agua contaminada es pasada a través del carbón activado donde el contaminante es adsorbido y posteriormente colectado. La efectividad de este proceso está relacionada con la magnitud del área superficial de carbón activado y las propiedades que muestra el contaminante tratado. Este tipo de tratamiento normalmente es usado para tratar bajas concentraciones de contaminantes (Christensen y Elton, 1996).

1.1.4.2 Métodos biológicos

A su vez los métodos biológicos los podemos dividir en aerobios y anóxicos.

1.1.4.2.1 Métodos aerobios

En las aguas industriales, donde se incluyen los efluentes residuales de refinería de petróleo, en general, se emplean sistemas de aireación, que permiten transferir el oxígeno desde la fase gas a la fase líquida donde es usado por la biomasa para oxidar la materia orgánica. Estos procesos a menudo incluyen sistemas de separación agua/aceite y la adición de productos químicos como coagulantes y floculantes (Chin, 1994). Sin embargo, el empleo de procesos aireados puede traer algunos inconvenientes cuando en las aguas residuales se encuentra una considerable cantidad de compuestos orgánicos volátiles, como es el caso de tolueno, puesto que en conjunción con la transferencia de oxígeno, los compuestos orgánicos volátiles pueden ser arrastrados desde la fase líquida a la atmósfera. Algunos estudios han mostrado que más del 30% de estos compuestos orgánicos pueden ser arrastrados, dependiendo del sistema de aireación empleado (Zytner y col., 1997). Las emisiones de estos compuestos contribuyen a la contaminación del aire y al deterioro de la capa de ozono (Parker y col., 1996). Aunado a esto, el tratamiento de aguas residuales por

métodos aerobios puede resultar costoso, debido principalmente al alto consumo de energía necesario para el suministro del oxígeno (Bischof y col., 1996).

Por otra parte, han sido ampliamente estudiados los aspectos de ecología microbiana y los mecanismos bioquímicos que emplean los microorganismos para llevar a cabo la oxidación de tolueno en presencia de oxígeno (Haigler y col., 1992; Duetz y col., 1994; Rozkov y col., 1998; León y col., 1999; Yerushalmi y col., 1999). Se ha observado que diversos microorganismos puede llevar a cabo la mineralización completa del tolueno hasta CO₂. Los mecanismos bioquímicos, también han sido estudiados. Se ha encontrado que durante la oxidación aerobia de este compuesto, los microorganismos emplean el oxígeno como reactante y como aceptor final de electrones. Durante este proceso, enzimas como las monooxigenasas y dioxigenasas incorporan uno o dos átomos de oxígeno en el anillo aromático, haciéndolo susceptible para su posterior oxidación. Las principales reacciones catalizadas por la dioxigenasa incluyen el rompimiento del doble enlace aromático que puede estar localizado ya sea entre dos átomos de carbono hidroxilado (ruta *orto*), o bien, adyacente al átomo de carbono hidroxilado (ruta *meta*) (Wilson y Bouwer, 1997). Al respecto, se han identificado cinco rutas de oxidación de tolueno, las cuales fueron compiladas en el trabajo de Gulensoy y Alvarez (1999), y son presentadas en la Figura 1.1. La primera ruta fue hallada en el plasmido TOL, en *Pseudomonas putida* PaW1 (Williams y Murray, 1974), donde se observó que la oxidación del tolueno es iniciado por el ataque al grupo metil, lo que más tarde da lugar a la formación de catecol, el cual es posteriormente sometido a una ruptura *meta*. La segunda ruta identificada, en *Pseudomonas putida* F1, usa dioxigenasas para adicionar dos átomos de oxígeno al anillo aromático (Spain y Gibson, 1988). En *Pseudomonas cepacia* G4 se encontró la tercera ruta, en donde la oxidación de tolueno es iniciada por una *orto*-monooxigenasa para formar *o*-cresol (Shields y col., 1989). La cuarta ruta ocurre en *Pseudomonas pickettii* PK01, donde se encontró que usa una *meta*-monooxigenasa para producir *m*-cresol (Olsen y col., 1994). La quinta ruta fue encontrada en *Pseudomonas mendocina* KR1, donde se observó que el tolueno es atacado por una *para*-monooxigenasa para generar *p*-cresol (Whited and Gibson, 1991). Posteriormente este compuesto es sometido a una ruptura *orto*.

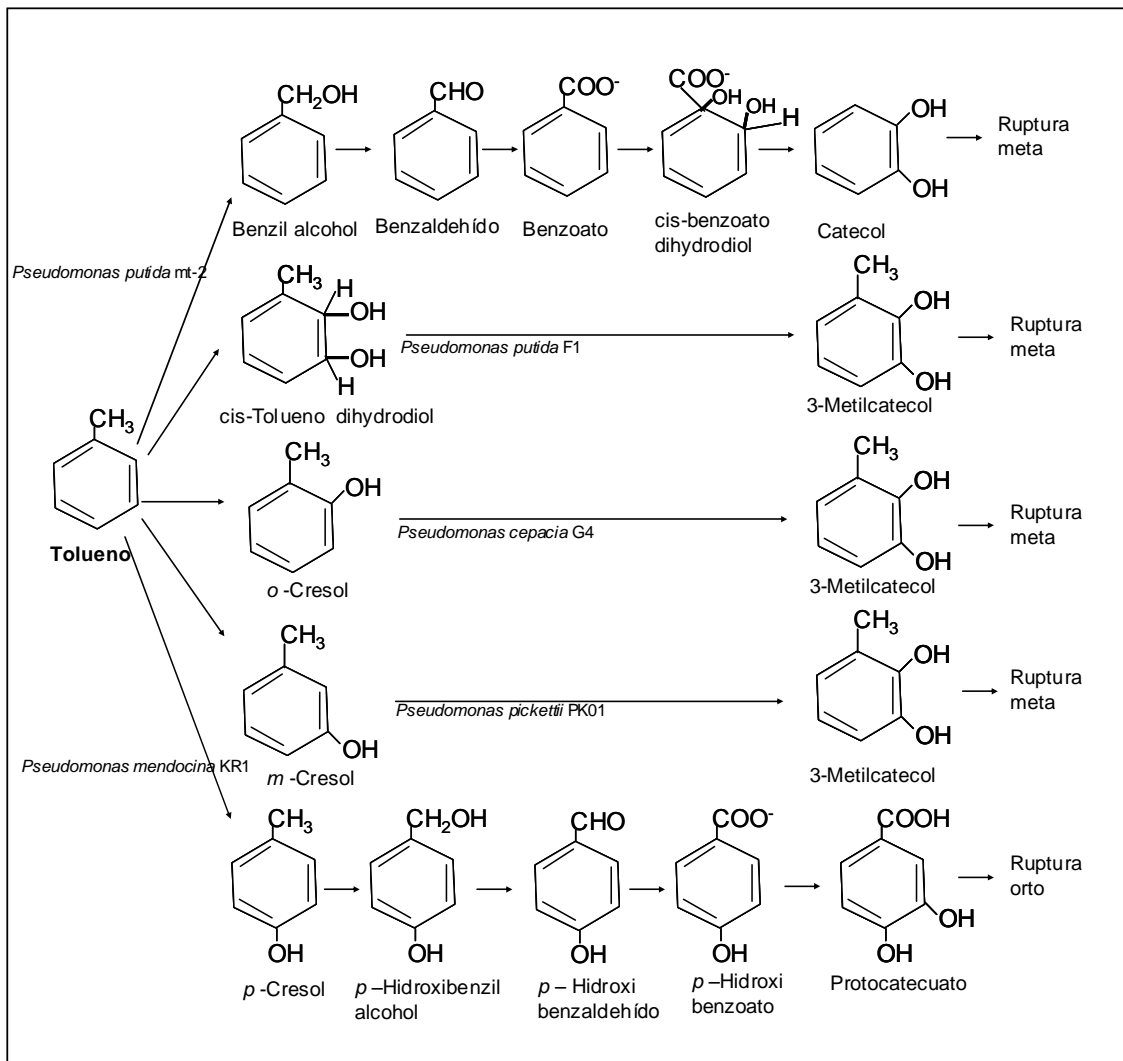


Figura 1.1 Diversas rutas aerobias que emplean microorganismos del género *Pseudomonas* para la oxidación de tolueno (Gulensoy y Alvarez, 1999).

A pesar de la variedad de rutas de oxidación de tolueno y de los microorganismos que la llevan a cabo, se ha observado que durante la oxidación aerobia de este compuesto y demás hidrocarburos monoaromáticos, se generan tres intermediarios comunes: el catecol, el protocatecuato y el gentisato, posteriormente estos compuestos, son transformados a intermediarios de algunas rutas oxidativas, por ejemplo el ciclo del ácido cítrico o de la β -oxidación, como son el fumarato, piruvato o acetato, entre otros. Finalmente, estos compuestos son asimilados por la célula u oxidados hasta CO_2 (Parés y Juárez, 1997).

1.1.4.2.2 Métodos anóxicos

Anteriormente se pensaba que la oxidación de los hidrocarburos monoaromáticos, incluyendo al tolueno, sólo era factible mediante condiciones aerobias. La mayoría de los estudios de laboratorio solían hacerse bajo estas condiciones. Los trabajos en campo también mantenían esta tendencia. Sin embargo, la baja solubilidad del oxígeno y los altos costos que puede implicar el aporte de éste en los sitios contaminados, ha llevado al estudio de otras alternativas de eliminación.

Trabajos realizados en los últimos años, muestran que una variedad de microorganismos son capaces de metabolizar diversos hidrocarburos bajo condiciones anóxicas. Estos microorganismos han desarrollado rutas alternas independientes del oxígeno, para la oxidación de estos compuestos. Así, se ha encontrado que estos microorganismos pueden oxidar el tolueno bajo condiciones metanogénicas (Grbic-galic y Vogel, 1987; Edwards y Grbic-Galic, 1994), sulfatoreductoras (Beller y col., 1992; Edwards y col., 1992), hierroreductoras (Lovley y Lonergan, 1990; Lovley y col., 1994), y desnitrificantes (Biergert y Fuchs, 1995, Phelps y Young, 1999, Pelz y col., 2001). El tolueno es un compuesto reducido, los equivalentes reductores generados durante su oxidación necesitan ser transferidos a un aceptor de electrones con un potencial redox más positivo que permita la conservación de energía para los microorganismos. En la Tabla 1.2, se muestran las Ecuaciones con la estequiometría y la energía libre generada cuando los microorganismos emplean aceptores de electrones distintos al oxígeno.

Tabla 1.2 Estequiometría y energía libre generada por la oxidación de tolueno en procesos anóxicos (Heider y col., 1999).

Proceso anóxico	$\Delta G^{\circ} = \text{KJ/mol tolueno}$
Metanogénesis: $\text{C}_7\text{H}_8 + 7.5 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 4.5 \text{CH}_4 + 2.5 \text{HCO}_3^- + 2.5 \text{H}^+$	- 131
Sulfatoreducción: $\text{C}_7\text{H}_8 + 4.5 \text{SO}_4^{2-} + 3 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 7 \text{HCO}_3^- + 2.5 \text{H}^+ + 4.5 \text{HS}^-$	- 205
Hierroreducción: $\text{C}_7\text{H}_8 + 94 \text{Fe}(\text{OH})_3 \rightarrow 7 \text{FeCO}_3 + 29 \text{Fe}_3\text{O}_4 + 145 \text{H}_2\text{O}$	- 3398
Desnitrificación: $\text{C}_7\text{H}_8 + 7.2 \text{NO}_3^- + 0.2 \text{H}^+ \rightarrow 7 \text{HCO}_3^- + 3.6 \text{N}_2 + 0.6 \text{H}_2\text{O}$	- 3554

Como se puede observar, la mineralización de tolueno en condiciones anóxicas resulta un proceso termodinámicamente factible. Las energías libres muestran un proceso exergónico, adecuado para las necesidades metabólicas de los microorganismos. Estos procesos pueden ser una alternativa para sitios contaminados deficientes en oxígeno.

1.2 Eliminación de nitrógeno

1.2.1 Ciclo del nitrógeno

El nitrógeno está presente en la naturaleza en numerosos estados de oxidación, la interconversión entre estos estados es predominantemente biológica. De manera general, el ciclo de este elemento (Figura 1.2), empieza con el proceso de fijación de nitrógeno molecular y es regresado a la atmósfera mediante la desnitrificación.

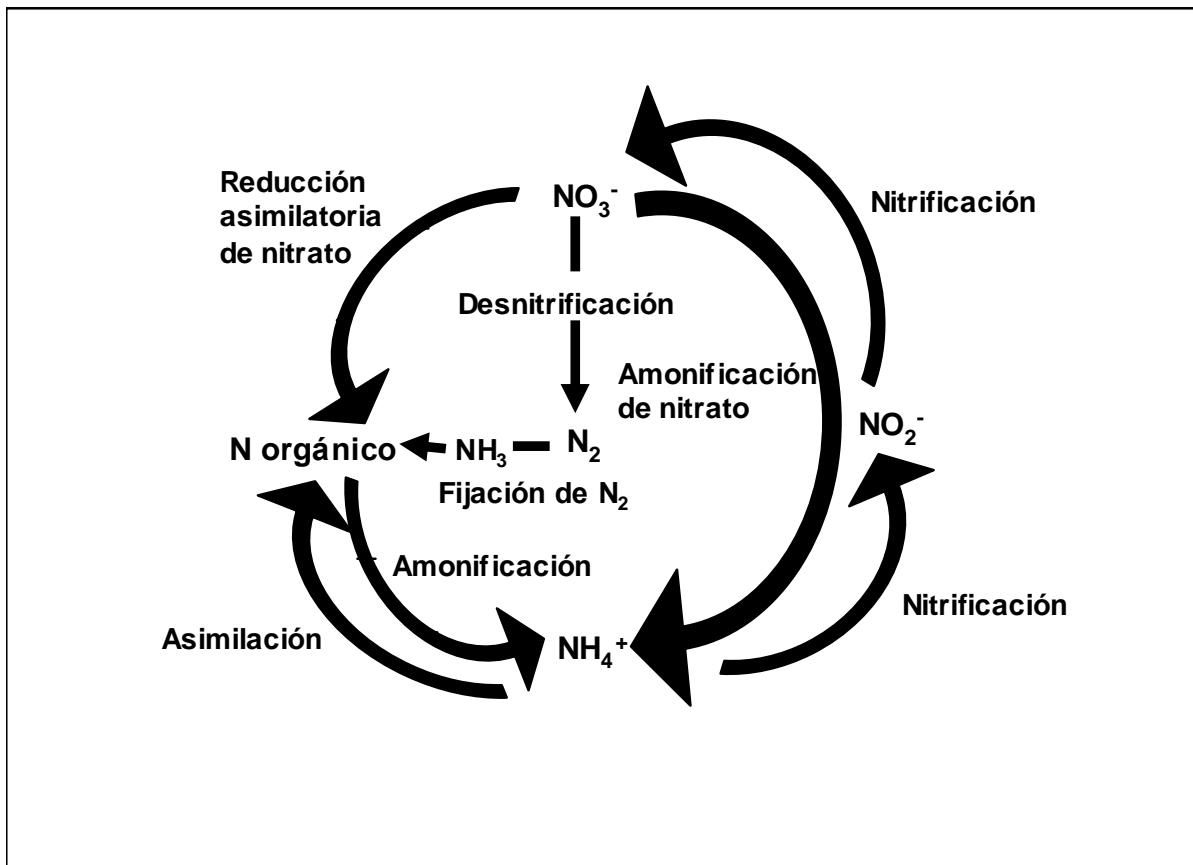


Figura 1. 2 Ciclo del nitrógeno (Prescott y col., 1999).

La fijación de nitrógeno molecular es realizada por procariontas aerobios y anaerobios y no tiene lugar en los eucariotas (Madigan y col., 1998). Aunque en menor grado también puede ocurrir químicamente en la atmósfera a través de descargas eléctricas o puede ser fijado

industrialmente por el hombre para la producción de fertilizantes nitrogenados, mediante el denominado proceso de Haber (Dickson, 1980). El amoníaco, producto de la fijación del nitrógeno, es incorporado a la materia orgánica en forma de amina. La descomposición de la materia orgánica conduce a la formación de amonio por el proceso de amonificación. El amonio, a su vez, puede retornar a formas orgánicas o puede ser oxidado por microorganismos aerobios para formar nitrato (nitrificación). El nitrógeno en forma de nitrato, puede ser asimilado por los microorganismos o ser reducido mediante dos formas desasimilativas. Una vía ocurre mediante la reducción desasimilativa de nitrato a amonio y la otra, que es realizada por bacterias desnitrificantes, implica la reducción de nitrato hasta nitrógeno molecular, cerrando de esta forma el ciclo (Prescott y col., 1999).

Se puede observar que mediante este ciclo, los microorganismos establecen el equilibrio de los distintos compuestos nitrogenados presentes en el ambiente y a su vez obtienen la energía necesaria para llevar a cabo sus necesidades metabólicas. Sin embargo, la alteración del ciclo puede provocar la acumulación de distintos intermediarios nitrogenados que traen como resultado, efectos nocivos para la salud y el medio ambiente. Al respecto, se estima que en los últimos 100 años, la actividad humana ha duplicado la cantidad de nitrógeno presente en el globo terrestre (Bremen, 2002). En consecuencia, el nitrógeno en sus distintas formas ha contribuido a la contaminación atmosférica, de suelos y de cuerpos de agua.

