



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**ACLIMATACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE CONSORCIOS  
MICROBIANOS EN UN REACTOR POR LOTES PARA  
LA DEGRADACIÓN DE AMINAS GASTADAS**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**INGENIERO QUÍMICO**

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

**TRUJILLO SUBÍAS CARLOS EDUARDO**



**MÉXICO, D. F.**

**2012**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



---

JURADO ASIGNADO.

PRESIDENTE: Rodolfo Torres Barrera

VOCAL: María Rafaela Gutiérrez Lara

SECRETARIO: Landy Irene Ramírez Burgos

1er. SUPLENTE: Rolando Salvador García Gómez

2do. SUPLENTE: Alfonso Duran Moreno

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 301, Conjunto E, Facultad de Química, Ciudad Universitaria.

ASESOR DEL TEMA

\_\_\_\_\_  
M. en I. María Rafaela Gutiérrez Lara

SUSTENTANTE

\_\_\_\_\_  
Carlos Eduardo Trujillo Subías



---

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México que ha sido como mi segundo hogar durante mi formación como profesional.

A mis padres Jesús de Guadalupe Trujillo Hernández y Blanca Estela Subías Vázquez quienes con su esfuerzo y dedicación me han brindado todos los valores que poseo.

A mi hermana Bianca Berenice Trujillo Subías quien me ha apoyado siempre y en todo momento, y quien tolero todas y cada una de las noches de insomnio que le hice pasar.

A mis abuelos Jorge Esteban Subías y Gloria Vázquez que en todo momento me han apoyado siendo incluso como mis segundos padres.

A mis tíos que siempre me han dado consejos para ser alguien mejor y en especial a mis tíos José Trujillo, Miguel Ángel Subías, Miriam Subías, Esperanza Trujillo, Rosalía Trujillo, Mario Martín y Vicky que siempre me brindan su apoyo.

A mi novia Reyna Esmeralda Osorio Alcocer quien no solo me brinda su apoyo moral si no que también me ayudó en la realización de este trabajo, además de soportar mis múltiples estados de estrés.

A mis profesores de la Facultad de Química quienes me formaron como profesionista.

A la M. en I. Ma. Rafaela Gutiérrez Lara por su apoyo, consejos y sobre todo por la confianza que siempre ha tenido en mí.

A mis amigos y hermanos José Carlos Álvarez Ignacio, Ricardo Flores Jiménez y Tetzin Domínguez Fabela con quienes compartí grandes momentos a lo largo de nuestra formación.



---

A mis compañeros y amigos Gonzalo, Flor, Claudia, Mota, Ceballos, Medrano, José Carlos y Sergio del laboratorio 301, en especial a Aarón Flores, Eric Abraham, Isa, Nora y Antonio Ruiz que me aconsejaron y apoyaron durante la elaboración del trabajo experimental.

A mis amigos de la Facultad de Química con quienes compartí momentos únicos y que concluida la travesía durante nuestra formación profesional, aun continúan brindándome su amistad y apoyo.

A mis amigos Maya, Francisco, Eder y Saúl con quienes compartí un sin número de momentos épicos durante nuestra formación en la ENP 8.



---

## DEDICATORIAS

A mi bisabuela Juanita y a mi abuelo David Trujillo, quienes inculcaron en mí un valioso y único significado de que el esfuerzo se ve reflejado en las acciones venideras y sobre todo en aquellos que nos rodean, gracias por haberme dejado ese gran legado.

A mis padres y mi hermana quienes son mi núcleo familiar y a quienes les debo ser quien soy y ser como soy.

A mis abuelos Esteban Subías, Gloria Vázquez y Esperanza Hernández.

A Esmeralda Osorio quien es mi más grande tesoro y una de las personas más especiales que forman parte de mi vida.



## CONTENIDO

<b>CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>16</b>
<b>1. PROBLEMÁTICA.....</b>	<b>16</b>
1.1    Introducción.....	16
1.2    Objetivo general. ....	17
1.3    Objetivos particulares.....	17
1.4    Hipótesis. ....	18
<b>CAPÍTULO 2 .....</b>	<b>19</b>
<b>2. ANTECEDENTES. ....</b>	<b>19</b>
2.1    Procesos involucrados en la generación de aminas gastadas. ....	19
2.1.1    Generación de gases amargos en las refinerías.....	19
2.1.2    Tratamiento de gases amargos. ....	22
2.1.3    Uso de alcanolaminas para el tratamiento de gases amargos. .	26
2.2    Procesos Biológicos.....	31
2.2.1    Microbiología general en aguas residuales.....	34
2.2.2    Clasificación bacteriana.....	42
2.2.3    Cinética Enzimática. ....	51
2.2.4    Crecimiento bacteriano. ....	65
2.3    Biodegradación de compuestos nitrogenados.....	73
2.3.1    Ciclos biológicos. ....	75
2.3.2    Nitrificación y desnitrificación bacteriana.....	79
<b>CAPÍTULO 3. ....</b>	<b>87</b>
<b>3. METODOLOGÍA.....</b>	<b>87</b>
3.1    Implementación de técnicas analíticas. ....	88
3.2    Caracterización de la biomasa. ....	89
3.2.1    Fuente del inóculo. ....	89
3.2.2    Aislamiento e identificación de cultivos bacterianos.....	90
3.3    Aclimatación de la biomasa. ....	92



3.4	Cinéticas de degradación de aminas gastadas. ....	96
<b>CAPÍTULO 4. ....</b>		<b>98</b>
4.	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN. ....</b>	<b>98</b>
4.1	Caracterización de las aminas gastadas. ....	98
4.2	Caracterización de la biomasa. ....	100
4.2.1	Identificación de la biomasa al inicio de la aclimatación. ....	100
4.2.2	Identificación de la biomasa aclimatada. ....	107
4.3	Aclimatación de la biomasa. ....	111
4.3.1	Comportamiento de los parámetros de respuesta. ....	112
4.3.2	Criterio de selección de las condiciones de adaptación adecuadas. ....	121
4.4	Cinéticas de degradación de las aminas gastadas. ....	122
4.4.1	Análisis comparativo de los consorcios. ....	122
4.4.2	Selección y mantenimiento del consorcio seleccionado. ....	144
<b>CAPÍTULO 5. ....</b>		<b>145</b>
5.	<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES. ....</b>	<b>145</b>
5.1	Conclusiones. ....	145
5.2	Recomendaciones a futuros trabajos. ....	148
6.	<b>ANEXOS. ....</b>	<b>150</b>
6.1	Técnica para la determinación de la demanda química de oxígeno, NMX-AA-030-SCFI-2001. ....	150
6.2	Técnica para la determinación del carbono orgánico total, método APHA-AWWA-WPCF (5310). ....	153
6.3	Técnica para la determinación de sólidos suspendidos totales y sólidos suspendidos volátiles, NMX-AA-034-SCFI-2001. ....	154
6.4	Técnica para la determinación de nitratos, método APHA-AWWA- WPCF (4500-N). ....	155
6.5	Técnica para la determinación de nitritos, NMX-AA-099-SCFI-2006.	



---

6.6	Técnica para la determinación de nitrógeno total Kjeldahl, NMX-AA-026-SCFI-2001.....	161
6.7	Técnica para la determinación de sulfuros, ASTM UOP 209-00..	165
6.8	Técnica para la determinación de sólidos sedimentables, NMX-AA-004-SCFI-2000.....	167
6.9	Técnica para la determinación de oxígeno disuelto, NMX-AA-012-SCFI-2001.....	167
6.10	Técnica para la determinación de turbidez, NMX-AA-038-SCFI-2001.	168
6.11	Técnica para la determinación de pH, ASTM-D-1293-99 (2005)...	168
6.12	Técnica para la determinación de la tinción de Gram (Ramírez R., et. al., 2006).....	169
6.13	Técnica empleada para el aislamiento físico de bacterias (Ramírez R., et. al., 2006). .....	171
6.14	Procedimiento para llevar a cabo las pruebas bioquímicas.....	173
7.	REFERENCIAS.....	177



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 2.1</b> Alcanolaminas empleadas para el tratamiento de gases amargos. ....	29
<b>Tabla 2.2</b> Propiedades fisicoquímicas de la dietanolamina. ....	30
<b>Tabla 2.3</b> Clasificación de microorganismos a partir de su fuente de carbono y energía. ....	32
<b>Tabla 2.4</b> Factores bióticos y abióticos considerados en los sistemas de tratamiento de aguas residuales. ....	41
<b>Tabla 2.5</b> Clasificación bacteriana establecida en los sistemas de tratamiento de aguas residuales basado en las características y funciones que desempeñan (Gerardi M., 2006). ....	48
<b>Tabla 2.6</b> Procesos empleados para la remoción de compuestos nitrogenados (Metcalf & Eddy, 2003). ....	74
<b>Tabla 2.7</b> Relación entre la temperatura y el tiempo de residencia celular durante el proceso de nitrificación. ....	82
<b>Tabla 2.8</b> Factores inhibitorios y de toxicidad para bacterias nitrificantes. ....	83
<b>Tabla 2.9</b> Géneros comunes en sistemas de lodos activados que contienen especies desnitrificantes (Gerardi M., 2006). ....	85
<b>Tabla 3.1</b> Técnicas implementadas para la determinación de los parámetros de interés. ....	88
<b>Tabla 3.2</b> Composición de las soluciones nutritivas empleadas. ....	93
<b>Tabla 3.3</b> Condiciones establecidas para la evaluación de la estabilidad del reactor R1. ....	95
<b>Tabla 4.1</b> Caracterización de la amina gastada. ....	98
<b>Tabla 4.2</b> Resultados preliminares obtenidos a partir del aislamiento de las colonias. ....	101
<b>Tabla 4.3</b> Resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas. ....	105
<b>Tabla 4.4</b> Resultados obtenidos del aislamiento de la biomasa adaptada. ....	107
<b>Tabla 4.5</b> Resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas para la biomasa adaptada. ....	110



<b>Tabla 4.6</b> Condiciones de aclimatación establecidas para los sistemas reaccionantes.....	121
<b>Tabla 4.7</b> Coeficientes de crecimiento obtenidos en términos de DQO y COD. .	139
<b>Tabla 4.8</b> Coeficientes cinéticos obtenidos para cada sistema a las condiciones planteadas.....	143
<b>Tabla 4.9</b> Remociones obtenidas para cada una de las cinéticas. ....	144
<b>Tabla 6.1</b> Patrones para la elaboración de la curva de calibración de DQO.....	151
<b>Tabla 6.2</b> Patrones para la elaboración de la curva de calibración de nitratos. ..	155
<b>Tabla 6.3</b> Porción de muestra estimada para determinar la cantidad de sulfuros presentes en la muestra. ....	165



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 2.1</b> Diagrama de flujo general del proceso de refinación del petróleo (Gary, 2001).....	20
<b>Figura 2.2</b> Etapas involucradas en la generación de gases amargos en el proceso de refinación del petróleo. ....	21
<b>Figura 2.3</b> Proceso Girbotol. ....	23
<b>Figura 2.4</b> Clasificación de alcanolaminas. ....	27
<b>Figura 2.5</b> Condiciones de la alcanolamina en función de las condiciones a las cuales opera el proceso (Sheilan H., 2007). ....	31
<b>Figura 2.6</b> Características celulares entre procariontes y eucariontes. ....	36
<b>Figura 2.7</b> Conformación observada de filamentos que caracterizan a algunas de las especies más comunes de hongos. ....	37
<b>Figura 2.8</b> Algas comúnmente encontradas en aguas residuales.....	38
<b>Figura 2.9</b> Protozoarios comúnmente encontrados en sistemas de aguas residuales.....	39
<b>Figura 2.10</b> Morfología observada de un rotífero y nematodo. ....	40
<b>Figura 2.11</b> Conformación diferencial de bacterias Gram negativas y positivas de acuerdo a su pared celular.....	45
<b>Figura 2.12</b> Morfologías bacterianas. ....	46
<b>Figura 2.13</b> Variación de la rapidez inicial de reacción en función de la concentración del sustrato. ....	54
<b>Figura 2.14</b> Gráfico de linealización de Lineweaver-Burk.....	59
<b>Figura 2.15</b> Linealización de la inhibición competitiva.....	61
<b>Figura 2.16</b> Linealización de la inhibición incompetitiva.....	63
<b>Figura 2.17</b> Linealización de la inhibición no competitiva simple y mixta.....	64
<b>Figura 2.18</b> Curva de crecimiento bacteriano. ....	68
<b>Figura 2.19</b> Efecto de la concentración de sustrato sobre la tasa de crecimiento específica. ....	71
<b>Figura 2.20</b> Linealización de la ecuación de Monod.....	72



<b>Figura 2.21</b> Ciclo biológico del carbono (Singleton P., 2004).....	77
<b>Figura 2.22</b> Ciclo biológico del nitrógeno (Singleton P., 2004). .....	78
<b>Figura 2.23</b> Ciclo biológico del azufre (Singleton P., 2004).....	79
<b>Figura 2.24</b> Distribución de amonio y amoniaco en función del pH (Gerardi M., 2006).....	81
<b>Figura 3.1</b> Diagrama general del procedimiento experimental.....	87
<b>Figura 3.2</b> Características morfológicas observadas en colonias desarrolladas en agar, contemplando: 1. Forma, 2. Borde, 3. Elevación y 4. Color (Ramírez R., et al., 2006). .....	91
<b>Figura 3.3</b> Pruebas bioquímicas Remel RapID™ ONE y RapID™ NF Plus empleadas para la identificación de los microorganismos.....	92
<b>Figura 4.1</b> Condición de la amina gastada proveniente de la refinería “Ing. Antonio M. Amor” ubicada en Salamanca Guanajuato. ....	99
<b>Figura 4.2</b> Cultivo de microorganismos para el aislamiento (1. Agar nutritivo, 2. Agar Infusión Cerebro Corazón, 3. Agar Cetrimida). ....	100
<b>Figura 4.3</b> Bacterias asiladas en medio de cultivo nutritivo. ....	103
<b>Figura 4.4</b> Resultados de la tinción de gram vistas al microscopio con un coeficiente de aumento de 20X. ....	104
<b>Figura 4.5</b> Cultivo de bacterias aisladas en el medio cetrimida a partir de los cultivos puros obtenidos en el medio nutritivo e infusión cerebro corazón. ....	104
<b>Figura 4.6</b> Aislamiento de bacterias aclimatadas. ....	109
<b>Figura 4.7</b> Tinción de gram de las bacterias aclimatadas vistas a un coeficiente de amplitud de 20X. ....	109
<b>Figura 4.8</b> Sistemas reaccionantes empleados para la aclimatación de la biomasa. ....	112
<b>Figura 4.9</b> Modificación de los sistemas reaccionantes. ....	117
<b>Figura 6.1</b> Determinación del punto final de la valoración de sulfuros. ....	166
<b>Figura 6.2</b> Método de siembra de cultivos para el aislamiento de bacterias. ....	172
<b>Figura 6.3</b> Principios y componentes de los sistemas RapID™. ....	174
<b>Figura 6.4</b> Interpretación de las pruebas del sistema RapID™. ....	176



## ÍNDICE DE GRÁFICOS.

<b>Gráfico 4.1</b> Evaluación del sistema R1 con cargas iniciales de 1000 mg DQO/L y 1400 mg DQO/L. ....	113
<b>Gráfico 4.2</b> Evaluación del sistema R1 en términos de la DQO. ....	114
<b>Gráfico 4.3</b> Acondicionamiento del sistema R2. ....	115
<b>Gráfico 4.4</b> Comportamiento de los reactores durante la desestabilización. ....	116
<b>Gráfico 4.5</b> Resultados obtenidos para el reacondicionamiento del sistema R1. ....	118
<b>Gráfico 4.6</b> Resultados obtenidos para el reacondicionamiento del sistema R2. ....	118
<b>Gráfico 4.7</b> Resultados de la evaluación del sistema R1 después de reacondicionar el sistema. ....	119
<b>Gráfico 4.8</b> Resultados de la evaluación del sistema R2 después de reacondicionar el sistema. ....	120
<b>Gráfico 4.9</b> Comportamiento de las especies nitrogenadas en ausencia del inoculo. ....	123
<b>Gráfico 4.10</b> Resultados obtenidos de SSV con 30 mL de lodos y 500 mg DQO/L. ....	124
<b>Gráfico 4.11</b> Resultados obtenidos de DQO con 30 mL de lodos y 500 mg DQO/L. ....	125
<b>Gráfico 4.12</b> Resultados obtenidos de COD con 30 mL de lodos y 500 mg DQO/L. ....	125
<b>Gráfico 4.13</b> Resultados obtenidos de pH con 30 mL de lodos y 500 mg DQO/L. ....	126
<b>Gráfico 4.14</b> Resultados obtenidos de $\text{NO}_2^-$ con 30 mL de lodos y 500 mg DQO/L. ....	127
<b>Gráfico 4.15</b> Resultados obtenidos de $\text{NO}_3^-$ con 30 mL de lodos y 500 mg DQO/L. ....	127
<b>Gráfico 4.16</b> Resultados obtenidos de N-NH <sub>3</sub> con 30 mL de lodos y 500 mg DQO/L. ....	128