1.2.2 Métodos fisicoquímicos para la eliminación de nitrógeno

Los principales procesos fisicoquímicos usados para la eliminación de nitrógeno en aguas residuales son el arrastre con aire, el rompimiento por cloración y el intercambio selectivo de iones (Weston, 1984). Sin embargo, su uso es limitado por sus altos costos y por los problemas de manejo y operación que se pueden presentar, aunado a esto, sólo trasladan el contaminante de un lugar a otro. A continuación se describen brevemente, cada uno de estos procesos:

1.2.2.1 Arrastre con aire:

Mediante este proceso, el nitrógeno es removido por la volatilización del gas amoníaco. El sistema es simple pero tiene algunas desventajas, la eficiencia del proceso de remoción depende de valores altos de pH (10.5 a 11.5) y además resulta costoso por el manejo y operación que implica la inyección de aire (Metcalf y Eddy, 1991).

1.2.2.2 Rompimiento por cloración:

Este proceso implica la adición de cloro a las aguas residuales para oxidar el nitrógeno disuelto en forma de amonio hasta nitrógeno molecular. Un problema que se puede presentar con este proceso es la alta concentración de cloro en las aguas residuales, que resulta tóxico para los organismos acuáticos (Weston, 1984).

1.2.2.3 Intercambio de iones:

En este proceso se pueden emplear resinas sintéticas o naturales como la zeolita. Cuando los sitios de intercambio han sido reemplazados, la resina debe regenerarse por la adición de algunos productos químicos, por ejemplo el hidróxido de sodio. El intercambio iónico tiene una aplicación limitada debido principalmente a la vida media del intercambiador iónico y al complejo sistema de regeneración del mismo (Metcalf y Eddy, 1991).

1.2.3 Métodos biológicos de eliminación de nitrógeno.

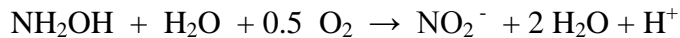
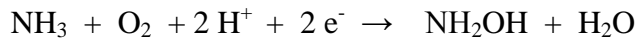
Los sistemas biológicos de eliminación de nitrógeno de las aguas residuales involucran dos procesos: la nitrificación, donde se lleva a cabo la oxidación de amonio a nitrato por microorganismos aerobios y la desnitrificación, realizada predominantemente por bacterias anóxicas que catalizan la reducción de nitrato hasta nitrógeno molecular.

1.2.3.1 Nitrificación

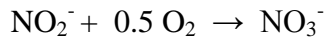
La nitrificación es un proceso importante ya que oxida el amonio de las aguas residuales, un producto tóxico para muchas especies acuáticas. Las bacterias que catalizan este proceso, son aerobias gramnegativas y están ampliamente distribuidas en agua y suelo, Estos microorganismos pertenecen a la familia de las Nitrobacteriáceas y están divididos en dos grupos: las amonio oxidantes, donde se encuentra los géneros *Nitrosomonas*, *Nitrosospira*, *Nitrosococcus* y *Nitrosolobus* y las nitrito oxidantes, donde se encuentran géneros como *Nitrobacter*, *Nitrosospira* y *Nitrococcus* (Parés y Juárez, 1997).

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

Primera etapa:



Segunda etapa:



En la primera fase, la oxidación de amoníaco requiere oxígeno molecular, en esta participa una monooxigenasa unida a membrana que usa NADH como donador de electrones. El producto es la hidroxilamina y en esta etapa no se genera energía. La hidroxilamina es oxidada posteriormente a nitrito, por la enzima hidroxilamina oxido reductasa, en esta etapa se produce ATP mediante fosforilación del transporte de electrones a través del sistema de citocromos. En la segunda etapa, la enzima nitrito oxidasa cataliza la oxidación de nitrito a nitrato. Durante esta reacción, los electrones son transportados hasta el oxígeno a través de los citocromos, generándose ATP en la fosforilación por transporte de electrones (Madigan y col., 1998). Se ha observado que estas enzimas y en general el proceso nitrificante, es afectado por factores como el pH, la relación amonio:amoníaco y las altas concentraciones de materia orgánica (Hanaki y col., 1990; Eilersen y col., 1994).

1.2.3.2 Desnitrificación

El nitrógeno fijado en la biosfera, es decir el nitrógeno orgánico, es regresado a la atmósfera en forma de nitrógeno molecular por las bacterias desnitrificantes. Esta última fase del ciclo, es importante en la eliminación de algunos intermediarios tóxicos. Entre estos intermediarios se encuentra el nitrato que es causante de metahemoglobinemia en infantes, nitrito que puede dar origen a nitrosaminas (compuestos cancerígenos), el óxido nítrico que es un radical muy reactivo con moléculas biológicas y el óxido nitroso, que es uno de los gases que contribuyen al efecto invernadero (Mateju y col., 1992; Wicht, 1996).

1.2.3.2.1 Microbiología de la desnitrificación

La mayoría de las bacterias desnitrificantes son microorganismos gramnegativos, predominantemente en forma de bacilo, aunque se pueden encontrar otros tipos morfológicos. Estos microorganismos están distribuidos en diversos grupos taxonómicos. Algunos de los géneros citados en la literatura, se muestran en la Tabla 1.3 (Payne, 1981).

Tabla 1.3 Algunos géneros que incluyen bacterias desnitrificantes

Familia	Género	Característica
Alcaligenaceae	<i>Achromobacter</i>	Bacilos, gramnegativos
Rhizobiaceae	<i>Agrobacterium</i>	Bacilos, gramnegativos
Alcaligenaceae	<i>Alcaligenes</i>	Bacilos, gramnegativos
Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	Bacillos, grampositivos
Neisseriaceae	<i>Chromobacterium</i>	Bacilos, gramnegativos
Neisseriaceae	<i>Neisseria</i>	Cocos, gramnegativos
Rhodobacteriaceae	<i>Paracoccus</i>	Cocos, gramnegativos
Propionibacteriaceae	<i>Propionibacterium</i>	Bacilos, grampositivos
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	Bacilos, gramnegativos
Bradyrhizobiaceae	<i>Rhodopseudomonas</i>	Bacilos, gramnegativo
Rhizobiaceae	<i>Rhizobium</i>	Bacilos, gramnegativos
Hydrogenophilaceae	<i>Thiobacillus</i>	Bacilos, gramnegativos

La desnitrificación es un proceso respiratorio donde la reducción de nitrato a nitrógeno molecular requiere de la presencia de una fuente de electrones. Algunas especies son fotosintéticas, como es el caso de *Rhodopseudomonas sphaeroides*, otras como *Thiobacillus desnitificans* puede utilizar hidrógeno o compuestos reducidos de azufre como fuente de energía (litótrofos) y muchas otras pueden utilizar diversas fuentes orgánicas (organótrofos o heterótrofos) (Parés y Juárez, 1997). Entre las fuentes orgánicas que pueden consumir, se encuentra el glicerol (Akuna y col., 1993), glucosa (Cuervo-López y col., 1999), ácidos grasos volátiles (Rijn y col., 1996), etanol (Pérez, 1998), polyvinil alcohol (Watanabe y col., 1995), e incluso compuestos difíciles de oxidar como los derivados del petróleo (Spormanm y Widdel, 2000). En el caso de la desnitrificación heterotrófica, la reacción se representa con la siguiente Ecuación (Reyes, 2000).



En esta se puede distinguir un proceso que permite transformar de forma simultánea contaminantes carbonados y nitrogenados a productos inocuos como CO₂ y N₂.

1.2.3.2.2 Bioquímica de la desnitrificación

La desnitrificación es un proceso secuencial: primero se reduce el nitrato a nitrito, posteriormente el nitrito se transforma a óxido nítrico, éste se reduce a óxido nitroso y por último el óxido nitroso se reduce a nitrógeno molecular. Cada una de estas etapas son catalizadas por distintas enzimas (Zumft, 1997). Estas etapas, así como las enzimas que intervienen en cada una de ellas, son esquematizadas en la Figura 1.3.

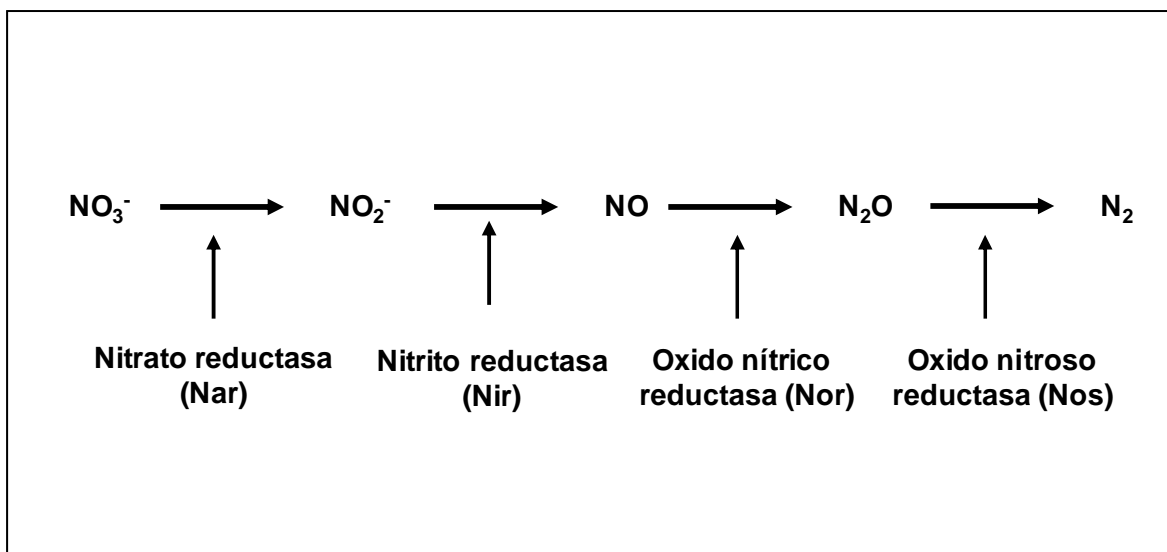


Figura 1.3. Etapas de la desnitrificación y enzimas involucradas en cada una de éstas.

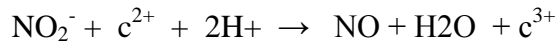
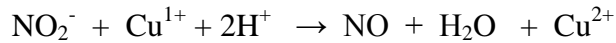
La primera reacción de la desnitrificación es la reducción de nitrato a nitrito por la enzima nitrato reductasa (Nar). La reacción se representaría de la siguiente manera (Jetten y col., 1997).



En *Pseudomonas denitrificans* se han identificado dos tipos de nitrato reductasa, que emplean molibdeno como cofactor. Una enzima está unida a la membrana, usa ubiquinona como donador de electrones y está constituida por tres subunidades (120, 60 y 20 kDa). La otra enzima, se encuentra en el periplasma, su donador de electrones es desconocido y consta de dos subunidades (94 y 19 kDa) (Bell y col., 1990). También se ha observado que la enzima unida a la membrana solo se expresa bajo condiciones anóxicas, mientras que la otra, puede ser sintetizada y activada en presencia de oxígeno (Siddiqui y col., 1993). Aunque se desconoce el mecanismo de acción de ambas enzimas, se piensa que la reducción

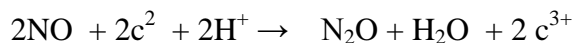
de nitrato a nitrito tiene lugar en el centro molibdeno, donde éste cambia de un estado redox de Mo (IV) a Mo (VI) (Jetten y col., 1997).

La reducción de nitrito a óxido nítrico, está dada por la enzima nitrito reductasa (Nir). Su reducción se expresaría de la siguiente forma:



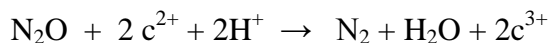
Se han identificado dos clases de nitrito reductasas, una contiene cobre (Nir-Cu) y la otra contiene un citocromo hemo (Nir-cd₁). La primera está constituida por un homotrímero, con subunidades de 36 kDa, y dos átomos de cobre por monómero. La otra contiene un citocromo cd₁, que consiste de un homodímero de 64 kDa por subunidad, donde cada monómero contiene un hemo c y un hemo d₁. Las dos enzimas son funcional y fisiológicamente similares (Glockner y col., 1993). Aunque por razones desconocidas son mutuamente excluyentes.

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



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

La última etapa del proceso respiratorio desnitrificante consiste en la reducción del óxido nitroso a nitrógeno molecular, catalizada por la óxido nitroso reductasa (Nos). Esta se esquematiza en la siguiente Ecuación:



Se ha encontrado que esta etapa puede ser considerada como un proceso respiratorio por sí mismo, ya que muchas bacterias desnitrificantes son capaces de usar el óxido nitroso como único aceptor de electrones durante la oxidación de la materia orgánica (Zumft, 1997).

La Nos es una enzima periplásmica que se ha purificado de diferentes microorganismos, sin embargo no se ha podido cristalizar. Uno de los problemas principales es que la enzima es lábil al oxígeno (Otte y col., 1996). La enzima purificada es un homodímero de aproximadamente 70 kDa, cada subunidad contiene 4 átomos de cobre, los cuales están organizados en dos diferentes centros dinucleares, CuA y CuZ. El centro CuA, es el sitio de entrada de electrones, mientras que el centro CuZ, se piensa que es el sitio de reducción del óxido nítrico, aunque no existen experimentos directos que así lo sustenten (Jetten y col., 1997).

1.2.3.2.3 Factores que afectan la desnitrificación

Como se puede observar, la respiración con nitrato es un proceso complejo realizado por una serie de enzimas que se encargan de catalizar cada una de las reacciones. Los mecanismos de acción son fuertemente regulados por la presencia de oxígeno y la concentración de sustrato. Otros factores ambientales que también influyen en el desarrollo de un proceso desnitrificante eficaz, son: la relación C/N, la fuente de energía, el pH y la temperatura.

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

Por otro lado, se ha observado que la expresión de las enzimas desnitrificantes está ampliamente influenciada por la presencia de los sustratos nitrogenados. Estudios en *Pseudomonas aeruginosa* mostraron que la expresión de la enzima nitrito reductasa estuvo en función de la concentración de nitrato. Estos autores encontraron bajos niveles de expresión de la enzima nitrito reductasa en ausencia de nitrato cuando fue sometida a condiciones aerobias y anaerobias. Sin embargo, altos niveles de producción de esta enzima fueron obtenidos en presencia de nitrato, aún bajo condiciones aerobias (Zennaro y col., 1993).

Otro factor importante que puede orientar la desnitrificación hacia un proceso desasimilativo es la relación carbono/nitrógeno (C/N). Se ha observado que esta variable está relacionada con la acumulación de los compuestos involucrados en la desnitrificación, e incluso puede encausar hacia la desasimilación reductiva de nitrato a amonio (DNRA). En términos generales, el establecimiento experimental del valor de la C/N, radica en su valor estequiométrico. Considerando lo anterior se pueden distinguir tres zonas: 1) C/N menor a la estequiométrica, que genera una desnitrificación incompleta; 2) C/N estequiométrica donde la desnitrificación es completa y 3) C/N mayor a la estequiométrica que implica una desnitrificación completa y materia orgánica residual (Cuervo-López, 2003). Por citar un ejemplo, Akuna y col. (1994), empleando glucosa como fuente de carbono a distintos valores de C/N (1.3 y 5.6), muestran que a medida que la relación C/N desciende, la generación de amonio decrece. En otro trabajo, presentado por Oh y Silverstein (1999), trabajando con reactores desnitrificantes de lote secuenciado, con acetato como fuente de carbono, se observó que a una relación C/N de 1:1, se presentó una acumulación de nitrito del 30%. En cambio cuando la relación C/N estuvo en 2:1 y 3:1, el nitrato fue consumido sin presentarse acumulación de nitrito. Sin embargo, en la última relación mencionada se observa una notable concentración de acetato no consumido. Respecto a la desasimilación reductiva de nitrato a amonio, Akuna y col. (1993), encontraron que ésta fue beneficiada cuando en el proceso desnitrificante se empleó glucosa y glicerol como fuentes de carbono, mientras que con ácido acético, ácido láctico y metanol, predominó la desnitrificación.

La fuente de electrones también parece influir en la acumulación de algunos intermediarios nitrogenados como el nitrito, debido a cierta competencia que parece existir entre las enzimas nitrato y nitrito reductasas por la fuente de energía. Estudios realizados por Rijn y

col. (1996), con *Pseudomonas stutzeri*, mostraron mayor acumulación de nitrito cuando se empleó acetato como fuente de energía, que cuando se usó butirato. Ellos también observaron que el butirato fue consumido más lentamente que el acetato, por lo que arguyen que en presencia de nitrato y nitrito, los electrones del acetato fluyen preferentemente hacia la nitrato reductasa, mientras que los electrones generados por el butirato reducen más rápidamente la nitrito reductasa que la nitrato reductasa.

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

Respecto a la temperatura, se han observado las velocidades de desnitrificación muy bajas y constantes a 5° C, mientras que a 20° C las velocidades son constantes y mayores. Las temperaturas recomendables para mantener velocidades desnitrificantes adecuadas, oscilan entre 20 y 35° C (Cuervo-López, 2003).