<b>Gráfico 4.17</b> Resultados obtenidos de SSV con 60 mL de lodos y 500 mg DQO/L. .....	129
<b>Gráfico 4.18</b> Resultados obtenidos de DQO con 60 mL de lodos y 500 mg DQO/L. .....	130
<b>Gráfico 4.19</b> Resultados obtenidos de COD con 60 mL de lodos y 500 mg DQO/L. .....	130
<b>Gráfico 4.20</b> Resultados obtenidos de pH con 60 mL de lodos y 500 mg DQO/L. .....	131
<b>Gráfico 4.21</b> Resultados obtenidos de $\text{NO}_2^-$ con 60 mL de lodos y 500 mg DQO/L. .....	132
<b>Gráfico 4.22</b> Resultados obtenidos de $\text{NO}_3^-$ con 60 mL de lodos y 500 mg DQO/L. .....	132
<b>Gráfico 4.23</b> Resultados obtenidos de N-NH <sub>3</sub> con 60 mL de lodos y 500 mg DQO/L. ....	133
<b>Gráfico 4.24</b> Resultados obtenidos de SSV con 60 mL de lodos y 1500 mg DQO/L. ....	134
<b>Gráfico 4.25</b> Resultados obtenidos de DQO con 60 mL de lodos y 1500 mg DQO/L. ....	135
<b>Gráfico 4.26</b> Resultados obtenidos de COD con 60 mL de lodos y 1500 mg DQO/L. ....	135
<b>Gráfico 4.27</b> Resultados obtenidos de pH con 60 mL de lodos y 1500 mg DQO/L. .....	137
<b>Gráfico 4.28</b> Resultados obtenidos de $\text{NO}_2^-$ con 60 mL de lodos y 1500 mg DQO/L. ....	137
<b>Gráfico 4.29</b> Resultados obtenidos de $\text{NO}_3^-$ con 60 mL de lodos y 1500 mg DQO/L. ....	138
<b>Gráfico 4.30</b> Resultados obtenidos de N-NH <sub>3</sub> con 60 mL de lodos y 1500 mg DQO/L. ....	138
<b>Gráfico 4.31</b> Linealización para la obtención de los coeficientes cinéticos para R1 a la condición 1. ....	140



---

<b>Gráfico 4.32</b> Linealización para la obtención de los coeficientes cinéticos para R2 a la condición 1. ....	140
<b>Gráfico 4.33</b> Linealización para la obtención de los coeficientes cinéticos para R1 a la condición 2. ....	141
<b>Gráfico 4.34</b> Linealización para la obtención de los coeficientes cinéticos para R2 a la condición 2. ....	141
<b>Gráfico 4.35</b> Linealización para la obtención de los coeficientes cinéticos para R1 a la condición 3. ....	142
<b>Gráfico 4.36</b> Linealización para la obtención de los coeficientes cinéticos para R2 a la condición 3. ....	142
<b>Gráfico 6.1</b> Curva de calibración empleada para la determinación de DQO. ....	152
<b>Gráfico 6.2</b> Curva de calibración empleada para la determinación de $\text{NO}_3^-$ .....	156
<b>Gráfico 6.3</b> Curva de calibración empleada para la determinación de $\text{NO}_2^-$ .....	160



---

## CAPÍTULO 1

### 1. PROBLEMÁTICA.

#### 1.1 Introducción.

La necesidad de obtener productos y materias primas provenientes del crudo de petróleo prevalece de manera constante, sin embargo, es necesario considerar las repercusiones medio ambientales que se ven implicadas para el procesamiento del mismo.

Para poder obtener productos y materias primas a partir del crudo, es necesario efectuar la refinación del mismo, dicha refinación consiste en subsecuentes etapas de separación que conllevan a la obtención de productos ligeros y pesados, tales como el gas licuado de petróleo (LP), querosenos, combustóleo, diesel, gasolinas, naftas, entre otros (Gary, 2001). De esta forma se verán involucradas diferentes corrientes tanto de proceso como de servicio mismas que al ser empleadas llegará un momento en el cual deberán ser puestas a disposición ya sea para su tratamiento, confinamiento o dependiendo de su naturaleza para su vertido siempre y cuando se cumpla con la normativa vigente.

El trabajo desarrollado se enfocó en el tratamiento de la corriente de amina que es empleada para el endulzamiento de las corrientes gaseosas amargas, y que debido a las condiciones del proceso es desechada para su confinamiento y posterior tratamiento, denominándose de esta forma como amina gastada.

Algunas de las alternativas propuestas para el tratamiento de aminas gastadas constan desde tratamientos fisicoquímicos (García S., 2008) hasta tratamientos biológicos (Nakazawa A. y Alcantar F., 2007; Macías O., 2007), obteniendo remociones entre 80 y 90%, sin embargo, la inclinación hacia los tratamientos biológicos es una tendencia muy marcada ya que estos resultan ser más económicos (Metcalf & Eddy, 2003).



Considerando como una buena alternativa el efectuar un tratamiento biológico para la degradación de aminas gastadas, se deben considerar las mejores condiciones a las cuales se podría ver beneficiado el proceso tomando en cuenta el tipo de inóculo utilizado, la capacidad de este para asimilar la materia orgánica susceptible a oxidarse y el tiempo al cual asimila la mayor cantidad de esta. De esta forma el trabajo llevado a cabo se enfocó en obtener una biomasa característica capaz de asimilar aminas gastadas provenientes de refinería contemplando cargas orgánicas elevadas.

### **1.2 Objetivo general.**

Evaluar la capacidad de degradación biológica de aminas gastadas provenientes de la industria, implementando la aclimatación de dos sistemas microbianos caracterizados y evaluándolos mediante cinéticas de remoción para poder determinar en cuál de los dos sistemas empleados se obtiene el mejor resultado para la degradación de las aminas gastadas.

### **1.3 Objetivos particulares.**

- Establecer el método de aclimatación de dos sistemas microbianos para la degradación de la materia orgánica contenida en términos de la demanda química de oxígeno (DQO) en la amina gastada, refiriéndola como contaminante problema.
- Efectuar la identificación de las bacterias presentes en ambos sistemas por medio del aislamiento físico de las mismas y llevando a cabo pruebas de identificación generales, tales como la tinción de Gram, pruebas de oxidasa y pruebas bioquímicas empleando un kit de identificación comercial (RapID™).
- Evaluar las cinéticas de degradación en un reactor por lotes mediante la demanda química de oxígeno (DQO), carbono orgánico disuelto (COD), pH,



---

nitrógeno amoniacal ( $\text{N-NH}_3$ ), nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) y nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) como parámetros de interés para poder seleccionar uno de los sistemas microbianos en base a su efectividad para la remoción de dichos contaminantes.

- Establecer las condiciones adecuadas para obtener las mejores remociones de contaminante utilizando el mejor consorcio microbiano adaptado.
- Determinar por medio de la evaluación del nitrógeno amoniacal, nitratos y nitritos si existe presencia de nitrificación por parte de las bacterias.

#### **1.4 Hipótesis.**

Obteniendo una aclimatación adecuada y con una biomasa compuesta en su gran mayoría por bacterias, se podrán obtener remociones satisfactorias del contaminante en cuestión en términos de la demanda química de oxígeno, de tal manera que seleccionando las condiciones de operación adecuadas se podrá mantener el rendimiento óptimo de los microorganismos encargados de la degradación de las aminas gastadas.



---

## CAPÍTULO 2

### 2. ANTECEDENTES.

#### 2.1 Procesos involucrados en la generación de aminas gastadas.

En la industria del procesamiento de hidrocarburos, la remoción de compuestos ácidos presentes en las subsecuentes corrientes gaseosas y líquidas que se involucran durante las diversas etapas del procesado de los mismos, resultan de gran importancia debido a las implicaciones ambientales y a las necesidades que son requeridas en los productos de interés finales. Dentro de las características que definen a una corriente como amarga o ácida es la presencia de compuestos tales como el sulfuro de hidrógeno ( $H_2S$ ), dióxido de carbono ( $CO_2$ ), sulfuro de carbonilo ( $COS$ ) y mercaptanos ( $R-SH$ ), los cuales son considerados como principales agentes corrosivos, y de este modo se deriva la necesidad de remover estos componentes presentes en las corrientes de los procesos que involucren la generación de corrientes amargas (Gary, 2001; Sheilan H., 2007).

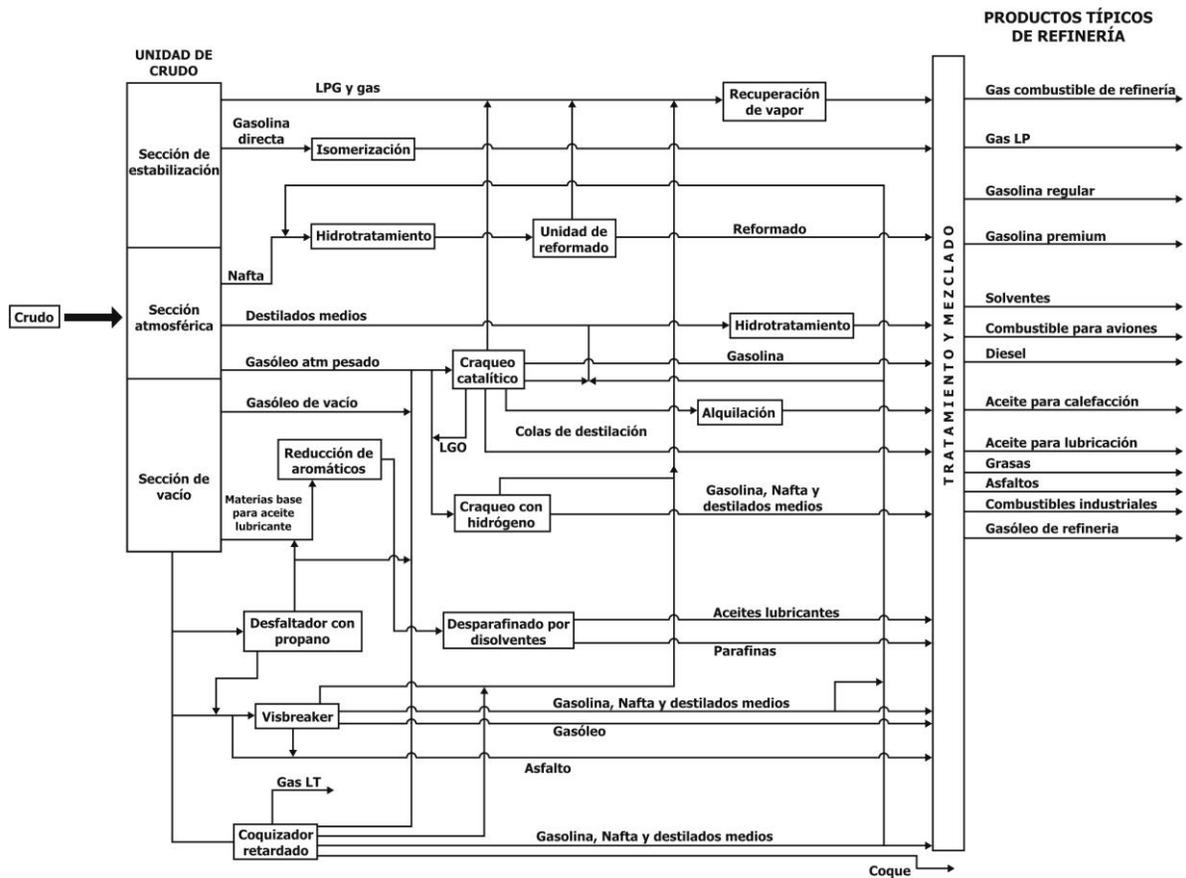
La aplicación del tratamiento de gases amargos es muy común en la industria, tal es el caso de la producción de gas natural, refinación del gas combustible, gases de vertedero, hornos de coqueo, síntesis de gas y purificación de amoníaco.

##### 2.1.1 Generación de gases amargos en las refinerías.

Las diferentes etapas de refinación del petróleo crudo tienen como objetivo principal el extraer compuestos derivados del mismo, los cuales son hidrocarburos de diferentes pesos moleculares y composición, obteniendo de este modo fracciones ligeras y pesadas, las cuales de acuerdo a su composición y grado de pureza servirán como productos aprovechables que bien pueden ser considerados como materias primas en diversos ramos de la industria, así como también podrán ser aprovechables para los procesos mismos de su refinación.



La primera etapa de refinación consiste en una destilación atmosférica, en la cual los primeros derivados en ser obtenidos son butanos, gas húmedo y ligero, nafta ligera inestabilizada, nafta pesada, keroseno, gas de petróleo atmosférico y crudo reducido (Gary, 2001). En la figura 2.1 se observa un esquema generalizado del proceso de refinación del petróleo.

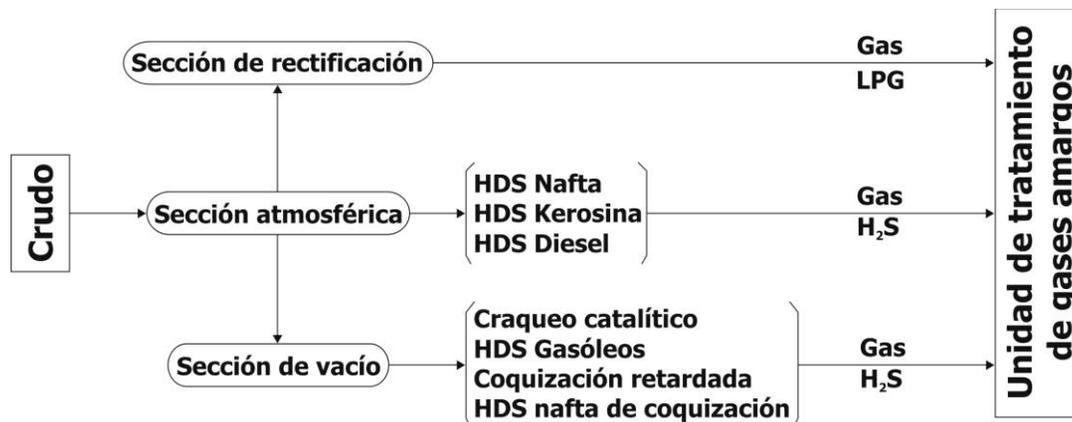


**Figura 2.1** Diagrama de flujo general del proceso de refinación del petróleo (Gary, 2001).

A partir de los derivados que se deseen obtener y de acuerdo a sus características, se dispondrán de diversas etapas de separación de los componentes de interés, dando origen a fracciones tanto ligeras como pesadas, que podrán ser aprovechables de acuerdo a las necesidades que se deseen cubrir por parte de los requerimientos industriales.



Dentro de las diferentes etapas de refinación del petróleo, las corrientes ligeras que se generan (gases con hidrocarburos ligeros de interés), presentarán concentraciones considerablemente altas de sulfuro de hidrógeno ( $H_2S$ ) y dióxido de carbono ( $CO_2$ ), estos compuestos pueden acarrear de las etapas de destilación de crudo, así como también de los procesos de hidrodesulfuración que se dispongan para la obtención de diesel y gasolinas, craqueos catalíticos y reformadores. Debido a que la presencia de estos componentes pueden repercutir en daños a la salud (en especial de los derivados de azufre), así como también presentar daños corrosivos en las tuberías debido a la formación de sus correspondientes formas ácidas, estos compuestos deberán ser removidos para poder obtener productos que cumplan con las especificaciones delimitadas tanto por los distribuidores, como también los requerimientos que se dispongan para cumplir con las normativas establecidas para los productos procedentes de refinerías tales como combustibles gaseosos ó gasolinas. En la figura 2.2 se describen de manera general algunas de las corrientes de las cuales se deriva la generación de gases amargos para ser tratados.