1.3 Referencias

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Dean, B. J. (1985). Recent findings on the genetic toxicology of benzene, toluene, xylenes and phenols. Mutat. Res. **154**: 153-181.

Dickson, T. R. (1980). Química: enfoque ecológico. Editorial Limusa.

Duetz, W. A., de Yong, C., Williams, P. A. and Van Aniel, J. G. (1994). Competition in chemostat culture between *Pseudomonas* Strains the use different pathways for the degradation of toluene. Appl. Environ. Microbiol. **60**(8): 2858-2863.

Edwards, E. A., Wills, L. E., Reinhard, M. and Grbic-Galic, D. (1992). Anaerobic degradation of toluene and xylene by aquifer microorganisms under sulfate-reducing conditions. Appl. Environ. Microbiol. **58**: 794-800.

Edwards, E. A. and Grbic-Galic, D. (1994). Anaerobic degradation of toluene and *o*-xylene by a methanogenic consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**(1): 313-322.

Eirlensen, A. M., Henze, M. and Klotz, L. (1994). Effect of volatile fatty acids and trimethylamine on nitrification in activated sludge. *Wat. Res.* **28**: 1329-1336.

Evans, P. J., Mang, D. T. and Young, L. Y. (1991). Degradation of toluene and *m*-xylene and transformation of *o*-xylene by denitrifying enrichment cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**(2): 450-454.

Fornazzari, L., Pollanen, M. S., Myers, V. and Wolf, A. (2003). Solvent abuse-related toluene leukoencephalopathy. *Journal of Clinical Forensic Medicine.* **10**: 93-95.

Frazer, A. C., Coschigano, P.W. and Young, L. Y. (1995). Toluene metabolism under anaerobic conditions: A review. *Anaerobe.* **1**: 293-303.

Gibson, J. and Harwood, C. S. (2002). Metabolic diversity in aromatic compound utilization by anaerobic microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**: 345-369.

Glockner, A. B., Jungst, A. and Zumft, W. G. (1993). Copper- containing nitrite reductase from *Pseudomonas aureofaciens* is functional in a mutationally cytochrome *cd1*-free background (NirS-) of *Pseudomonas stutzeri*. *Arch. Microbiol.* **160**: 18-26.

Grbic-Galic, D., and T. M. Vogel. (1987). Transformation of toluene and benzene by mixed methanogenic cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 254-260.

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

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

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

Heider, J., Spormann, A. M., Beller, H. R. and Widdel, F. (1999). Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. *FEMS Microbiol. Rev.* **22**: 459-473.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

León, E., Seignez, C., Adler, N. and Peringer, P. (1999). Growth inhibition of biomass adapted to the degradation of toluene and xylenes in mixture in a batch reactor with substrates supplied by pulses. Biodegradation. **10**: 245- 250.

Lovley, D. R. and Lonergan, D. J. (1990). Anaerobic oxidation of toluene, phenol and *p*-cresol by the dissimilatory iron-reducing organisms GS-15. Appl. Environ. Microbiol. **56**: 1858-1864.

Lovley, D. R., Woodward, J. C. and Chapelle, F. H. (1994). Stimulated anoxic biodegradation of aromatic hydrocarbons using Fe(III) ligands. Nature. **370**: 128-131.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pérez, J. T. (1998). Estudio y evaluación del efecto del pH y la fuente de electrones en la desnitrificación en estado estacionario. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México.

Phelps, C. D. and Young, L. Y. (1999). Anaerobic biodegradation of BTEX and gasoline in various aquatic sediments. *Biodegradation.* **10**: 15-25.

Phelps, C. D., and Young, L. Y. (2001). Biodegradation of BTEX under anaerobic conditions: A review. *Advances in Agronomy*. **70**: 329-357.

Prescott, L. M., Harley, J. P. and Klein, D. A. (1999). *Microbiología*. Editorial McGraw-Hill-Interamericana.

Poughon, L., Dussap, C. G. and Gros, J. B. (2001). Energy model and metabolic flux analysis for autotrophic nitrifiers. *Biotech. and Bioeng.* **72**(4): 416-433.

Reyes, J. A. (2000). Eliminación biológica de nitrógeno, carbono y azufre por desnitrificación. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México.

Rijn, J. V., Tal, Y. and Barak, Y. (1996). Influence of volatile fatty acids on nitrite accumulation by a *Pseudomonas Stutzeri* strain isolated from a denitrifying fluidized bed reactor. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**(7): 2615-2620.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

JUSTIFICACIÓN

La contaminación del agua en los sistemas de almacenamiento, así como en las fuentes de abastecimiento subterráneas y superficiales, es un hecho que ocurre con relativa frecuencia. La contaminación del agua produce un cambio en sus características organolépticas que induce al rechazo de los consumidores y su ingestión representa un riesgo para la salud. Asimismo, el ecosistema puede sufrir alteraciones debidas al impacto negativo de los contaminantes sobre sus diferentes componentes. Uno de los contaminantes importantes son los hidrocarburos del petróleo, donde se encuentran los BTEX, compuestos considerados como prioritarios por Agencia de Protección al Medio Ambiente de los Estados Unidos. Estos compuestos tienen efectos negativos en los cuerpos de agua y en humanos pueden provocar diversos daños que van desde alteraciones al sistema nervioso central, como es el caso del tolueno hasta el cáncer donde se ha vinculado al benceno. La contaminación por estos compuestos es provocada básicamente por derrames petroleros o por fugas en los tanques donde se almacenan productos derivados de este, como la gasolina o el diesel.

Otro de los contaminantes importantes es el nitrógeno, este se puede presentar en el agua formando diversos compuestos, que de igual forma actúan de forma negativa a nivel ambiental o en el ser humano. Por ejemplo, el nitrato es uno de los contribuyentes a la eutroficación de cuerpos de agua, también puede provocar metahemoglobinemia en infantes. El nitrito puede dar origen a compuestos carcinogénicos como las nitrosaminas, el óxido nítrico un radical muy reactivo con moléculas biológicas y el óxido nitroso que es uno de los gases que contribuyen al efecto invernadero.

Una opción viable para el tratamiento de las aguas contaminadas por BTEX, en nuestro caso particular por tolueno y compuestos nitrogenados es la desnitrificación biológica, donde es posible la eliminación simultánea de carbono y nitrógeno. Al respecto, se han realizado diversos estudios sobre la eliminación de tolueno por desnitrificación, con el objeto de ampliar el conocimiento de este proceso. Cabe mencionar que la mayoría de los estudios se venían realizando en sistemas aerobios, sin embargo en los últimos años los procesos anóxicos han tomado especial interés. Por otro lado, gran parte de los estudios en sistemas anóxicos se han realizado en cultivos en lote y en sistemas continuos los estudios son escasos.

Basados en lo anterior, el presente trabajo pretende contribuir al conocimiento de la eliminación del tolueno por un consorcio desnitrificante en un cultivo en continuo.

3. OBJETIVOS

General:

Evaluar y entender el efecto del tolueno sobre el proceso respiratorio de un consorcio desnitrificante en un reactor en continuo

Específicos:

Alcanzar un estado fisiológicamente estable de un consorcio desnitrificante en un reactor UASB alimentado en continuo con acetato y nitrato como fuente de carbono y nitrógeno, respectivamente.

Establecer un estado fisiológicamente estable de un consorcio desnitrificante de un reactor UASB alimentado en continuo con tolueno y acetato como fuentes de carbono

Evaluar el efecto del aumento gradual de las velocidades de carga de tolueno sobre el proceso respiratorio de un consorcio desnitrificante.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 MATERIALES

4.1.1 Diseño y operación del reactor UASB.

Los experimentos se llevaron a cabo en un reactor anaerobio de lecho de lodos con flujo ascendente (UASB: Upflow Anaerobic Sludge Blanket), operado en continuos. El reactor UASB fue construido de vidrio y presentó las siguientes características: 50 cm de largo y 6.6 cm de diámetro interno. La parte superior del reactor tiene un estrechamiento con la finalidad de dirigir las burbujas del gas generado a la campana separadora de líquido-gas-biomasa (Figura 4.1).

El reactor fue mantenido a una temperatura de 30° C mediante un calentador Termo Haake (mod. B3) que conduce agua a temperatura constante hasta la chaqueta del reactor. El flujo a tratar en el reactor fue adicionado por una bomba Masterflex con velocidad fija de 2 rpm (Cole parmer, mod. 7543-02). La bomba fue controlada por un temporizador, para mantener un tiempo de residencia hidráulico (TRH) de 2 días. El reactor fue operado sin control de pH. Como se observa en la Figura 4.1, el recipiente de alimentación con la fuente de carbono(acetato y tolueno) fue mantenido a una temperatura de $5 \pm 2^\circ \text{C}$ mediante un refrigerante, con el fin de evitar la pérdida del compuesto por volatilización. Para la medición del biogas, la campana separadora líquido-gas-biomasa del reactor, estaba conectada a una columna de vidrio invertida con una solución saturada de cloruro de sodio a pH 3, para evitar que el CO_2 producido se disolviera en el líquido.

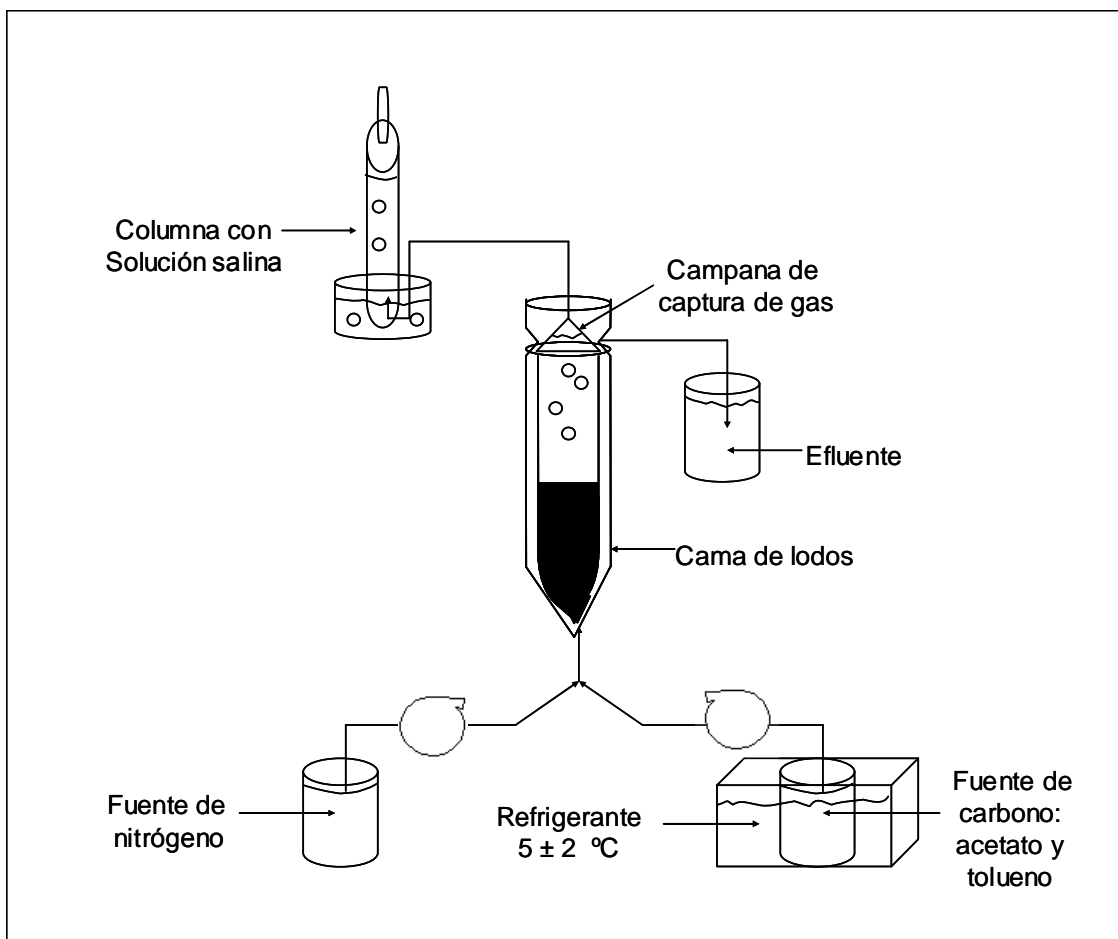


Figura 4.1 Esquema del reactor desnitrificante UASB

4.1.2 Inóculo

Como inóculo se utilizaron lodos anaerobios provenientes del reactor UASB de la planta de tratamiento de aguas residuales de la Universidad Autónoma Metropolitana. Las características de éstos son presentadas en la Tabla 4.1. Antes de inocular, los lodos se lavaron con una solución isotónica de cloruro de sodio (8.5 g/l). Los experimentos se iniciaron con una concentración de sólidos suspendidos volátiles de 4.5 g/l.

Tabla 4.1 Concentración de lodos de la planta de tratamiento de aguas residuales

Sólidos suspendidos (SS)	g/l
Volátiles (SSV)	15.22
Fijos (SSF)	20.30
Totales (SST)	35.50

4.1.3 Medio de cultivo

Se utilizó un medio de cultivo heterotrófico que fue preparado en dos soluciones (solución 1 y 2) por separado, con el fin de evitar contaminación, así como la precipitación de algún compuesto. En la solución 1, se disolvió la fuente de carbono y electrones (acetato y tolueno, según el caso), y en la solución 2, la fuente de nitrógeno (NaNO_3). La composición completa de las soluciones se muestra en la Tabla 4. 2.

Tabla 4.2 Composición química del medio de cultivo

Solución 1	(g/l)	Solución 2	(g/l)
KH_2PO_4	3.0	FeCl_3	0.1
$\text{CaCl}_2 \cdot 2(\text{H}_2\text{O})$	0.6	$\text{CuSO}_4 \cdot 5(\text{H}_2\text{O})$	0.06
NaMoO_4	0.06	Fuente de nitrógeno	
MgSO_4	0.6		
Fuente de carbono y electrones			

4.2 Cultivo

El desarrollo experimental del trabajo fue planteado en dos etapas. La primera etapa consistió en el arranque del reactor UASB y estabilización de los lodos desnitrificantes hasta alcanzar y mantener el estado estacionario (EE). Para lograr lo anterior, el reactor fue alimentado con acetato de sodio empleado como fuente de carbono y energía a una velocidad de carga carbonada de 250 mg C-acetato/l.d, y una velocidad de carga nitrogenada de 178 mg N-NO_3^- /l.d. Estas velocidades fueron establecidas con la finalidad de mantener una relación carbono/nitrógeno (C/N) cercana a la estequiométrica (1.4).

Una vez alcanzado el EE en el reactor desnitrificante, se procedió a realizar la segunda etapa, que consistió en la alimentación de tolueno a diferentes velocidades de carga 25, 50, 75, 100 y 125 mg C-tolueno/l.d, sustituyendo de forma gradual (10% de la velocidad de carga de carbono inicial) la velocidad de carga de acetato y manteniendo a la vez constante la relación C/N de 1.4. En la Tabla 4.3, se ilustran estas etapas.

Tabla 4.3 Velocidades de carga de carbono ensayadas durante la fase experimental

Etapas de experimentación	Velocidad de carga de carbono (mg/l.d)		
	C-acetato	C-tolueno	C-total
Primera	250	0	250
Segunda	225	25	250
	200	50	250
	175	75	250
	150	100	250
	125	125	250

4.3 Métodos analíticos

4.3.1 Compuestos nitrogenados

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

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

Solución de electrolito: El electrolito empleado para la generación de un campo eléctrico fue sulfato de sodio, el cual se prepara de la siguiente forma: A 10 ml de una solución de

Na₂SO₄ 0.1 M, adicionar 3 ml de la solución OFM anion-BT(Waters), mezclar y aforar a 100 ml con agua desionizada.

Para comprobar la respuesta del equipo, se analizaron diferentes concentraciones de nitrato y nitrito. De los datos obtenidos se construyó una curva de calibración con valores del área bajo la curva contra la concentración de nitrato y nitrito, encontrándose que la respuesta del método es lineal. En la Figura 4.2, se muestra una de las curvas para valores medios de diferentes concentraciones de nitrato. También se ilustra el valor medio y la desviación estándar para la pendiente y la ordenada al origen al realizar por lo menos 3 repeticiones. La curva estándar para nitrito no se muestra, sin embargo su tendencia fue similar a la del nitrato.

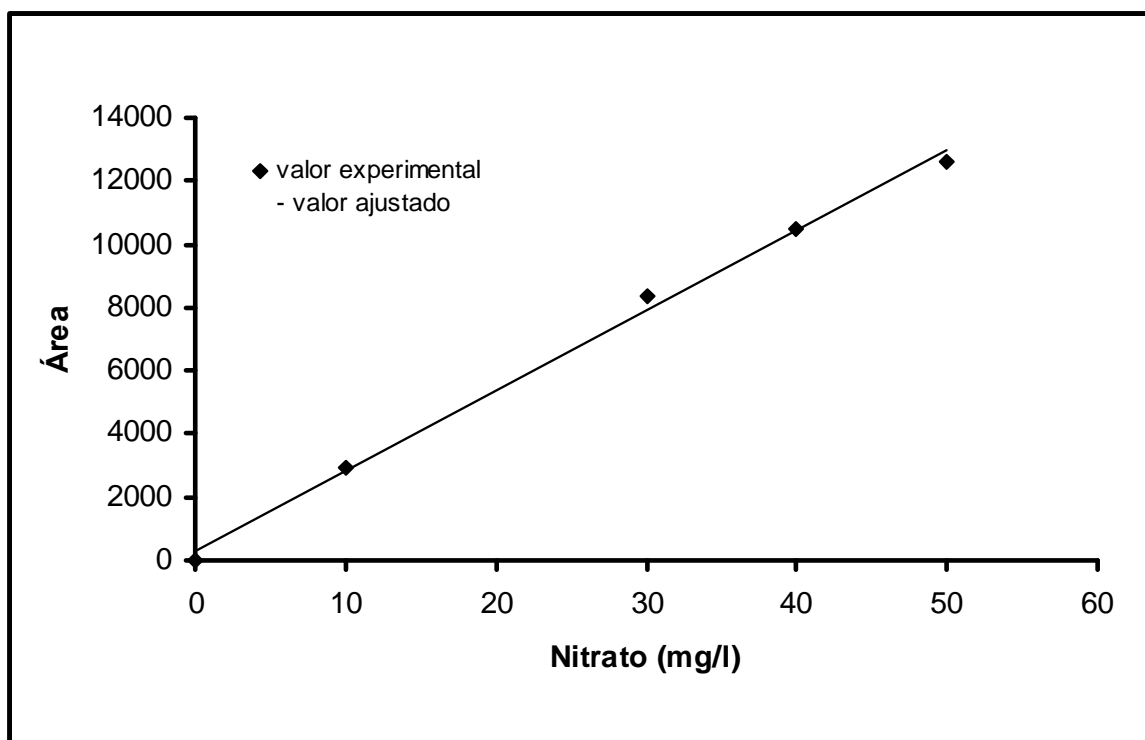


Figura 4.2. Curva de calibración para la determinación de nitrato ($n = 3$, $m = 252 \pm 0.2$, $b = 270 \pm 28$, $R^2 = 0.9953$).

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

sirve como estándar de referencia para determinar la concentración en la muestras. Las muestras se analizaron por duplicado.

4.3.1.2 Medición de nitrógeno molecular (N₂) y óxido nitroso (N₂O)

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

La muestra del gas producido en el reactor se obtuvo en la parte superior de la columna colectora de gas, mediante una jeringa de 1 ml. El volumen de inyección fue de 0.1 ml. El volumen de gas generado se calculó considerando la presión atmosférica de la ciudad de México (0.8 atm) y la temperatura del sistema (30° C). Se calculó la producción volumétrica de N₂, el número de moles (mol N₂/l.d) y por último se convirtieron a unidades de velocidad de carga (mg N₂/l.d).

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

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

Donde: V₂, volumen estándar; P₁, 1 atm; T₁, 273° K; V₁, volumen experimental; P₂, 0.8 ATM y T₂, 303° K (30° C temperatura experimental)

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

4.3.2 Compuestos carbonados

4.3.2.1 Medición de carbono total y orgánico

La cuantificación de carbono orgánico e inorgánico se realizó por un analizador de carbono orgánico total modelo TOC- 5000 (Shimadzu). El equipo analiza por separado el carbono total y el inorgánico. El sistema cuenta con un inyector que toma la muestra y la envía por medio de una corriente de aire de alta pureza, a un tubo de combustión que tiene una temperatura de 680° C. En el tubo de combustión el carbono es oxidado a CO₂ y transportado a un vaso de reacción de carbono inorgánico. Posteriormente es secado y enfriado por medio de un deshumificador, para finalmente pasar a un celda con un analizador de infrarrojo de gas, donde el CO₂ es detectado. El CO₂ cuantificado genera como señal un pico, cuya área es calculada por un procesador de datos. El área obtenida es proporcional a la concentración de carbono en la muestra y es calculada con base a una curva de calibración previamente elaborada.

Para cuantificar el carbono orgánico, la muestra es acidificada antes de su inyección al equipo y posteriormente sometida a burbujeo con el gas acarreador, donde los compuestos de carbono inorgánico, como el carbonato y el bicarbonato se eliminan en forma de CO₂. Por último la muestra es analizada de forma similar al proceso antes mencionado. Para medir el carbono, se usaron 10 ml de muestra, la cual fue centrifugada y posteriormente filtrada con una membrana de nylon de 45 µm de tamaño de poro. Las muestras se analizan por duplicado. Sin embargo si el coeficiente de variación es mayor al 2%, el equipo realiza de forma automática una tercera medición y toma en consideración las dos más cercanas. En la Figura 4.3, se muestra la curva de calibración para valores promedio de diferentes concentraciones de carbono total, preparada a partir de una solución patrón de biftalato hidrógeno de potasio.

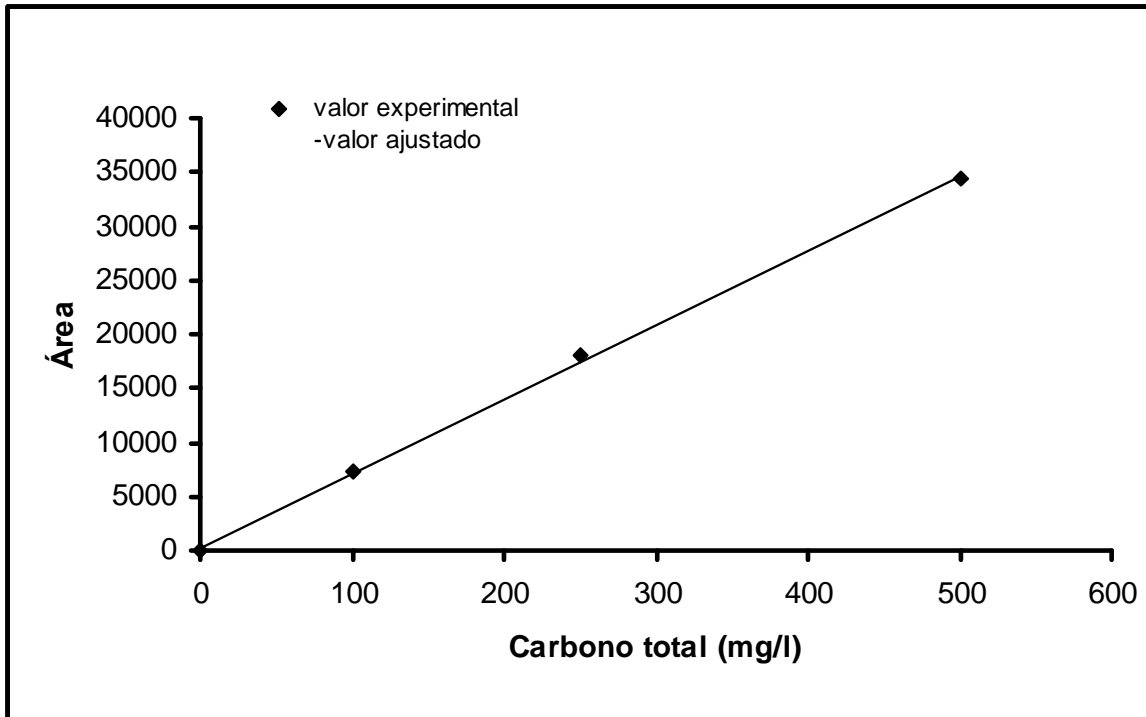


Figura 4.3 Curva de calibración para la determinación de carbono total ($n = 3$, $m = 68 \pm 0.23$, $b = 275 \pm 35$, $R^2 = 0.999$).

4.3.2.2 Medición de acetato

El acetato se cuantificó mediante un cromatógrafo de gases Varian Star 3400, con detector de ionización de flama (FID). Se utilizó una columna AT1000 de 10 m x 0.053 mm de diámetro y una película de 1.2 μm . La temperatura del horno fue de 120° C, del inyector 130° C y del detector 150° C. El gas acarreador fue nitrógeno a un flujo de 4.5 ml/min. Para la medición de acetato, se utilizaron 0.95 ml de muestra previamente filtrada con una membrana de nylon de 0.45 μm de tamaño de poro, a la cual se le adicionó 0.05 ml de HCl al 50% con el fin de acidificarla y tener el ácido acético sin disociar. La curva de calibración para diferentes concentraciones de ácido acético se muestra en la Figura 4.4, donde se observa un comportamiento lineal a las concentraciones utilizadas.

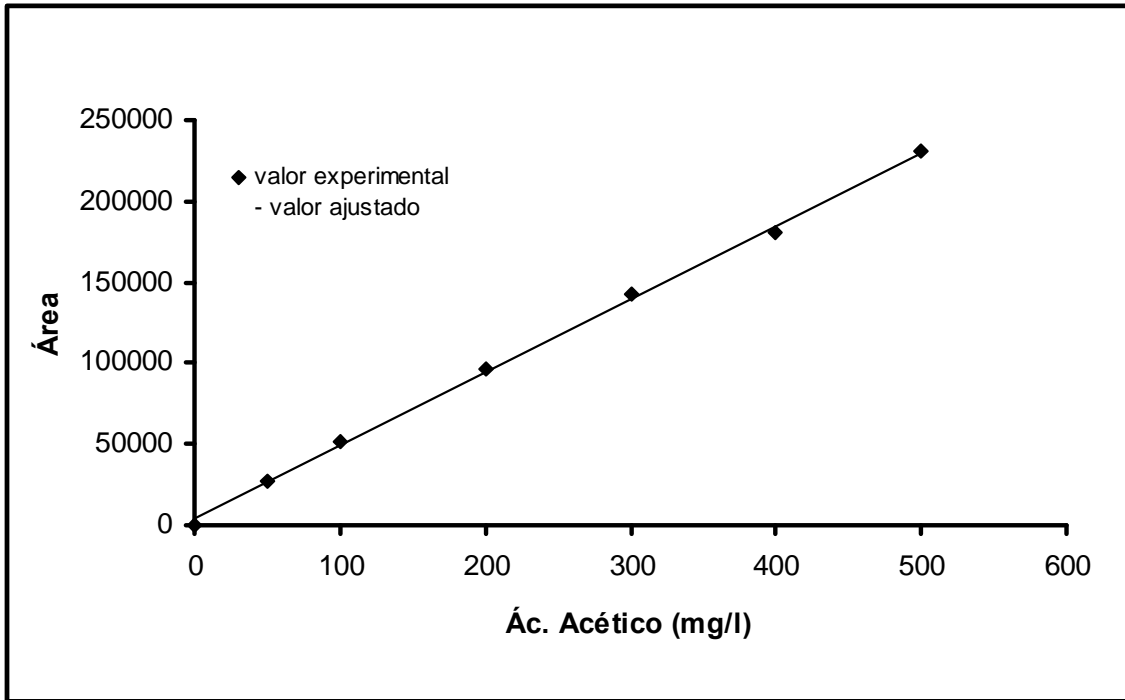


Figura 4.4 Curva de calibración para la cuantificación de acetato ($n = 3$, $m = 453 \pm 2.2$, $b = 4378 \pm 290$, $R^2 = 0.998$).

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

El bióxido de carbono (CO₂) y el metano (CH₄) se midieron por cromatografía de gases (detector de conductividad térmica) y se determinaron en la misma corrida junto con el nitrógeno (N₂) y el óxido nitroso (N₂O). Los cálculos de velocidad de carga de estos gases, se hicieron de acuerdo a las mismas consideraciones hechas para cuantificar la velocidad de carga de N₂ y N₂O (ver sección 3.3.1.2).

4.3.2.4 Medición de tolueno

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

Para la medición de tolueno en la fase líquida, las muestras se filtraron con una membrana de nylon de 45 µm de tamaño de poro. Posteriormente se inyectó un volumen de 0.2 µl en el

cromatógrafo de gases. La medición de tolueno en la fase gas, se determinó tomando una muestra de gas en el espacio de cabeza del recipiente del influente y del efluente, así como en el espacio de cabeza del reactor y en la columna colectora de gases.

En la Figura 4.5, se muestra una curva estándar a diferentes concentraciones de tolueno en la fase líquida. Se observa un comportamiento lineal hasta una concentración de 500 mg/l de tolueno.

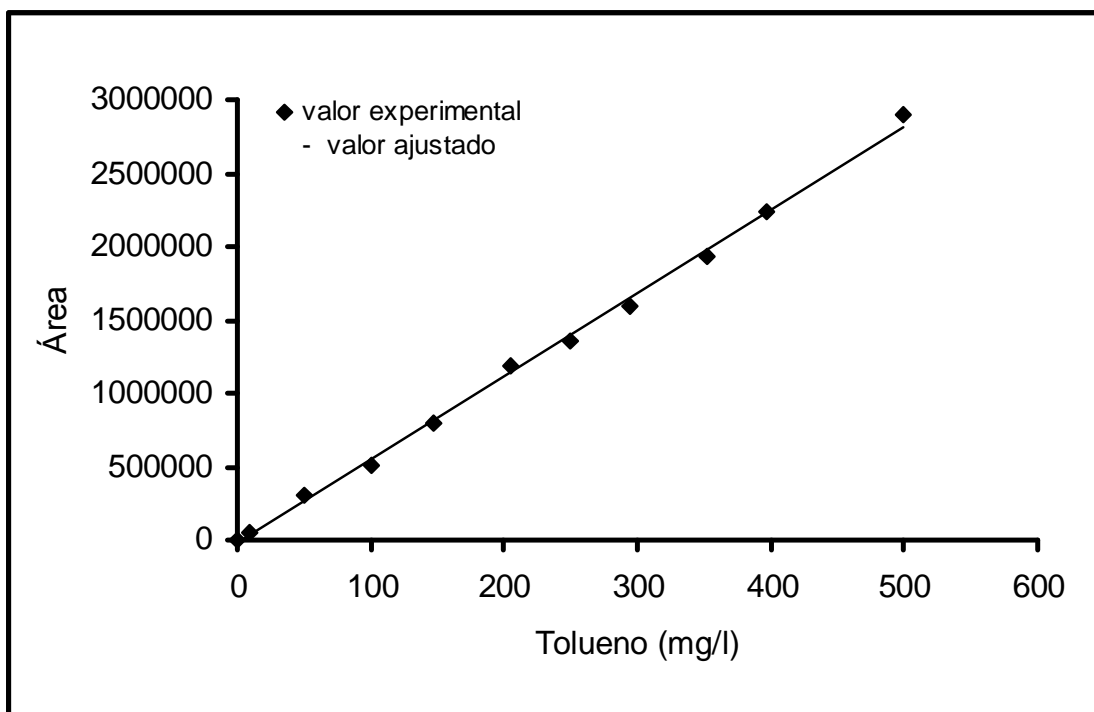


Figura 4.5 Curva de calibración para la determinación de tolueno en la fase líquida (n = 3, m = 5676 ± 10 b = 20944 ± 2504, R² = 0.99).

4.3.2.5 Medición de los sólidos suspendidos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

4.4 Referencias

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

Gómez, J., Méndez, R. and Lema, J. (1996). The effect of antibiotics on nitrification process: Batch assays. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **57**: 869-876.

Li, S. F. Y. (1993). Capillary electrophoresis-principle, practice and applications. Elsevier, Netherlands. Pp. 797.

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

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

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Desnitrificación heterótrofa con acetato

Los estudios muestran que los microorganismos desnitrificantes pueden consumir sustratos orgánicos muy variados, que van desde fácilmente oxidables como el acetato, hasta compuestos más complejos como los hidrocarburos del petróleo. Muchos de los trabajos sólo se avocaban a observar la desaparición de los compuestos, ya sea nitrogenados o carbonados. Sin embargo, recientes estudios han puesto interés en observar el efecto que ejerce la fuente de energía sobre la ruta secuencial de las enzimas desnitrificantes (Wilderer y col., 1987). En algunos estudios, se ha reportado la acumulación de algunos intermediarios, principalmente de nitrito por la competencia que parece haber entre las enzimas nitrato y nitrito reductasas por los diferentes donadores de electrones (Glass y Silverstein, 1998). También se ha puesto en evidencia la influencia de otros factores, como es el caso del pH y la relación C/N. El pH adecuado para las enzimas desnitrificantes parece oscilar entre 6 y 9 (Pérez, 1998). Respecto a la C/N, se ha observado que ésta, influye en la eficacia del proceso. Así, una relación C/N muy baja, respecto a la estequiométrica (o bien, con un exceso de nitrato), puede ocasionar la acumulación de compuestos nitrogenados por presentarse una deficiencia en la fuente de electrones, mientras que una relación C/N alta, puede generar la acumulación de compuestos orgánicos, una alta generación de biomasa indeseable cuando se trabaja con reactores continuos, o bien la reducción del nitrato a amonio (Akuna y col., 1993; Oh y Silverstein, 1999).

En el presente trabajo, para establecer el estado estacionario (EE) y obtener así un consorcio desnitrificante fisiológicamente estable, se usó un reactor UASB de 1.4 l, operado a una temperatura de 30° C y sin control del pH. Como fuente de carbono se empleó acetato de sodio a una velocidad de carga de 250 mg C/l.d y como fuente de nitrógeno se utilizó nitrato de sodio a una velocidad de carga de 178 mg N/l.d, dando una relación C/N de 1.4.