**Figura 2.2** Etapas involucradas en la generación de gases amargos en el proceso de refinación del petróleo.



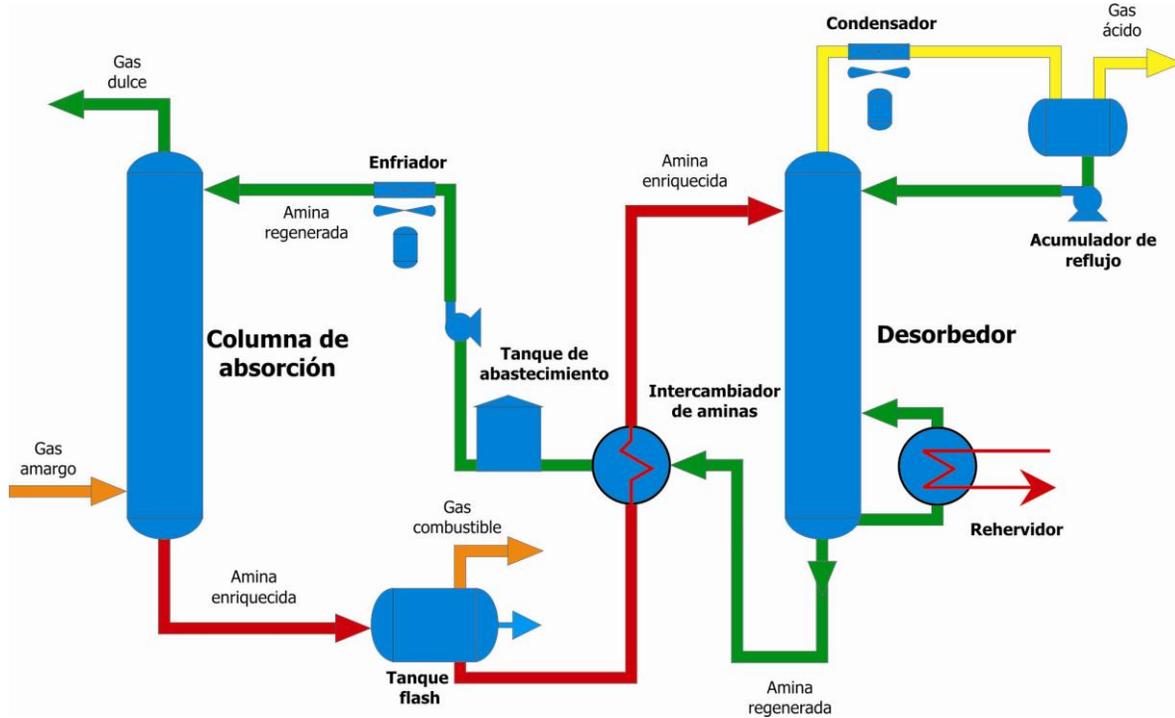
---

### 2.1.2 Tratamiento de gases amargos.

Tal y como se observa en la figura 2.2, las corrientes gaseosas que se generan en las refinerías son canalizadas a una unidad de tratamiento, con la finalidad de remover el sulfuro de hidrógeno y dióxido de carbono que las corrientes de gas acarrearán durante el proceso. De esta forma para el tratamiento de las corrientes gaseosas se disponen de diferentes alternativas para la remoción de los componentes que las caracterizan como amargas, las cuales son:

- Absorción física utilizando un solvente de absorción selectivo.
- Adsorción física utilizando un absorbente sólido.
- Absorción química en donde el solvente químico acarreador puede ser regenerado.

Dentro de la industria de la refinación del petróleo, el proceso empleado como convencional es el llamado proceso del Girbotol, el cual consiste en la absorción química de los componentes ácidos empleando alcanolaminas, las cuales reaccionarán con los compuestos ácidos para formar un complejo salino ácido-base, sin embargo, la amina empleada será susceptible a regenerarse en una subsecuente etapa, en donde el complejo es sometido a una descomposición a elevadas temperaturas, de este modo la amina puede ser recirculada a la unidad de absorción para poder reproducir el ciclo. En la figura 2.3 se ilustra el proceso de tratamiento de gases amargos (Girbotol).



**Figura 2.3** Proceso Girbotol.

En el proceso Girbotol la corriente gaseosa amarga es alimentada por el fondo de la columna absorbidora, esta columna puede ser empacada ó de platos tamizados (Sheilan H., 2007); la corriente gaseosa que ingresa a la columna de absorción comúnmente es pre-tratada para remover sólidos y líquido remanente, los cuales suelen ser hidrocarburos condensados e impurezas presentes en el gas tales como el amoniaco ( $\text{NH}_3$ ), el cual puede repercutir en el proceso en la sección de desorción, en donde el amoniaco presente en el gas amargo que entra en la columna es acarreado hasta la etapa de regeneración, y podrá incrementar en mayor medida el efecto corrosivo por la generación de sales de amonio al entrar en contacto con el  $\text{H}_2\text{S}$  que circula por la sección de enriquecimiento de la columna de desorción. El amoniaco remanente en el gas amargo puede provenir de las unidades de hidrodesulfuración, hidrotratamiento y craqueo térmico que se disponen en el proceso de refinación del petróleo.



En la columna de absorción la amina circula desde la parte superior en contracorriente al gas amargo alimentado, la capacidad y condiciones a las cuales se introduce la amina dependerán en gran medida del tipo de alcanolamina que se emplee, así como también de las condiciones de operación que se fijen para el gas de alimentación. Generalmente la temperatura a la cual se introduce la amina absorbente tendrá una temperatura de entre 6 y 8 °C por encima de la temperatura a la cual se alimenta el gas, de este modo se puede prevenir la condensación de hidrocarburos dentro de la columna, evitando así la formación de espuma (Sheilan H., 2007). El gas amargo generalmente se introduce a la columna a una temperatura de entre 38 a 49 °C, de este modo la temperatura a la cual se alimenta la amina absorbente no excederá los 57 °C. Una vez ocurrido el contacto con el gas, por el fondo saldrá la amina enriquecida con los componentes ácidos del mismo y por el domo el gas tratado ó endulzado sale de la columna de absorción, dirigiéndose a una unidad de separación en donde se recupera una porción de la solución de amina que pudiese haber sido acarreada junto con el gas combustible, la cantidad de solución de amina recuperada se dirige a la corriente del fondo para pasar a la siguiente unidad antes de ser enviada a la columna desorbedora.

La amina enriquecida proveniente de la columna de absorción pasa a través de un tanque flash con el objeto de remover los hidrocarburos que pudiesen haber sido solubilizados, operando en rangos desde 35 a 525 kPa. El implemento de esta unidad suele recomendarse cuando se tenga a consideración la posibilidad de una condensación elevada de los hidrocarburos presentes, ya que las soluciones empleadas de alcanolaminas presentan amplias gamas de solubilidad de hidrocarburos ligeros dependiendo del tipo de amina empleada, mas sin embargo no se asume una insolubilidad total por tratarse de una solución acuosa. Si se considera una cantidad significativa de H<sub>2</sub>S y CO<sub>2</sub> dentro del gas de hidrocarburos que se obtiene del tanque flash, se introduce una sección de absorción en la parte superior del tanque.



En la tercera etapa del proceso, la amina enriquecida atraviesa la unidad de intercambio, en donde es aprovechada la energía proporcionada por parte de la amina regenerada que entra a la unidad a una temperatura de entre 116 y 127 °C proveniente de la sección del fondo de la columna de desorción, cediendo energía a la amina enriquecida que proviene de la unidad de flash a una temperatura de entre 54 a 71 °C. De este modo la temperatura de la amina regenerada logra enfriarse hasta los 82 °C aproximadamente. En esta unidad se prevén las repercusiones de la corrosión debida a la presencia de CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>S, debido a la posibilidad de un flujo a dos fases a causa de la temperatura y presión que se dispongan en la operación.