5.1.1 Perfil de los compuestos carbonados

En la Figura 5.1.1, se muestra el comportamiento de los compuestos carbonados durante la desnitrificación. En esta etapa la velocidad de carga del C-acetato fue de 247.2 ± 18.7 mg C/l.d, mientras que la velocidad de carga de C-acetato encontrada en el efluente se mantuvo

alrededor de 3.38 ± 1.6 mg C/l.d, alcanzando una eficiencia de consumo de carbono (ECC, mg C consumido/ mg C alimentado) de $98.6\% \pm 0.68$.

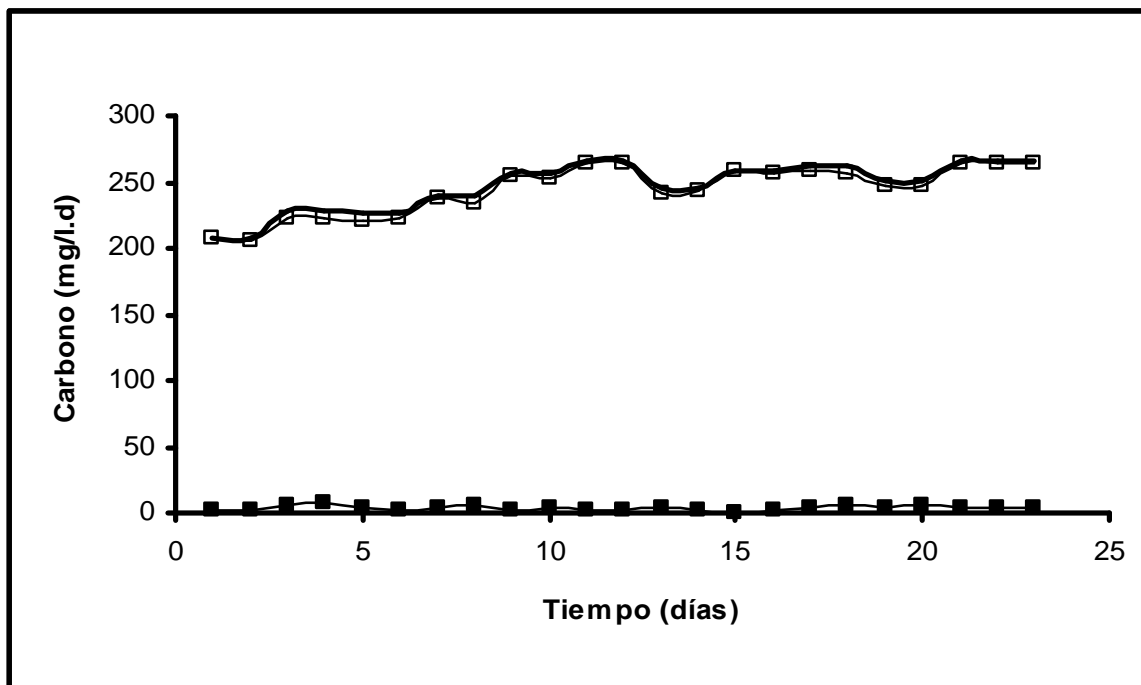
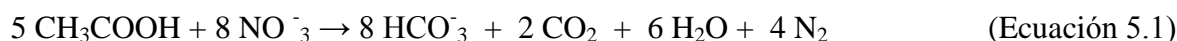
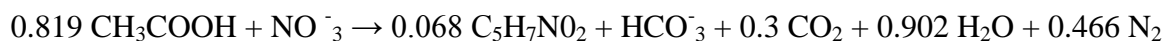


Figura 5.1.1 Perfil del carbono en un reactor desnitrificante UASB (TRH 2d.; T = 30° C) – C- acetato (entrada), —■— C- acetato (salida), —□— C- bicarbonato (salida).

Respecto a los rendimientos de carbono $Y_{HCO_3^-}$ (mg C- HCO_3^- formado/mg C-acetato consumido), los datos muestran rendimientos de 0.98 ± 0.06 . Estos resultados indican que el acetato fue transformado casi en su totalidad a bicarbonato (HCO_3^-), compuesto detectado en el efluente como resultado de la mineralización del acetato, tal como lo muestra la estequiometría de la reacción, la cual es presentada en las Ecuaciones 5.1 y 5.2. Se observa que cuando se utiliza acetato como fuente de energía, la relación C/N para reducir nitrato hasta nitrógeno molecular es de 1.07, si se excluye la formación de biomasa. Pero si se considera la formación de ésta, la relación C/N aumenta hasta 1.4, como lo indica la Ecuación 5.2 (Mateju y col., 1992).



(Ecuación 5.2)



Es conveniente mencionar que se cuantificó HCO_3^- debido que el pH del efluente, se mantuvo por arriba de 8.3 ± 0.4 . A este valor de pH, el equilibrio químico del CO_2 se encuentra preferentemente en forma de bicarbonato.

La concentración inicial de biomasa en el reactor fue de 3.54 g/l y después de 23 días terminó en 3.26 g/l (Figura 5.1.2). Como se puede observar, esta concentración permaneció prácticamente constante. Por otro lado, el lodo del reactor fue compacto y mostró excelente sedimentabilidad por lo que es posible decir que la pérdida de sólidos suspendidos volátiles no fue significativa. Este resultado junto con los valores de HCO_3^- , indican que el consumo de nitrato y acetato se realizó mediante un proceso netamente desasimilativo.

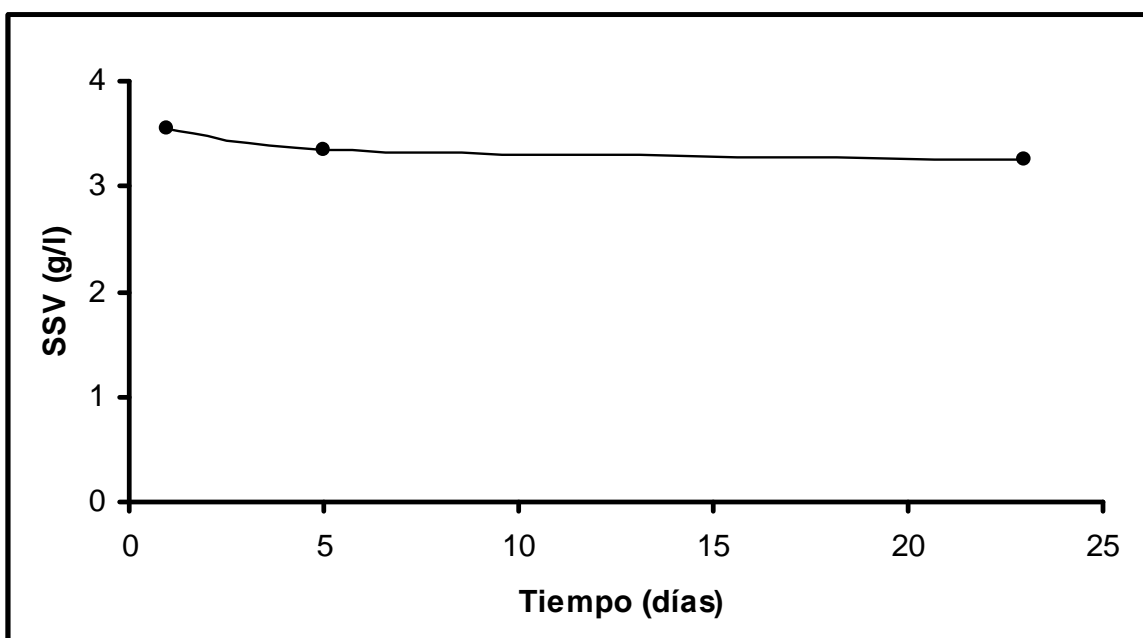


Figura 5.1.2 Concentración de sólidos suspendidos volátiles (SSV) en el reactor desnitrificante UASB (TRH 2d.; T = 30° C).

5.1.2 Perfil de los compuestos nitrogenados

En la Figura 5.1.3, se muestra el comportamiento de los compuestos nitrogenados. La velocidad de entrada promedio de nitrógeno de nitrato en el reactor fue de 175.6 ± 8.7 mg N- NO_3^- /l.d, valor muy cercano al calculado que fue de 178. La carga residual de nitrógeno en forma de nitrato encontrada fue de 2.7 ± 3.1 mg N/l.d, (la registrada para nitrito se mantuvo en 4.4 ± 5.3), por lo que el proceso alcanzó una eficiencia de consumo de nitrógeno (ECN, mg N consumido/ mg N alimentado) de $95.8\% \pm 4.25$. Como se muestra en la Figura 5.1.3, el principal producto nitrogenado fue el nitrógeno molecular, que alcanzó

velocidades de producción de 166 ± 18.2 mg N_2 /l.d. Esto indica que prácticamente todo el nitrato consumido fue transformado a este producto y se comprueba con los rendimientos desnitrificantes obtenidos (Y_D , mg N_2 producido/ mg $N-NO_3^-$ consumido), que son mostrados en la Figura 5.1.4, los cuales se mantuvieron siempre alrededor de 0.98. El rendimiento desnitrificante correlaciona estrechamente con la oxidación del acetato, con lo cual se evidencia una vez más que el proceso fue desasimilativo. Este comportamiento podría ser explicado en términos de la relación C/N cercana a la estequiométrica manejada en estos ensayos.

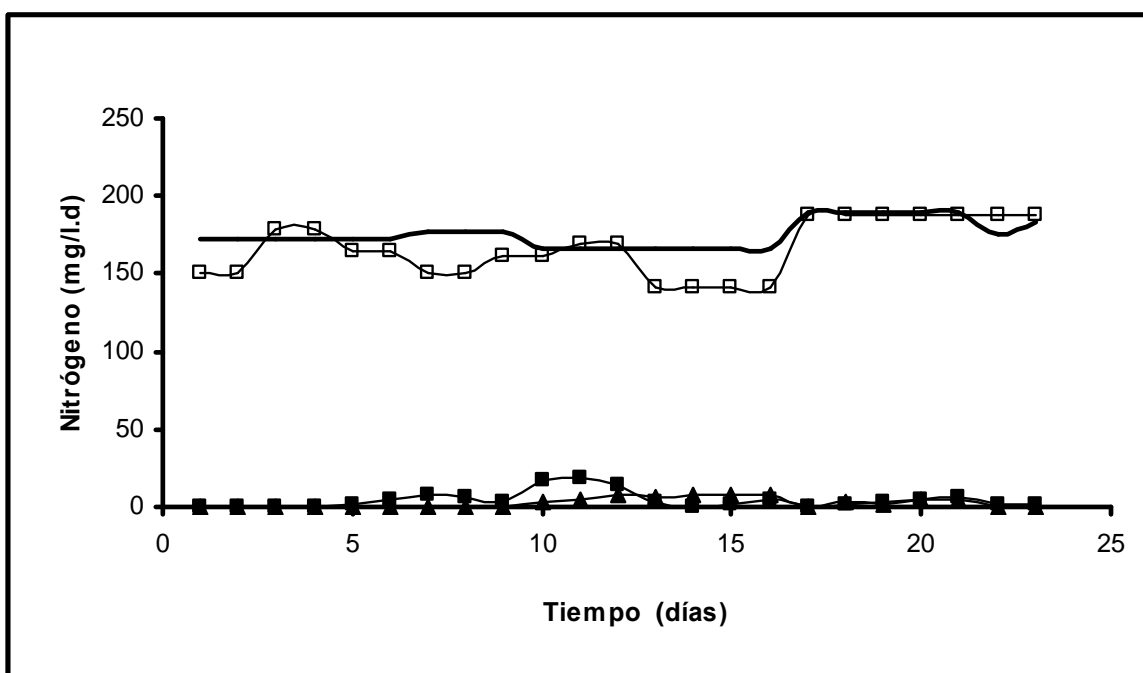


Figura 5.1.3 Perfil de los compuestos nitrogenados en el reactor desnitrificante UASB (TRH = 2 d.; T = 30° C) – N-NO₃⁻ (entrada), –■– N-NO₂⁻ (salida), –▲– N-NO₃⁻ (salida), –□– N₂ producido.

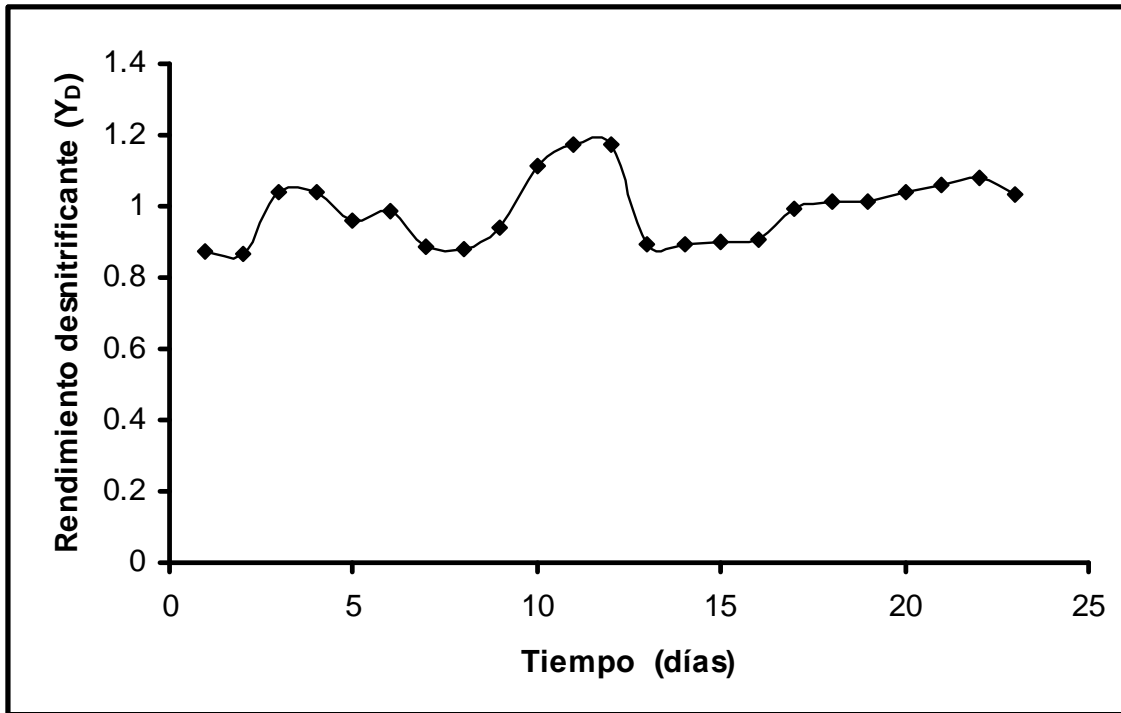


Figura 5.1.4 Rendimiento desnitrificante en un reactor UASB (TRH = 2 d.; T= 30° C).

5.1.3 Discusión

Las eficiencias de consumo de carbono (98%) y nitrógeno (96%) obtenidos en estos ensayos muestran que el consorcio desnitrificante operó eficazmente durante el estado estacionario. Asimismo, los rendimientos obtenidos (Y_D y $Y_{HCO_3^-}$) indican que el proceso fue desasimilativo. Por otro lado, puede decirse que el consumo de acetato no estuvo sometido a problemas de transporte y que la velocidad de carga de acetato utilizada, no alteró la estructura membranal de los microorganismos.

Los resultados encontrados en estos experimentos, muestran la importancia de establecer una relación C/N debidamente balanceada. En estos ensayos se observó que la relación C/N de 1.4, orientó el metabolismo hacia un proceso desnitrificante desasimilativo, sin la acumulación de intermediarios carbonados o nitrogenados. Al respecto, Oh y Silverstein (1999), empleando acetato como fuente de carbono en condiciones desnitrificantes en un reactor de lote secuenciado (SBR), encontraron que a una relación C/N de 1:1, se presentó una acumulación de nitrito del 30%. En cambio cuando la relación C/N estuvo en 2:1 y 3:1, el nitrato fue consumido sin presentarse acumulación de nitrito. Sin embargo, en la última relación mencionada se observó una notable acumulación de acetato no consumido a la

salida del reactor. En otro trabajo, Rijn y col., (1996) observaron la acumulación de nitrito en un cultivo con *Pseudomonas sutzeri* cuando el acetato fue usado como donador de electrones durante la desnitrificación, pero no cuando utilizaron butirato. También encontraron que el butirato fue consumido más lentamente que el acetato. Los autores arguyen que la acumulación de nitrito se debió a una deficiencia de electrones y que la mayor velocidad de consumo de acetato fue ocasionada porque en presencia de nitrito y nitrato, los electrones generados por acetato fluyen preferentemente hacia la nitrato reductasa, mientras que los electrones del butirato reducen más rápidamente la nitrito que la nitrato reductasa. Por otra parte, Blaszczyk (1993), observó acumulación de nitrito en *Paracoccus denitrificans* cuando fue crecido en medio mínimo con metanol, acetato y etanol como fuente de carbono y energía. Sin embargo, tal acumulación no se presentó cuando el medio mínimo junto con la fuente de carbono fue suplementado con extracto de levadura y vitaminas. El trabajo reportado por este autor, sugiere la importancia de establecer un medio de cultivo químicamente bien balanceado que cumpla con los requerimientos necesarios para la actividad de las enzimas desnitrificantes. En los estudios publicados por Blaszczyk (1993), el medio mínimo muy probablemente careció de una adecuada concentración de cofactores como molibdeno y cobre, tal como lo mostró la composición del medio inicialmente utilizado. Se ha observado que estos cofactores son utilizados para las actividades enzimáticas de la nitrato y nitrito reductasa, respectivamente (Zumft, 1997).

Otro factor que ha mostrado tener un efecto significativo sobre el proceso desnitrificante es el pH. Al respecto, Thomsen y col., (1994) observaron diferencias significativas entre valores de pH ácidos y básicos cuando se estudió su efecto sobre la bacteria desnitrificante *Paracoccus denitrificans*. Ellos encontraron que a un pH de 5.5, la utilización de los sustratos nitrogenados del proceso desnitrificante fue marcadamente lenta. Primero observaron que todo el nitrato fue transformado a nitrito, posteriormente el nitrito fue convertido a óxido nitroso y finalmente el óxido nitroso pasó a nitrógeno molecular. Cada intermediario se acumuló, sin embargo, a un pH de 8.5, la presencia de tales intermediarios no fue pronunciada, encontrándose nitrógeno molecular inmediatamente después que el nitrato empezó a consumirse. Estos resultados concuerdan con los encontrados en este

trabajo, donde a un pH mayor que 8.3, se detectó rápidamente la presencia de nitrógeno molecular, sin encontrar la acumulación significativa de intermediarios nitrogenados.

Los resultados encontrados en estos ensayos muestran la importancia de establecer un medio químicamente balanceado, ya que coadyuvo a una adecuada actividad del consorcio desnitrificante. Por otro lado, el manejo de una relación C/N cercana a la estequiométrica (junto con el pH de propio sistema) orientó hacia un proceso netamente desasimilativo, sin la acumulación significativa de intermediarios nitrogenados que incluso pueden ser más tóxicos que el propio nitrato.

5.1.4 Referencias

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

Blaszczyk, M. (1993). Effect of medium composition on the denitrification of nitrate by *Paracoccus denitrificans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59** (11): 3951-3953.

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

Matejů, V., Cizinská, S., Krejci, J. and Janoch, T. (1992). Biological water denitrification. A review. *Enzyme Microb. Tech.* **14**: 170-183.

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

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

Rijn, V. J., Tal, Y. and Barak, Y. (1996). Influence of volatile fatty acids on nitrite accumulation by a *Pseudomonas stutzeri* strain isolated from a denitrifying fluidized bed reactor. *Appl. Environ. Microbiol.* **62** (7): 2615-2620.

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

5.2 Desnitrificación heterótrofa con acetato y tolueno

Hasta hace pocos años, la mayoría de los estudios sobre la eliminación de los hidrocarburos aromáticos, incluyendo al tolueno, se realizaban por procesos aerobios. Bajo estas condiciones el catabolismo de estos compuestos está bien documentado (Hutchins, 1991; Haigler y col, 1992; Deutz y col, 1994). Sin embargo, la presencia de ciertos inconvenientes ha llevado a la búsqueda de métodos alternativos. Por ejemplo, en condiciones naturales la eliminación de estos compuestos en acuíferos contaminados se ve disminuida a medida que las concentraciones de oxígeno disuelto van decreciendo. La adición de oxígeno es difícil (además costosa) debido a su baja solubilidad en agua (aproximadamente 10 mg/l a 15° C) (Wilson y Bouwer, 1997). Otro de los inconvenientes que se presentan, se debe a que las aguas residuales contaminadas por este tipo de compuestos, frecuentemente son sometidas a procesos de tratamiento aerobios convencionales. Mediante estos sistemas, gran parte de estos compuestos tienden a ser arrastrados desde la solución acuosa hasta la atmósfera debido a su naturaleza volátil (Chin, 1994). Aunado a esto, los sistemas de aireación en este tipo de tratamiento resultan ser muy costosos (Bischof y col., 1996).

La oxidación de tolueno por procesos anóxicos ha mostrado ser un método viable. Al respecto diversas investigaciones han reportado el consumo de tolueno bajo condiciones metanogénicas (Edwards y Grbic-Galic, 1994), hierroreductoras (Lovley y Lonergan, 1990), sulfatoreductoras (Beller y col, 1992; Edwards y col., 1992) y desnitrificantes (Biergert y Fuchs, 1995; Phelps y Young, 1999; Pelz y col., 2001). Es conveniente mencionar que la mayoría de estos trabajos se han realizado en cultivos en lote y en sistemas continuos los reportes son escasos.

5.2.1 Consumo de tolueno y acetato en el reactor desnitrificante UASB

Una vez que el consorcio desnitrificante se encontraba en estado estacionario con C-acetato, se procedió a analizar el efecto de diferentes velocidades de carga de tolueno sobre el consorcio desnitrificante. Para lograr lo anterior, manteniendo constante la relación carbono/nitrógeno (C/N) y la velocidad de carga de carbono total de 250 mg C /l.d, se ensayaron en forma progresiva 5 velocidades de carga de C-tolueno: 25, 50, 75, 100 y 125 mg/l.d. En consecuencia la velocidad de carga de carbono de acetato se disminuyó gradualmente. Los resultados son presentados a continuación, así como también los datos

generados de algunas pruebas abióticas, que se realizaron con fin de evaluar la posible pérdida de este hidrocarburo en el reactor.

5.2.1.1 Ensayos abióticos

Para evaluar la posible pérdida de tolueno por condiciones abióticas, se realizaron algunos ensayos. En primer lugar se simuló el consumo del medio donde se encontraba la mezcla de acetato y tolueno conforme transcurría el tiempo, y se cuantificó la concentración en la fase gaseosa, es decir en el espacio de cabeza y en la fase líquida del recipiente. Las pruebas fueron realizadas con una concentración de 40 mg/l de C-tolueno en botellas de vidrio con un volumen de trabajo de un litro, las cuales fueron debidamente selladas y puestas en refrigeración a una temperatura de $5 \pm 2^\circ \text{C}$.

En la Tabla 5.2.1, se muestran los resultados encontrados de estos ensayos. Como se puede apreciar, la concentración de C-tolueno registrada en la fase gaseosa siempre fue menor que 3 mg/l, encontrándose la mayor parte en la fase líquida, independientemente del espacio de cabeza presente o del volumen del medio carbonado gastado. Estos resultados dan muestra de la permanencia de tolueno en la fase líquida y en consecuencia, una mínima proporción hacia el espacio de cabeza.

Tabla 5.2.1 Proporción de C-tolueno gas/líquido en recipientes de un litro sometidos a una temperatura de $5 \pm 2^\circ \text{C}$.

Tiempo (horas)	Concentración de C-tolueno en el recipiente de alimentación (mg/l)		
	Fase gas (espacio de cabeza)	Fase líquida	Total
0	2.06	38.29	40.35
12	1.61	44.75	46.76
24	0.91	43.59	44.5
36	0.96	39.07	40.03
48	0.75	34.66	35.41

Asimismo, se realizaron pruebas con el objeto de determinar la posible pérdida de tolueno durante la alimentación del medio de cultivo al reactor UASB (sin lecho de lodos desnitrificantes). En estos ensayos, se cuantificó el tolueno en el recipiente de alimentación, en la fase líquida y gaseosa (espacio de cabeza) del reactor, así como en la columna de

captura de gases. Las muestras en el reactor (operado herméticamente), fueron tomadas en la parte superior con una jeringa, al tiempo cero y después de haber transcurrido al menos un TRH (2 días). Los resultados obtenidos se muestran en Tabla 5.2.2. En ésta, sólo se ilustran los datos obtenidos en el recipiente de alimentación y los valores detectados (en términos de velocidad de carga) en la fase líquida y gaseosa del reactor, ya que en la columna de captura de gases, el tolueno sólo fue detectado una vez y su valor fue menor que 1 mg/l.d. En la Tabla 5.2.2, también se observa que las mayores velocidades de carga de tolueno siempre fueron encontradas en la fase líquida del reactor, encontrando una menor proporción en el espacio de cabeza.

Tabla 5.2.2 Cuantificación de C-tolueno (mg/l.d) en el recipiente de alimentación ($5 \pm 2^\circ \text{C}$) y en el reactor desnitrificante UASB (30°C ; TRH = 2 d.), durante ensayos abióticos.

Tiempo (horas)	Velocidad de carga de tolueno (mg/l.d)			
	Influente recipiente	Reactor		
		Fase gas (espacio de cabeza)	Fase líquida	Total
0	115.7	nm	nm	
24	nm	nm	nm	
48	nm	26.7	85.2	111.4
72	nm	34.1	73.8	107.98
96	nm	26.5	87.6	114.19

nm = no medido

Como se puede observar, la pérdida de tolueno durante el trayecto del recipiente al reactor fue mínima, puesto que los valores de tolueno obtenidos en el recipiente de alimentación y en el reactor (fase líquida y gaseosa) fueron muy similares entre sí, encontrándose un coeficiente de variación menor al 6%. Cabe mencionar que estos ensayos se realizaron sin lodos, en los cuales lleva a cabo la mayor actividad desnitrificante, este lecho de lodos pudiera servir como amortiguador para disminuir la proporción de tolueno hacia la fase gaseosa.

5.2.1.2 Perfil de los compuestos carbonados

En la Figura 5.2.1, se muestra el comportamiento de los compuestos carbonados durante la desnitrificación en el reactor continuo UASB alimentado con acetato y tolueno. En ésta se ilustran las cinco velocidades de carga de tolueno evaluadas. Las flechas indican el tiempo en que se realizó el cambio de velocidad de carga de tolueno. Los resultados se muestran a partir del día 24, que fue cuando se empezó a sustituir el acetato por tolueno.

Como se puede observar en la Figura 5.2.1, en todas las velocidades de carga utilizadas se alcanzó el estado estacionario, puesto que las velocidades de carga de carbono de entrada y salida, tanto de acetato como de tolueno permanecieron con una variación menor que 10%. También se puede apreciar que en cada uno de los ensayos el acetato y tolueno fueron consumidos prácticamente en su totalidad, encontrándose como producto principal al carbono inorgánico en forma de bicarbonato.

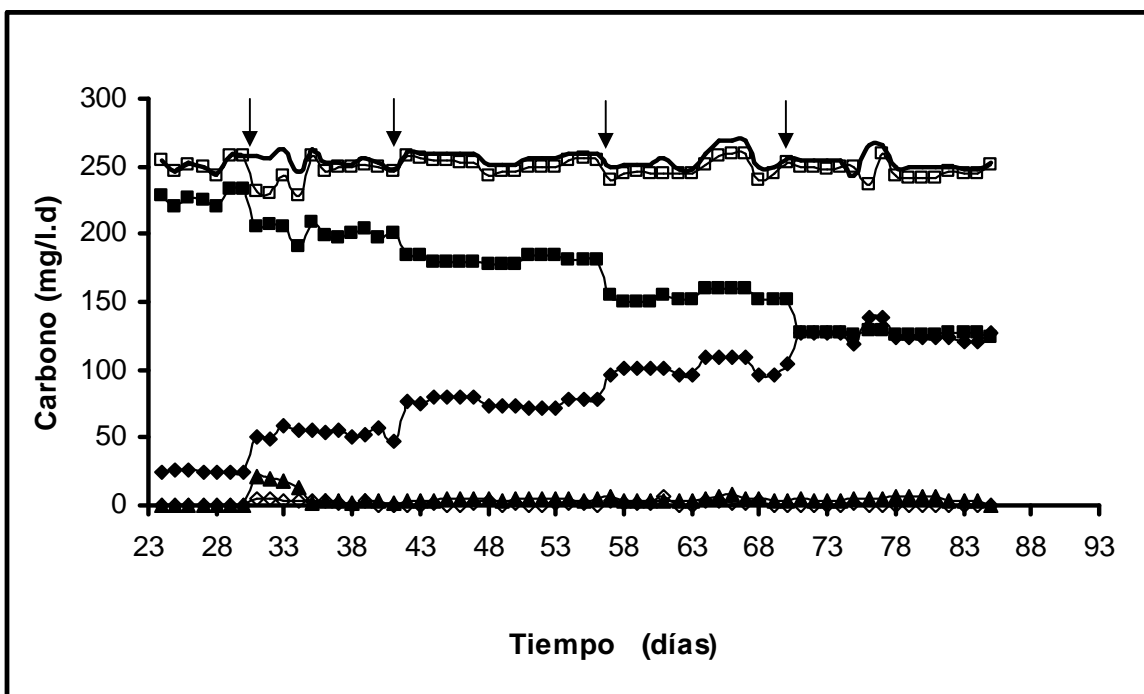


Figura 5.2.1 Perfil de los compuestos carbonados durante la desnitrificación, empleando una mezcla de acetato y tolueno como fuentes reductoras en el reactor UASB (30° C; TRH = 2 d.) – C-total (entrada), –■– C-acetato (entrada), –▲– C-acetato (salida), –♦– C-tolueno (entrada), –◇– C-tolueno (salida), –□– C-bicarbonato (salida).

Las eficiencias de consumo de carbono obtenidas en cada uno de los ensayos son presentadas en la Tabla 5.2.3. Al respecto, se encontró que prácticamente todo el acetato y el

tolueno alimentado fueron consumidos por los microorganismos desnitrificantes. Durante estas pruebas las eficiencias de consumo de carbono total siempre fueron superiores a $95\% \pm 3.5$, sin importar la fuente carbonada. Las velocidades de carga de salida de carbono de acetato y tolueno del reactor fueron menores que 4.2 ± 2.8 y 1.29 ± 1.04 mg C/l.d, respectivamente. Esta tendencia se mantuvo independientemente de la velocidad de carga de carbono de tolueno valorada.

Tabla 5.2.3 Eficiencias de consumo de carbono (ECC) durante la desnitrificación, empleando una mezcla de acetato y tolueno como fuentes reductoras.

Velocidad de carga de carbono (VCC) Acetato/tolueno (mg/l.d)	Eficiencia de consumo de carbono (ECC) (%)
225/25	99.2 ± 0.3
200/50	95 ± 3.5
175/75	98.9 ± 0.9
150/100	98.7 ± 1.7
125/125	96.3 ± 1.3

En lo que concierne a los rendimientos de carbono, estos son mostrados en la Tabla 5.2.4. Los datos experimentales obtenidos arrojaron rendimientos de carbono superiores a 0.95, y fueron independientes de la velocidad de carga de carbono de tolueno evaluada. Estos resultados indican el desarrollo de un proceso netamente desasimilativo, con lo cual se puede asumir que prácticamente todo el acetato y el tolueno fueron mineralizados a bicarbonato, tal como lo indica la Ecuación 5.2.1, propuesta por Heider y col. (1999), en la que se muestra al bicarbonato como producto de la oxidación del tolueno. En la misma Ecuación, también se puede apreciar que no se considera la formación de biomasa, lo que resulta en una relación carbono/nitrógeno (C/N) de 0.83, ligeramente menor que la (C/N) para acetato que es de 1.07.



Tabla 5.2.4 Rendimiento de carbono (Y_C) durante la desnitrificación, empleando una mezcla de acetato y tolueno como fuentes reductoras.

Velocidad de carga de carbono (VCC) Acetato/tolueno (mg/l.d)	Rendimiento de (Y_C) mg C- HCO_3^- formado/ mg de C consumido
225/25	0.99 ± 0.01
200/50	0.95 ± 0.03
175/75	0.98 ± 0.05
150/100	0.97 ± 0.09
125/125	0.98 ± 0.08

Referente a la concentración de sólidos suspendidos volátiles (biomasa) encontrados en el reactor, en la Figura 5.2.2, se muestra su comportamiento.

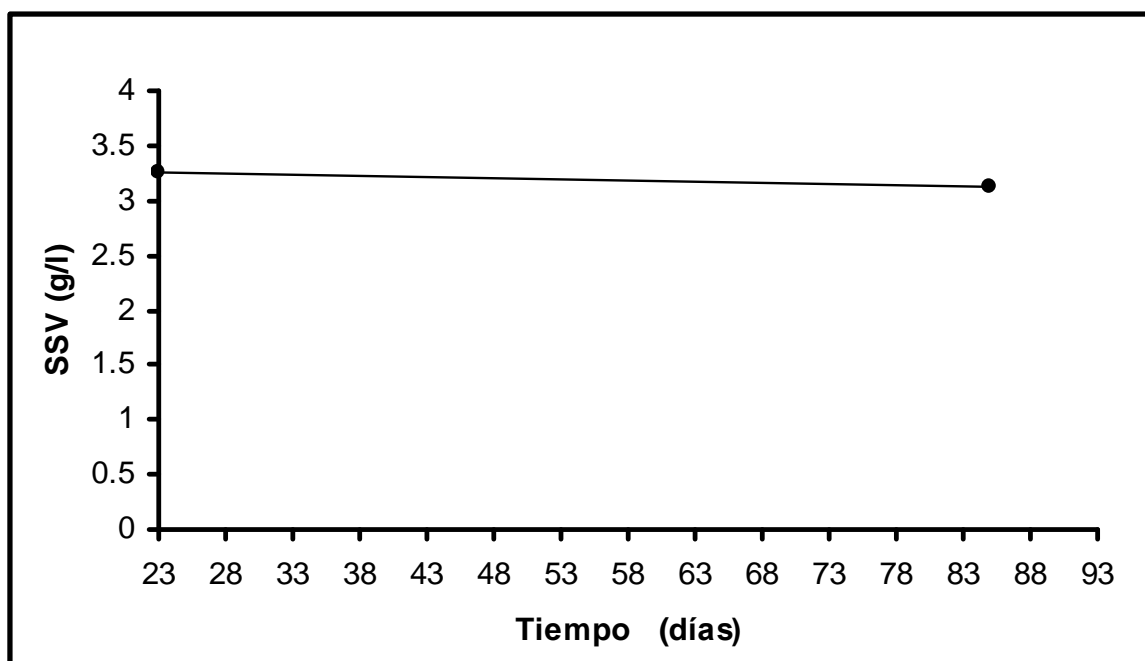


Figura 5.2.2 Concentración de sólidos suspendidos volátiles en el reactor desnitrificante UASB, empleando acetato y tolueno como fuente de carbono y energía.