Por medio de un diferencial de presiones entre la unidad de intercambio y la unidad desorbedora, la amina enriquecida se introduce en la parte superior de la columna, y se lleva a cabo un stripping por medio de un rehervido ubicado en la sección inferior de la columna. El propósito de esta etapa es regenerar la amina enriquecida someténdola a una elevación de temperatura, dicha elevación se considera a partir de la temperatura a la cual se desee operar el domo de la columna y la relación de reflujo que se maneje, tomando como valores típicos una relación de reflujo de 1 a 3 y operando la unidad rehervidora a condiciones tales que en el domo se obtengan temperaturas oscilantes entre los 99 °C a 110 °C, este régimen de control se establece debido a que la temperatura de operación en el rehervidor no es una variable controlable, mas sin embargo, estará directamente relacionada con la temperatura que se tiene en el domo de la columna, así como también de la cantidad que se refluje del condensado en la unidad superior de la misma (Sheilan H., 2007). Para prevenir problemas de degradación térmica por parte del disolvente, la operación del rehervidor no deberá exceder los 177 °C, para ello se recomienda emplear vapor saturado a 350 kPa. En los productos del domo se logrará una separación de los componentes ácidos que se desorban por efecto de la temperatura, de esta manera la solución condensada es almacenada en el acumulador de reflujo, y la fase gaseosa conteniendo H<sub>2</sub>S y CO<sub>2</sub> se envía a

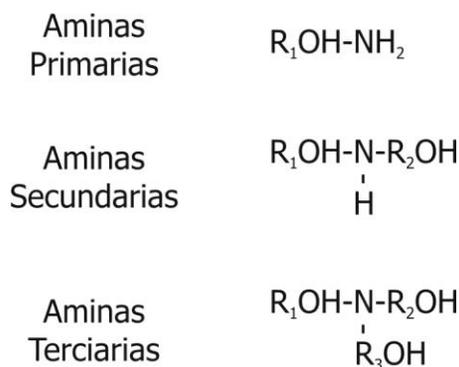


la unidad de recuperación de azufre. De este modo la amina regenerada que circula por el fondo de la columna desorbedora es filtrada y enviada al tanque de abastecimiento de amina regenerada, para estar disponible y ser alimentada de nuevo a la columna de absorción, para lo cual se cuenta con una unidad de enfriamiento que permite que la amina alimentada entre en la columna a las condiciones de temperatura requeridas en el proceso.

### **2.1.3 Uso de alcanolaminas para el tratamiento de gases amargos.**

El empleo de las alcanolaminas como solventes en el proceso del tratamiento de gases amargos conocido como Girbotol, se atribuye a las características y propiedades que estas poseen, además de que es posible regenerar dicha solución en comparación con los sistemas que emplean NaOH como absorbente, los cuales también resultan ser poco selectivos.

Las alcanolaminas son bases orgánicas débiles, las cuales están constituidas por un grupo amino, un grupo alcohol y un alcano como base sustituida. De este modo el grupo hidroxilo puede modificar la fuerza básica e incrementar la miscibilidad en agua, mientras que el grupo amino promueve la alcalinidad necesaria para poder reaccionar con los gases ácidos. De esta manera se puede clasificar el tipo de amina de acuerdo al número de sustituyentes que posea el nitrógeno central, denotándolas como aminas primarias, secundarias y terciarias de acuerdo al número de sustituyentes que esta posea (figura 2.4).



**Figura 2.4** Clasificación de alcanolaminas.

Cuando las alcanolaminas entran en contacto con la corriente gaseosa ácida se produce una reacción exotérmica en donde se forma un complejo ácido-base (una sal), con el H<sub>2</sub>S y CO<sub>2</sub>. En el caso del sulfuro de hidrógeno e independientemente del tipo de amina que se trate, el H<sub>2</sub>S reaccionará mediante una transferencia de protones, formando el complejo de hidrosulfuro de amonio como lo muestra la reacción (2.1).

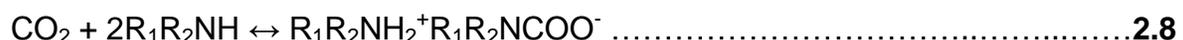
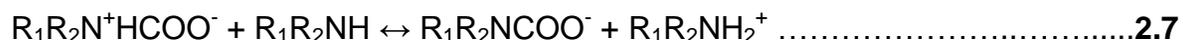


Mientras que para el caso del CO<sub>2</sub>, la reacción puede ocurrir por medio de dos diferentes mecanismos. En el primer mecanismo se lleva a cabo la hidrólisis del CO<sub>2</sub> para formar ácido carbónico (2.2), posteriormente ocurre la disociación del ácido para formar bicarbonato (2.3), y finalmente se lleva a cabo la reacción ácido-base mediante la protonación que ocurre en la disociación del bicarbonato para formar el complejo final (2.4). Este mecanismo se puede presentar en cualquier tipo de alcanolamina, sin embargo, no es el mecanismo que impera para la formación del complejo ya que el paso entre la disociación del ácido y la formación del bicarbonato es relativamente lento (Sheilan H., 2007).





El segundo mecanismo ocurre solo en aminas primarias y secundarias, durante la primera etapa de la reacción el  $\text{CO}_2$  reacciona con la amina para formar carbamato como intermediario (2.6), para posteriormente reaccionar con otra molécula de amina para formar la sal derivada de la amina (2.7).



Debido a la variación entre la rapidez de reacción que presenta la absorción de  $\text{H}_2\text{S}$  y  $\text{CO}_2$ , se infiere que para aminas que se encuentren totalmente sustituidas (terciarias), la absorción de  $\text{H}_2\text{S}$  será mayor, ya que la rapidez con la cual se lleva a cabo la reacción de absorción por medio de la hidrólisis es el mecanismo que se presentaría para la respectiva absorción de  $\text{CO}_2$ , la cual presenta una rapidez significativamente menor que la que ocurre con la absorción de  $\text{H}_2\text{S}$ .

En la tabla 2.1 se muestran las alcanolaminas que se suelen usar en el tratamiento de gases amargos (Sheilan H., 2007), las cuales se seleccionan de acuerdo a las condiciones de operación que se dispongan en la unidad de tratamiento y el estado en el cual se encuentre la corriente gaseosa en términos de la composición de la misma.



**Tabla 2.1** Alcanolaminas empleadas para el tratamiento de gases amargos.

Amina	Tipo de amina	Concentraciones típicas	Características principales.
Monoetanolamina (MEA)	Primaria	15 – 20 % 2.46 M	Reacciona fácilmente con los compuestos ácidos del gas, sin embargo, debido a su alta reactividad ocasiona grandes problemas de corrosión y puede formar compuestos que hacen irreversible su regeneración cuando hay una presencia considerable de CO <sub>2</sub> , COS y CS <sub>2</sub> .
Diglicolamina (DGA)	Primaria	50 – 60 % 4.76 M	Permite la remoción de mercaptanos en comparación con otras alcanolaminas, y posee una gran estabilidad térmica. Se puede obtener una buena recuperación del absorbente operando a altas temperaturas, sin embargo, como materia prima impacta los costos considerablemente.
Dietanolamina (DEA)	Secundaria	25 – 30 % 2.86 M	Su degradación en presencia de COS y CS <sub>2</sub> es menor, además de presentar pocos problemas de corrosión en comparación con la MEA.
Diisopropanolamina (DIPA)	Secundaria	40 – 50 % 3.76 M	Posee la propiedad de ser relativamente selectiva al reaccionar con el H <sub>2</sub> S presente de manera preferencial que con el CO <sub>2</sub> , sin embargo, en la unidad de recuperación de azufre se pueden presentar problemas debido a que no posee una alta selectividad.
Metildietanolamina (MDEA)	Terciaria	50 % 4.20 M	Al ser una amina terciaria, posee la cualidad de ser selectiva y absorber preferente el H <sub>2</sub> S presente en el gas, de este modo se puede integrar en conjunción con la unidad de recuperación de azufre en el proceso Claus, también presenta alta estabilidad a la degradación.