La concentración inicial de biomasa en estos ensayos fue de 3.26 g/l. Tal concentración no sufrió grandes variaciones y terminó en 3.12 g/l. Cabe hacer mención que sólo se hicieron dos mediciones de sólidos suspendidos volátiles en estos experimentos y que además en el transcurso de estos, se tomaron 3 muestras de lodos (10 ml cada una) para análisis independientes a este trabajo. Probablemente estas purgas coadyuvaron a mantener la concentración de biomasa prácticamente constante. A pesar de esto, los resultados muestran un escaso crecimiento de biomasa, confirmándose un proceso netamente desasimilativo.

5.2.1.3 Perfil de los compuestos nitrogenados

En la Figura 5.2.3, se presenta la conducta de los distintos componentes nitrogenados detectados en el reactor desnitrificante UASB, cuando fueron evaluadas las cinco velocidades de carga de tolueno. Nuevamente, las flechas indican el tiempo en que fue realizado el cambio de la velocidad de carga de carbono de tolueno.

Durante los cinco ensayos realizados con tolueno, la velocidad de carga promedio de nitrógeno de nitrato en el reactor fue de 180.25 ± 7.59 mg N-NO₃⁻/l.d, presentando un coeficiente de variación menor que 5%. Las velocidades volumétricas de producción de nitrógeno molecular presentaron algunas oscilaciones, sobre todo cuando se estudiaron las velocidades de carga de carbono de tolueno de 75, 100 y algo menores se observaron para la de 125 mg C/l.d. A pesar de ello, en forma general la velocidades volumétricas de producción de nitrógeno molecular alcanzaron un valor promedio de 158 ± 20.08 mg N₂/l.d, lo cual representó un coeficiente de variación de alrededor del 12%. Estos datos permiten decir que el reactor operó en régimen estacionario desnitrificante.

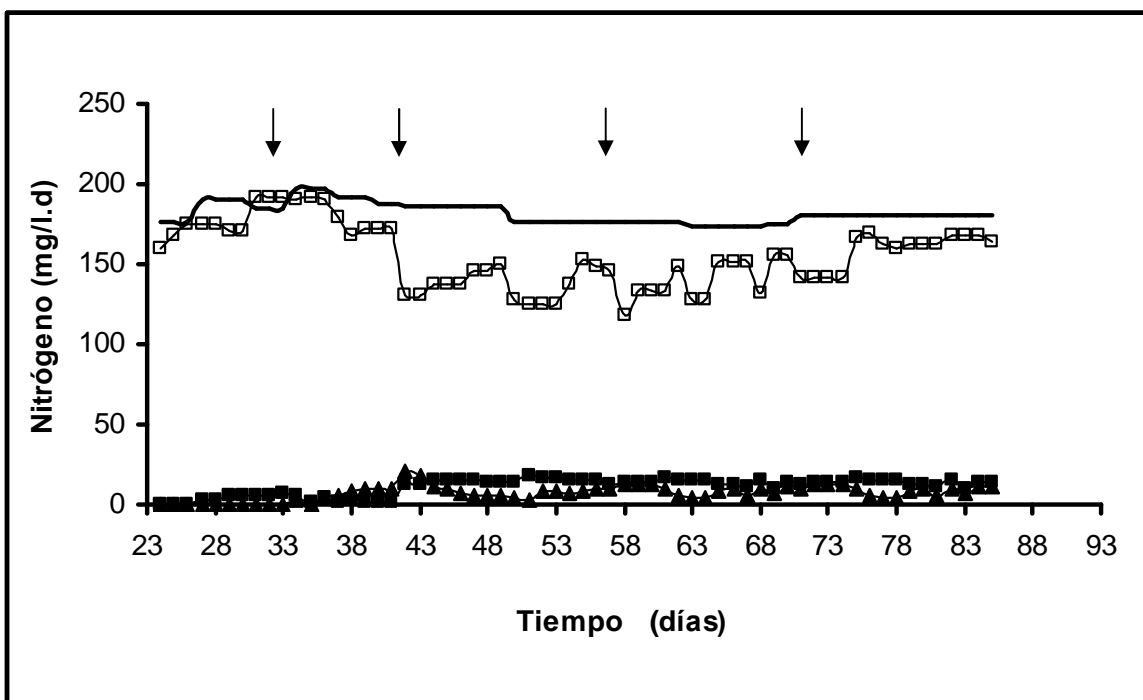


Figura 5.2.3 Perfil de los compuestos nitrogenados en el reactor desnitrificante UASB empleando una mezcla de acetato y tolueno como fuentes reductoras (30° C; TRH = 2 d.). — N-NO₃⁻ (entrada), —■— N-NO₂⁻ (salida), —▲— N-NO₃⁻ (salida), —□— N₂ producido

Las eficiencias de consumo de nitrógeno alimentado en forma de nitrato son presentadas en la Tabla 5.2.5. Como se puede observar cuando fue evaluada la primera velocidad de carga de carbono de C-tolueno de 25 mg C/l.d, se obtuvieron eficiencias de consumo de nitrógeno de 98%. Durante esta etapa la velocidad de carga residual de nitrito fueron de 2.34 ± 2.4 mg N-NO₂⁻/l.d, mientras que la detectada de nitrato osciló alrededor de 0.17 mgN-NO₃⁻/l.d. Un comportamiento similar se presentó al evaluar la segunda velocidad de carga de tolueno, donde se obtuvieron eficiencias de consumo de nitrógeno de $95.7\% \pm 1.5$. En este caso, las velocidades de carga de nitrógeno registradas a la salida del reactor fluctuaron alrededor de 3.45 mg/l.d, para nitrógeno en forma de nitrito y alrededor de 4.6 mg/l.d, para nitrógeno de nitrato. Sin embargo, cuando fue evaluada la tercera velocidad de carga de C-tolueno de 75 mg C/l.d, las eficiencias de consumo de nitrógeno disminuyeron a $86.7\% \pm 2.1$, esto se reflejó en las velocidades de carga residuales de nitrógeno que aumentaron a 15 ± 1.2 mg /l.d para el caso de nitrógeno de nitrito y a 8.9 ± 4.7 mg/l.d para el nitrógeno de nitrato. Como se puede apreciar en la misma Tabla, esta tendencia se mantuvo para las restantes velocidades de carga de C-tolueno de 100 y 125 mg C/l.d.

Tabla 5.2.5 Eficiencias de consumo de nitrógeno (ECN) durante la desnitrificación, empleando una mezcla de acetato y tolueno como fuentes reductoras.

Velocidad de carga de carbono (VCC) Acetato/tolueno (mg/l.d)	Eficiencia de consumo de nitrógeno (ECN) (%)
225/25	98.6 ± 1.3
200/50	95.7 ± 1.5
175/75	86.7 ± 2.1
150/100	87.3 ± 2.0
125/125	87.6 ± 2.1

Los rendimientos desnitrificantes (Y_D) es decir, la velocidad de nitrógeno producido con respecto a la velocidad de nitrógeno consumido (mg N₂/ mg N-NO₃⁻ consumido) son presentados en la Tabla 5.2.6. Los datos experimentales para este parámetro arrojaron rendimientos desnitrificantes superiores a 0.87, mostrando que la mayor parte del nitrógeno alimentado fue transformado a nitrógeno molecular. Esta conducta fue mantenida independientemente de la velocidad de carga de tolueno alimentada, reflejando con ésto, una alta capacidad de las bacterias desnitrificantes para oxidar el tolueno a velocidades de hasta 125 mg C/l.d. Los Y_D , obtenidos en estos ensayos, refuerzan la presencia de un proceso

desasimilativo. También sustentan el acoplamiento de la oxidación simultánea de acetato y tolueno con la reducción concomitante de nitrato a nitrógeno molecular.

Tabla 5.2.6 Rendimientos desnitrificantes (Y_D), empleando una mezcla de acetato y tolueno como fuentes reductoras.

Velocidad de carga de carbono (VCC) Acetato/tolueno (mg/l.d)	Rendimientos desnitrificantes (Y_D) (mg N producido/mg N-NO ₃ ⁻ consumido)
225/25	0.93 ± 0.02
200/50	1.0 ± 0.05
175/75	0.87 ± 0.05
150/100	0.91 ± 0.07
125/125	0.93 ± 0.03

5.2.1.4 Discusión

Debido a la relativa alta presión de vapor de los compuestos monoaromáticos, su volatilización puede ser significativa al someterlos a tratamientos bajo sistemas continuos o en lote. En este sentido, se debe discernir entre su posible pérdida por volatilización y por el consumo en procesos biológicos, en este caso, por microorganismos desnitrificantes. Los ensayos abióticos realizados en este trabajo muestran que la pérdida por volatilización de tolueno no fue significativa, por lo tanto se puede asumir que este hidrocarburo fue eliminado por un proceso desnitrificante.

La capacidad del consorcio desnitrificante para utilizar eficazmente el tolueno como fuente de carbono y energía en condiciones continuas, empleando un reactor UASB, quedó reflejada en estos ensayos. Así lo sustentan las eficiencias de consumo de carbono que fueron superiores a 95%, independientemente de la fuente carbonada consumida, que como se pudo observar fue canalizada hasta HCO₃⁻, dando rendimientos de carbono mayores que 0.95. Estos resultados dan muestra de un proceso netamente desasimilativo, así lo respaldan también, la concentración de sólidos suspendidos volátiles que permaneció prácticamente constante en el reactor. Una tendencia desasimilativa similar encontró Altenschmidt y Fuchs (1991) en sus estudios en lote sobre la oxidación anaerobia de tolueno, empleando la cepa desnitrificante *Pseudomonas* sp. Estos autores, realizaron estudios con esta cepa y basándose en los datos de consumo de tolueno y nitrato, indicaron que aproximadamente el 77% del tolueno consumido fue oxidado a CO₂ y que el 85% de nitrógeno de nitrato se

redujo a nitrógeno molecular. Aunque es conveniente mencionar que estos autores sólo se basan en los datos de consumo y no reportan la medición de los gases generados durante el proceso. En contraste, otros estudios realizados en cultivo en lote, reportan una considerable asimilación de tolueno. Por ejemplo Evans y col. (1991), encontraron que de aproximadamente 28 mg/l de tolueno consumido en un periodo de 7 días por un cultivo desnitrificante, el 57% fue canalizado a CO₂ y el restante fue asimilado. En un estudio similar Evans y col. (1992), reportaron una oxidación de tolueno de 51%, una asimilación de 29% y el 20% restante menciona que permanecen como ácido benzilsuccínico y ácido benzilfumárico, detectados como intermediarios de la oxidación anaerobia del tolueno. Por otra parte, Schocher y col. (1991), en un estudio sobre la eliminación de este hidrocarburo por bacterias desnitrificantes, empleando N₂O como aceptor de electrones, reporta que de 40 mg/l de tolueno consumido, en un periodo de dos días, el 50% fue oxidado a CO₂, mientras que alrededor del 37% fue asimilado por el cultivo.

Por otra parte, muchos de los estudios de la desnitrificación se han avocado en conocer las posibles causas que llevan a la acumulación de algunos intermediarios, que incluso pueden ser más peligrosos que el propio nitrato. Tal es el caso del nitrito, que puede dar origen a nitrosaminas (compuestos cancerígenos); el óxido nítrico, que es un radical muy reactivo con moléculas biológicas; o el óxido nitroso que es un contribuyente al efecto invernadero. Como se describió anteriormente, los valores residuales de nitrato y nitrito encontrados en este trabajo, fueron menores a 10 mg N/l.d, a excepción del valor que se obtuvo cuando fue evaluada la velocidad de carga de carbono de tolueno de 75 mg/l.d que fue de 15 mg N-NO₂⁻/l.d. A pesar de esto, en términos generales podemos decir que el proceso desnitrificante se llevó a cabo de forma eficaz, encontrándose eficiencias de consumo de nitrato superiores a 87% y rendimientos desnitrificantes mayores que 0.87. Al respecto, algunos trabajos en lote han reportado la acumulación de nitrito. Por ejemplo, Schocher y col. (1991), trabajando con *Pseudomonas* sp. en un cultivo en lote con una concentración de tolueno de 42 mg/l y de nitrato de 310 mg/l, menciona una inhibición del cultivo por una acumulación considerable de nitrito de la cual no menciona su concentración. Esta acumulación, entre otras variables, probablemente se debió a un exceso de nitrato, donde se puede observar una relación C/N de 0.60, cuando la relación estequiométrica para oxidar el tolueno por desnitrificación es de 0.87. Otro trabajo realizado por Hutchins (1991), sobre la

eliminación de BTEX (3 mg/l cada compuesto) en botellas serológicas puestas en condiciones desnitrificantes (100 mg N-NO₃⁻/l) muestra el consumo total de los compuestos, a excepción del benceno y el *o*-xileno. Sin embargo, reporta una concentración de N-NO₃⁻ residual de 55 mg/l y un aumento de N-NO₂⁻ de 0.7 a 23.8 mg/l. Esta acumulación podría ser atribuida al exceso de nitrato presente en el cultivo, aunado a que los experimentos fueron incubados a 12° C, lo cual posiblemente provocó una posible inhibición en las enzimas desnitrificantes.

La información sobre eliminación de hidrocarburos aromáticos del agua mediante sistemas continuos y semicontinuos es escasa. Con el fin de establecer alguna comparación se presenta el trabajo reportado por Ma y Love (2001), en reactores de lote secuenciado (SBR). Estos autores, trabajaron con SBR de 2 litros los cuales fueron operados a ciclos de 24 horas, con una concentración de BTX, de 5 mg/l (cada compuesto). Encontraron el consumo total del tolueno en un periodo promedio de 10 horas. Sin embargo el resto de los hidrocarburos (a excepción del *m*-xileno) permanecen constantes. Respecto al nitrato, se observa un descenso simultáneo al consumo de tolueno, en contraste, el nitrito aumenta y posteriormente es eliminado en aproximadamente 18 horas. Los autores atribuyen este aumento a la adición excesiva de nitrato y a la adición de materia orgánica (600 mg DQO/l) fácilmente oxidable que fue adicionada junto con los BTX. Estos autores reportan que el tolueno fue consumido, sin embargo no muestran si fue mineralizado, puesto que no cuantificaron los gases generados en el proceso como es el CO₂ y el N₂. Por otra parte Ghosh y col. (1996), llevaron a cabo estudios sobre la eliminación de tolueno por metanogénesis en un reactor de flujo pistón. El reactor consistió de una caja hermética rectangular con una capacidad de 41 l, que presentaba diferentes puertos de muestreo y en su interior tres divisiones zigzagueantes. Este fue operado a un tiempo de residencia hidráulico (TRH) de 13 días y alimentado con una DQO de 11000 mg/l, que fue elaborada en el laboratorio y con 50 mg/l de tolueno (3.84 mg tolueno/l.d). Los datos obtenidos muestran eficiencias de consumo de tolueno de 95% y de reducción de DQO de 96%. También se observó que el 80% del gas generado lo constituyó el metano. Por otra parte como se pudo mostrar en el apartado de resultados, en este trabajo los microorganismos desnitrificantes tuvieron la capacidad de oxidar velocidades de carga de tolueno hasta de 125 mg C/l.d.

La eliminación o consumo de un compuesto recalcitrante no depende sólo de su estructura sino también puede ser altamente dependiente de diversas variables ambientales tales como la disponibilidad del sustrato, el pH, la temperatura, la relación C/N, la concentración del compuesto, la presencia de sustrato adicionales, la presencia de los microorganismos necesarios para oxidar tal compuesto, entre otros. Seguramente algunas de estas variables influyeron en la evolución del proceso desnitrificante desasimilativo encontrado en este trabajo. A continuación se discuten algunas de ellas.

Se puede decir que el reactor continuo UASB, fue una elección adecuada para el tratamiento anóxico de este hidrocarburo, ya que presenta algunas características que permitieron el manejo apropiado del tolueno. Por ejemplo, el uso de este reactor no involucra agitación y por lo tanto minimiza la pérdida por volatilización del compuesto. Otra característica que presenta un reactor continuo es que puede evitar la inhibición por altas concentraciones de algún compuesto tóxico, en este caso el tolueno, ya que las concentraciones dentro del reactor son mantenidas bajas en comparación con los cultivos en lote (Rozkov y col., 1998). Como se pudo observar en los ensayos, se encontró una biomasa muy activa permitiendo tratar altas velocidades de carga de tolueno, esto fue logrado por las bajas concentraciones de tolueno detectadas en el reactor que fueron menores que 6 mg C-tolueno/l. Estos datos estuvieron muy por debajo respecto de algunos valores inhibitorios que se han observado en cultivos en lote. Por ejemplo, Elmen y col. (1997), en un estudio sobre el consumo de tolueno por condiciones desnitrificantes, encontró que a concentraciones mayores de 55 mg tolueno/l, se observa una inhibición del cultivo. En otro trabajo reportado por Peña y col. (2003), se observó que a concentraciones superiores a 70 mg tolueno/l, el proceso desnitrificante se ve afectado.

Cabe mencionar que los lodos fueron extraídos de un reactor que no había sido expuesto a este hidrocarburo, lo que mostró una gran versatilidad de la biomasa microbiana, puesto que no requirió tiempos de adaptación para oxidar el tolueno. Resultados similares fueron encontrados por Evans y col. (1991), al someter el consumo de tolueno a diferentes fuentes de inóculo, donde algunas de ellos no habían tenido contacto a este hidrocarburo. Aunque estos resultados contrastan con los encontrados por Phels y Young (1999), que en estudios en lote sobre la eliminación de BTEX empleando inóculos provenientes de sitios

contaminados (por hidrocarburos) y no contaminados, únicamente observan el consumo de BTEX en los ensayos cuyo inóculo provenía de sitios contaminados.

Otra variable que seguramente contribuyó al proceso desnitrificante fue el pH. Diversos estudios realizados han mostrado la influencia de este factor sobre las enzimas desnitrificantes. Al respecto, Pérez (1998), trabajando con distintas fuentes de electrones (acetato, lactato y etanol) sobre el proceso desnitrificante a diferentes valores de pH, mencionó que no existen diferencias significativas en un intervalo 6 a 9, logrando eficiencias desnitrificantes del 100%. Sin embargo, a pH de 5 la desnitrificación se inhibe. Thomsen y col. (1994), en otro estudio, reportan diferencias muy marcadas entre valores de pH ácidos y básicos cuando se estudió su efecto sobre la bacteria desnitrificante *Paracoccus denitrificans*. Los autores observaron que a un pH de 5.5, la velocidad de reacción de las enzimas desnitrificantes se vuelve lenta, observando una acumulación transitoria de intermediarios como el nitrito y el óxido nitroso. Sin embargo, a un pH de 8.5, la presencia de tales intermediarios no fue pronunciada, encontrándose nitrógeno molecular inmediatamente después que el nitrato empezó a consumirse. En otro trabajo realizado por Glass y Silverstein (1998), tratando aguas residuales con altas concentraciones de N-NO_3^- (2700 mg/l), observó que a valores de pH entre 6.5 y 7, se inhibe la desnitrificación. En cambio a valores entre 7.5 y 9, la desnitrificación se lleva a cabo, pero se observa una acumulación significativa de N-NO_2^- , que va incrementando a medida que aumenta el pH. Como se describió anteriormente, en el presente trabajo, los valores de pH siempre fueron superiores 8, en consecuencia no se observó una acumulación significativa de algunos intermediarios nitrogenados, encontrando como producto principal del proceso nitrógeno molecular, sin importar la velocidad de carga de tolueno tratada.

La relación carbono/nitrógeno (C/N) es otro parámetro que orienta de forma importante el proceso respiratorio. Se ha observado que esta variable está relacionada con la acumulación de los compuestos involucrados en la desnitrificación e incluso puede encausar hacia la desasimilación reductiva de nitrato a amonio (DNRA). Al respecto, Oh y Silverstein (1999), realizaron trabajos de desnitrificación en reactores de lote secuenciado, empleando acetato como agente reductor. En los datos generados, encontraron que a una relación C/N de 1:1, se presentó una acumulación de nitrito del 30%. En cambio cuando la relación C/N estuvo en 2:1 y 3:1, el nitrato fue consumido sin presentarse acumulación de nitrito. Sin embargo,

en la última relación mencionada se observa una notable concentración de acetato no consumido. Otro trabajo realizado por Akuna y col. (1994), empleando glucosa como fuente de carbono a distintos valores de C/N (1.3 y 5.6), muestra que a medida que la relación C/N desciende, la generación de amonio disminuye. En términos generales el punto de inicio para el estudio de la C/N, radica en su valor estequiométrico (Cuervo-López, 2003). Como se mostró anteriormente la C/N, empleada en este trabajo fue de 1.4 (que incluye la posible formación de biomasa). Si consideramos que la relación C/N estequiométrica para el acetato es de 1.07 y para el tolueno de 0.83, podemos decir que la relación C/N estuvo cercana a la estequiométrica. Esto permitió la conducta de un proceso respiratorio desnitrificante desasimilativo, sin una acumulación significativa, tanto de compuestos nitrogenados, como carbonados.

Otro factor frecuentemente mencionado en la literatura es el efecto que ejerce la fuente de electrones sobre las enzimas desnitrificantes. Diversos estudios han mostrado cierta competencia entre las enzimas nitrato y nitrito reductasas por los electrones generados por la fuente de energía. Un trabajo realizado por Rijn y col. (1996), con *Pseudomonas stutzeri* muestra que existió una mayor acumulación de nitrito cuando se empleó acetato como fuente de energía, que cuando se usó butirato. Por otra parte, observaron que el butirato fue consumido más lentamente que el acetato. Los autores concluyen que en presencia de nitrato y nitrito, los electrones del acetato fluyen preferentemente hacia la nitrato reductasa, mientras que los electrones generados por el butirato reducen más rápidamente la nitrito reductasa que la nitrato reductasa. Resultados similares fueron reportados por Almeida y col. (1995), que trabajando con *Pseudomonas fluorescens*, observaron cierta competencia entre las enzimas nitrato y nitrito reductasa por los electrones generados por la fuente de energía. En otro trabajo, Wilderer y col. (1987), sugieren que el tipo de donador de electrones también puede influir en la selección de poblaciones particulares de bacterias desnitrificantes presentes en un cultivo mixto. Al respecto, estos autores, en estudios con bacterias desnitrificantes expuestas a distintas condiciones ambientales (fermentativa, aerobio, desnitrificante), reportan una considerable acumulación de nitrito cuando se usó glucosa como fuente de carbono. En cambio la acumulación no se observó, o fue transitoria, cuando se utilizó acetato. En base a estos resultados, Wilderer y col. (1987), mencionan que existen dos clases de bacterias desnitrificantes en una población mixta: las bacterias que

respiran nitrato, que solo reducen el nitrato a nitrito y las verdaderas bacterias desnitrificantes que reducen el nitrato hasta el nitrógeno molecular. Estos autores sugieren que alguna clase de bacterias es favorecida con respecto a la otra, al emplear distintas fuentes reductoras. La acumulación de nitrito observada por estos autores, quizás se debió a la presencia de bajas concentraciones de oxígeno, (al someter a las bacterias a condiciones desnitrificantes), ya que se ha observado que las enzimas nitrato y nitrito reductasas se ven inhibidas en presencia de oxígeno (Coyne y Tiedge, 1990). Tal inhibición, es más severa en la enzima nitrito reductasa, llevando a una acumulación considerable de nitrito.

Los resultados encontrados en el presente trabajo sugieren que no se presentó la competencia de las enzimas nitrito y nitrato reductasas por los electrones generados por el tolueno y el acetato. Esto se sustenta por el consumo simultáneo de acetato y de tolueno durante las distintas velocidades de carga de carbono estudiadas. Aunado a esto, se encontró que el producto principal del proceso fue nitrógeno molecular, respaldando una correcta actividad de las enzimas desnitrificantes. Además no se encontraron cantidades significativas de nitrato o nitrito a la salida del reactor, lo cual da muestra una vez más de un proceso desasimilativo. Por otra parte, los resultados encontrados en el presente estudio no respaldan la hipótesis de Wilderer y col. (1987), de la inclinación hacia ciertas poblaciones de bacterias desnitrificantes al emplear distintas fuentes de carbono.

Respecto al consumo simultáneo de acetato y tolueno encontrado en este trabajo, son necesarios más estudios que ayuden a explicar cómo un sustrato fácilmente oxidable, como el acetato, sea mineralizado paralelamente con un compuesto aromático como el tolueno. Aunque si se observa, desde el punto de vista termodinámico, la energía libre disponible de la oxidación de tolueno por desnitrificación es de $\Delta G^{\circ} = -3554$ kJ/mol de tolueno, mientras que para el acetato es de $\Delta G^{\circ} = -806.74$ kJ/mol de acetato (Heider, 1999). Esto muestra que los microorganismos desnitrificantes obtendrán más energía al consumir el tolueno.

Respecto al consumo simultáneo de tolueno con otros compuestos, Frazer y col. (1995), en una revisión bibliográfica sobre el metabolismo de tolueno bajo condiciones anaerobias, describe estudios realizados en lote con células de la cepa T1, observando un consumo simultáneo de tolueno y piruvato, sin que se evidenciara un comportamiento diáuxico. Por su parte Su y Kafkewitz (1994), observaron que células de *Pseudomonas maltophilia*

metabolizaron simultáneamente tolueno y succinato, además encontraron que el tolueno se continuó metabolizando aún a relaciones molares succinato/tolueno de 100. Otro estudio realizado por Ma y Love (2001) en reactores de lote secuenciado (SBR) operados bajo condiciones desnitrificantes, muestra el consumo paralelo de tolueno con una fuente orgánica fácilmente oxidable (600 mg DQO/l). Respecto a los estudios en cultivo continuo, podemos mencionar al realizado por Ghosh y col. (1996), que empleando un reactor de flujo pistón (41 l), tratan residuos con una concentración de DQO de 11000 mg/l al cual adicionan una concentración de tolueno de 50 mg/l con un tiempo de residencia hidráulica de 13 días.

Como puede verse se requiere de más investigación que permita dilucidar el efecto que puede ejercer la adición de un sustrato fácilmente oxidable en el consumo de tolueno. Estos estudios podrían coadyuvar al tratamiento más eficiente de sitios contaminados por hidrocarburos como el tolueno.

5.2.1.5 Referencias

Almeida, J. S., Reis, M. A. M., and Carrondo, M. J. T. (1995). Competition between nitrate and nitrite reduction in denitrification by *Pseudomonas fluorescens*. *Biotechnol. Bioengr.* **46** (5): 476-484.

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

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

Akuna, J. C., Bizeau, C., and Moletta, R. (1994). Nitrate reductions by anaerobic sludge using glucose at various nitrate concentrations: amination, denitrification and methanogenic activities. *Environm. Tech.* **15**: 41-49.

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

Biegert, T. and Fuchs, G. (1995). Anaerobic oxidation of toluene (analogues) to benzoate (analogues) by whole cells and cell extracts of a denitrifying *Thauera* sp. *Arch. Microbiol.* **63**: 407-417.

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

Coyne, M. S., and Tiedje, J. M. (1990). Inducción of denitrifying enzymes in oxygen-limited *Achromobacter cycloclastes* continuous culture. *FEMS Microbiol. Ecol.* **73**: 263-270.

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

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

Deutz, W. A., Jong, C. D., Williams, P. A. and Andel, J. G. (1994). Competition in chemostat culture between *Pseudomonas* strains that use different pathways for the degradation of toluene. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 2858-2863.

Elmen, J., Pan, W., Leung, S. Y., Magyarosy, A. and Keasling, J. D. (1997). Kinetics of toluene degradation by a nitrate-reducing bacterium isolated from a groundwater aquifer. *Biotechnol. Bioeng.* **55**: 82-90.

Edwards, E. A., Wills, L. E., Reinhard, M. and Grbic-Galic, D. (1992). Anaerobic degradation of toluene and xylene by aquifer microorganisms under sulfate-reducing conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 794-800.

Edwards, E. A. and Grbic-Galic, D. (1994). Anaerobic degradation of toluene and *o*-xylene by a methanogenic consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**(1): 313-322.

Evans, P. J., Mang, D. T. and Young, L. Y. (1991). Degradation of toluene and *m*-xylene and transformation of *o*-xylene by Denitrifying enrichment cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**(2): 450-454.

Evans, P. J., Ling, W., Goldschmidt, B., Ritter, E. R., and Young, L. Y. (1992). Metabolites formed during anaerobic transformation of toluene and *o*-xylene and their proposed relationship to the initial steps of toluene mineralization. *Appl. Environ. Microbiol.* **58** (2): 496-401.

Frazer, A. C., Coschigano, P. W. and Young, L. Y. (1995). Toluene metabolism under anaerobic conditions: a review. *Anaerobe*. **1**: 293-303.

Ghosh, S., Liu, T. and Fukushi, K. (1996). Anaerobic biodegradation of toluene in a plug-flow reactor. Joint conference on the environment.

Glass, C. and Silverstein, J. (1998). Denitrification kinetics of high nitrate concentration water: pH effect on inhibition and nitrite accumulation. *Wat. Res.* **32**(3): 831- 839.

Haigler, B. E., Pettigrew, C. A., and Spain, J. C. (1992). Biodegradation of mixtures of substituted benzenes by *Pseudomonas sp.* Strain js 150. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 2237-2244.

Heider, J., Spormann, A. M., Beller, H. R. and Widdel, F. (1999). Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. *FEMS Microbiol. Reviews.* **22**: 459-473.

Hutchins, S. R. (1991). Biodegradation of monoaromatic hydrocarbons by aquifer microorganisms using oxygen, nitrate, or nitrous oxide as the terminal electron acceptor. *Appl. Environ. Microbiol.* **57** (8): 2403-2407.

Lovley, D. R. and Lonergan, D. J. (1990). Anaerobic oxidation of toluene, phenol and *p*-cresol by the dissimilatory iron-reducing organisms GS-15. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1858-1864.

Ma, G. and Love, N. G. (2001). BTX biodegradation in activated sludge under multiple redox conditions. *J. Env. Eng.* **127**(6): 509-516.

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

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

Peña-Calva, A., Olmos, D. A., Cuervo-López, F. M., y Gómez, J. (2003). La desnitrificación en presencia de benceno, tolueno y *m*-xileno como agentes reductores del nitrato. Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Puerto Vallarta, México.

Pérez, T. J. (1998). Estudio y evaluación del efecto del pH y la fuente de electrones en la desnitrificación en estado estacionario. Tesis. Maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa. México.

Phelps, C. D. and Young, L. Y. (1999). Anaerobic biodegradation of BTEX and gasoline in various aquatic sediments. *Biodegradation.* **10**:15-25.

Rijn, V. J., Tal, Y. and Barak, Y. (1996). Influence of volatile fatty acids on nitrite accumulation by a *Pseudomonas stutzeri* strain isolated from a denitrifying fluidized bed reactor. *Appl. Environ. Microbiol.* **62** (7): 2615-2620.

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

Schocher, R. J., Seyfried, B., Vazquez, F. and Zeyer, J. (1991). Anaerobic degradation of toluene by pure cultures of denitrifying bacteria. *Arch. Microbiol.* **175**: 7-12.

Seyfried, B., Glod, G., Schocher, R., Tschsch, A. and Zeyer, J. (1994). Initial reactions in the anaerobic oxidation of toluene and *m*-xylene by denitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **60** (11): 4047-4052.

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

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

Wilderer, P. A., Lones, W. L. and Dau, U. (1987). Competition in denitrification systems affecting reduction rate and accumulation of nitrite. Wat. Res. **21**(2): 239-245.

Wilson, P., and Bouwer, E.J. (1997). Biodegradation of aromatic compounds under mixed oxygen/denitrifying conditions: A review. J. Ind. Microbiol. Biotech. **18**: 116-130.

6. CONCLUSIONES

En regimen estacionario:

El reactor desnitrificante UASB, alimentado con acetato como fuente de carbono y energía y nitrato como fuente de nitrógeno, a velocidades de carga de 250 mg C/l.d y 178 mg N-NO₃⁻ /l.d, respectivamente, alcanzó eficiencias de consumo de carbono y nitrógeno mayores que 98%, así como rendimientos desnitrificantes superiores a 0.98.

Con la mezcla de acetato y tolueno:

El proceso desnitrificante no se vió significativamente afectado por la adición de distintas velocidades de carga de tolueno, las cuales oscilaron entre 25 y 125 mg C-tolueno/l.d.

A velocidades de carga de carbono de tolueno entre 25 y 125 mg C /l.d, las eficiencias de consumo de carbono y nitrógeno siempre fueron mayores que 87% y los rendimientos de nitrógeno fueron superiores a 0.87, independientemente de la velocidad de carga de carbono estudiada.

Considerando lo anterior, se puede decir que los resultados obtenidos aportan bases para sustentar la eliminación de un hidrocarburo aromático como es el tolueno por un cultivo en continuo.

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la unidad
Iztapalapa aprobó la comunicación de resultados

Estudio del tolueno como fuente de carbono en la desnitrificación en un reactor en continuo

Que presentó

Sergio Martínez Hernández

H. Jurado:

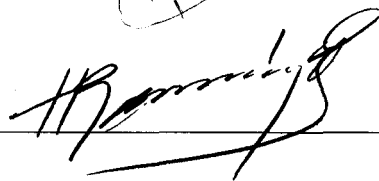
Director: Dr. Jorge Gómez Hernández



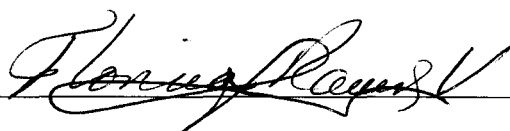
Asesor: Dra. Flor de María Cuervo López



Asesor: Dr. Hugo C. Ramírez Saad



Sinodal: Dra. Florina Ramírez Vives



Sinodal: Dr. Alejandro Olmos Dichara