De las disoluciones de alcanolaminas que se disponen, la solución de MEA y DEA son las que comúnmente se emplean en el endulzamiento de gases de refinería, inclinándose mayoritariamente hacia el empleo de DEA como absorbente, debido a que presenta una mayor estabilidad, además de impactar en menor medida a los efectos de corrosión que se presentan en comparación con la MEA.



En la refinería de Salamanca Guanajuato la solución de alcanolamina empleada es dietanolamina (DEA) a una concentración promedio de 20 – 40%, y cuyas propiedades fisicoquímicas se muestran en la tabla 2.2 (Sheilan H., 2007; García S., 2008).

**Tabla 2.2** Propiedades fisicoquímicas de la dietanolamina.

<b>Propiedad</b>	<b>Valor característico</b>
Tipo de amina	Secundaria
Fórmula lineal	$(\text{HOCH}_2\text{CH}_2)_2\text{NH}$
Peso molecular, g/mol	105.14
Gravedad específica, 30/20 °C	1.0319
Punto de ebullición @ 760 mm Hg, °C	269
Punto de fusión, °C	27.8
Presión de vapor, mm Hg @ 20 °C	0.01
Solubilidad en agua	soluble
pH (sol. Acuosa al 10%) @ 25 °C	12.00
Calor de vaporización, Btu/lb @ 760 mm Hg	288
Calor de reacción, Btu/lb	H <sub>2</sub> S 500 – 600 CO <sub>2</sub> 580 – 650
Viscosidad, cp @ 30 °C	380
Calor específico @ 15.5 °C, Btu/lb/°F	0.600
Conductividad térmica Btu/[h·ft·°F] @ 20 °C	0.127
Presión crítica, kPa	3280
Temperatura crítica, °C	442

Debido a que el proceso de regeneración está limitado por las condiciones de operación y los subsecuentes ciclos de reacción a los que la dietanolamina está sometida, se presentará un momento en el cual la amina no puede ser reutilizada, debido a que su degradación en sales estables al calor es considerablemente alta, además de poder formar subproductos tales como formamidas, derivados de

etilendiamina, piperazinas, monoetanolamina y bicina (Macías O., 2007). De este modo y de acuerdo a las condiciones en que la amina se encuentre, se tendrá la necesidad de retirar del proceso la solución absorbente, convirtiendo a esta solución en un residuo peligroso de acuerdo a la NOM-052-SEMARNAT-2005, con lo cual se denotará a esta amina como amina gastada. Es posible evaluar el estado de la amina de acuerdo a las condiciones observadas en las que se encuentre (figura 2.5), con lo cual se podrá identificar el tipo de problema que se pudiese presentar dentro de la operación, así como también, si la disolución absorbente necesita ser renovada.



**Figura 2.5** Condiciones de la alcanolamina en función de las condiciones a las cuales opera el proceso (Sheilan H., 2007).

## 2.2 Procesos Biológicos.

Las necesidades principales de los microorganismos para poder llevar a cabo la síntesis de material celular están determinadas por la disposición de una fuente de carbono, una fuente de energía y nutrientes ya sean orgánicos o inorgánicos de los cuales se disponga. La asimilación y mecanismos por los cuales se obtengan estos requerimientos serán característicos de los organismos, de esta forma de



acuerdo a la fuente de obtención de carbono y energía para la síntesis de material celular se puede clasificar a los microorganismos como se muestra en la tabla 2.3. Cabe mencionar que los microorganismos que obtienen su fuente de carbono a partir de  $\text{CO}_2$  emplean la mayor parte de su energía para la síntesis de tejido celular orgánico, precisando un mecanismo reductivo que implica un suministro neto de energía, con lo cual se reportan tasas de crecimiento menores en comparación con los microorganismos que obtienen carbono a partir de compuestos orgánicos (Metcalf & Eddy, 2003).

**Tabla 2.3** Clasificación de microorganismos a partir de su fuente de carbono y energía.

<b>Fuente de carbono</b>	
<b>Heterótrofos</b>	Emplean carbono orgánico para la formación de tejido celular
<b>Autótrofos</b>	Obtienen carbono celular a partir de $\text{CO}_2$
<b>Fuente de energía</b>	
<b>Fotótrofos</b>	Utilizan luz como fuente de energía
<b>Quimiótrofos</b>	Obtienen energía a partir de reacciones de óxido-reducción

De manera conjunta se pueden hacer subdivisiones para poder clasificar a los microorganismos a partir de sus fuentes de energía y de carbono, derivándose en: microorganismos quimioheterótrofos a los que obtienen su energía a partir de la oxidación de compuestos orgánicos reducidos; quimioautótrofos a los que obtienen su energía a partir de la oxidación de compuestos inorgánicos reducidos tales como el amoníaco, el nitrito y el sulfuro; fotoautótrofos como algunas algas y bacterias fotosintéticas; fotoheterótrofos tales como algunas bacterias sulfurosas. Cabe mencionar que se puede hacer una referencia específica de acuerdo al tipo de compuesto (orgánico ó inorgánico) del cual se obtiene la energía dentro de los organismos quimiótrofos, denotando así a organismos litótrofos a los que obtienen su fuente de energía por medio de compuestos inorgánicos, y organótrofos a los que la obtienen a partir de compuestos orgánicos (Gerardi M., 2006).



Otro aspecto importante que es característico del tipo de microorganismo al cual se refiera, es el tipo de metabolismo que esté presente así como la disposición de nutrientes, los cuales fungirán como precursores ó constituyentes para la síntesis de material celular. Dentro de los procesos característicos de los metabolismos microbianos se puede efectuar una clasificación de acuerdo al requerimiento de oxígeno molecular para efectuar los procesos de asimilación tanto de nutrientes como de fuentes de carbono necesarios para llevar a cabo la síntesis de material celular, denotando así a procesos que involucran la generación de energía por medio del transporte de electrones mediante enzimas desde un donante hasta un aceptor externo como un proceso de respiración y de este modo el proceso metabólico que no incluya una aceptación externa se denotará como un proceso fermentativo. De esta forma de acuerdo al tipo de proceso metabólico que implique una necesidad de oxígeno molecular como aceptor, se dispondrá de una clasificación característica:

- **Procesos aerobios.** Se emplea el oxígeno molecular como aceptor de electrones y se pueden diferenciar a los organismos como aerobios obligados a aquellos que solo pueden sobrevivir si existe una aportación suficiente de oxígeno molecular.
- **Procesos anaerobios.** No se requiere de oxígeno molecular y los organismos generan su energía a través de la fermentación.
- **Procesos facultativos.** Se puede emplear el oxígeno molecular disponible mas sin embargo los organismos son capaces de obtener dicha fuente a través de compuestos inorgánicos cuando no exista oxígeno como aceptor de electrones. Si el transporte de electrones se efectúa a partir de compuestos oxidados como los nitratos y nitritos, el proceso se suele denominar como anóxico.

Por otra parte, también se debe incluir la necesidad de nutrientes esenciales que permiten la síntesis de material celular, dividiendo estos requerimientos en



nutrientes inorgánicos y orgánicos. Los principales nutrientes inorgánicos para los microorganismos son: nitrógeno, azufre, fósforo, potasio, magnesio, calcio, hierro, sodio y cloro, y aquellos de menor importancia son: zinc, manganeso, molibdeno, selenio, cobalto, cobre, níquel, vanadio y tungsteno. A los nutrientes orgánicos se les conoce como factores de crecimiento (Metcalf & Eddy, 2003), y son compuestos que los organismos necesitan como precursores ó constituyentes para la síntesis de materia celular orgánica, mismos que no se pueden obtener a partir de otras fuentes de carbono; los principales factores de crecimiento pueden dividirse en tres clases: aminoácidos, purinas y pirimidinas (sustancias bases presentes en los ácidos nucleicos), y vitaminas.

### **2.2.1 Microbiología general en aguas residuales.**

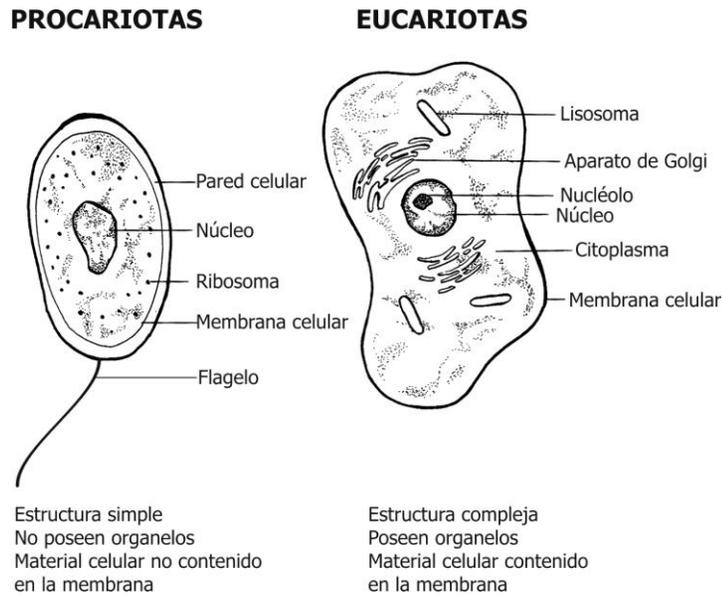
El papel de un tratamiento biológico es la estabilización y remoción tanto de materia orgánica como inorgánica presente ya sea en aguas residuales domésticas, industriales ó agrícolas, y que debido a su naturaleza y composición estos compuestos repercuten de manera adversa al medio ambiente, generalmente se puede determinar la remoción de dichos compuestos en términos de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO), la demanda química de oxígeno (DQO) ó en términos del carbono orgánico total (COT). Para llevar a cabo la remoción de dichos compuestos, se emplean microorganismos que son capaces de asimilar la materia orgánica coloidal y disuelta, misma que es empleada para sintetizar tejido celular y de este modo reducir el impacto que generaría descargar estos componentes en aguas naturales.

Los procesos biológicos empleados para el tratamiento de aguas residuales se pueden efectuar de manera continua ó de manera discontinua, lo cual dependerá de los objetivos que se planteen en función de los contaminantes de interés que se desean depurar, sin embargo, el proceso al cuál se recurre comúnmente es al proceso de lodos activados, el cuál fue desarrollado en Inglaterra en 1914 por Arden y Lockett, y es denominado como activado debido a que la remoción de la



materia orgánica se efectúa por medio del empleo de una determinada masa de microorganismos activa, la cual estabiliza los residuos por vía aerobia (Metcalf & Eddy, 2003). De este modo y de manera general, los procesos que son denominados como tratamientos biológicos parten de un inóculo que puede ser denominado como consorcio, debido a que estará conformado por una variedad de microorganismos que en acción conjunta podrán efectuar la remoción de la materia orgánica presente (Moreno I., 2006); cabe señalar que dicha remoción se ve favorecida por medio de las interacciones que se presentan como comunidad, en la que la acción de un tipo de microorganismo que se ve inclinado hacia la asimilación de compuestos o sustratos específicos, beneficia la acción de aquellos que se inclinan ya sea por los productos generados ó por otros componentes presentes en el medio en el cuál se encuentran (mutualismo).

En base a su estructura y funcionamiento celular, se puede efectuar una clasificación de los microorganismos presentes en la mayoría de los efluentes y sistemas de tratamiento de aguas residuales, así entonces de manera general se encontrarán microorganismos procariontes y eucariontes (Gerardi M., 2006; Bitton G., 1994). Las principales diferencias entre los organismos procariontes y eucariontes, es la ubicación del material genético (un núcleo definido), la posesión de organelos y que su estructura puede ser simple ó compleja, estas diferencias se pueden apreciar en la figura 2.6.



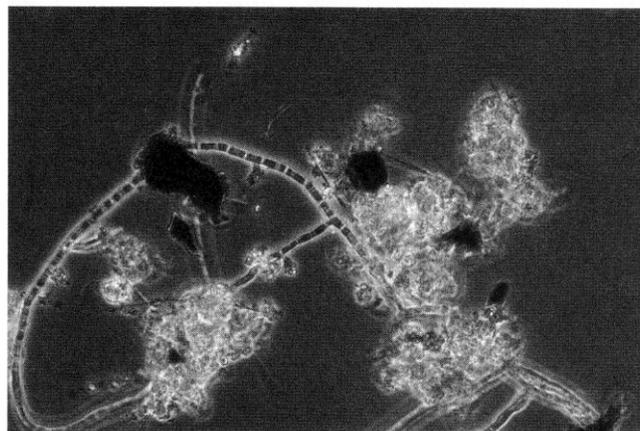
**Figura 2.6** Características celulares entre procariontes y eucariontes.

Refiriéndose a los microorganismos procariontes encontrados en sistemas de tratamiento de aguas residuales se encontraran englobados todos los tipos de bacterias, y dentro de los organismos eucariontes presentes y más importantes se encontrarán los hongos, las algas, protozoarios, rotíferos y nematodos (Gerardi M., 2006). De este modo se debe considerar que dentro de los tratamientos biológicos se contará con una comunidad cambiante, en la cual se podrán tener en mayor o menor medida alguno de los microorganismos ya mencionados, y esto dependerá de las facilidades y condiciones adecuadas para que estos sobrevivan y persistan dentro de la comunidad biológica presente. Algunas de las características que poseen los microorganismos encontrados en efluentes y sistemas de tratamiento de aguas residuales son las siguientes:

- **Hongos.** Usualmente son organismos saprofitos que pueden clasificarse de acuerdo a su forma de reproducción. Estos microorganismos producen largos filamentos llamados hifas, mismos que forman una masa llamada micela (figura 2.7). Dentro de las características más importantes de estos organismos es su capacidad de sobrevivir a condiciones muy variables de pH, dentro de un rango



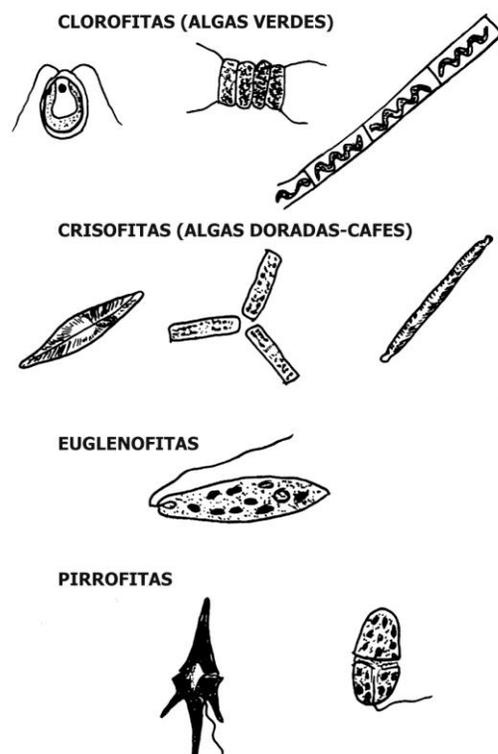
muy amplio que va desde pH = 2 hasta pH = 9, aunque el pH óptimo de la mayoría de las especies es de 5.6; otra de sus características más sobresalientes es su tolerancia a sobrevivir a ambientes que proveen bajas concentraciones de nutrientes. En los sistemas de tratamiento de aguas residuales la presencia de estos microorganismos no es muy deseada aunque promueve la estabilidad del mismo debido a la capacidad que poseen de degradar la materia orgánica proveniente de células muertas, por otro lado si su presencia es demasiado abundante influirá de manera adversa en la clarificación del sistema (Gerardi M., 2006). De esta manera si el pH y los nutrientes se encuentran en rangos por debajo de las condiciones de operación establecidas en el sistema, se apreciará una proliferación de hongos considerablemente alta dentro del mismo debido a que se mantendrán condiciones idóneas que permiten el desarrollo de este tipo de microorganismos, y que consecuentemente pueden llegar a repercutir en la estabilidad del sistema de tratamiento.



**Figura 2.7** Conformación observada de filamentos que caracterizan a algunas de las especies más comunes de hongos.

- **Algas.** Estos organismos pueden clasificarse de acuerdo al tipo de clorofila que producen y dentro de sus principales características que posee, es la capacidad de asociarse en simbiosis con hongos, protozoarios y plantas. La

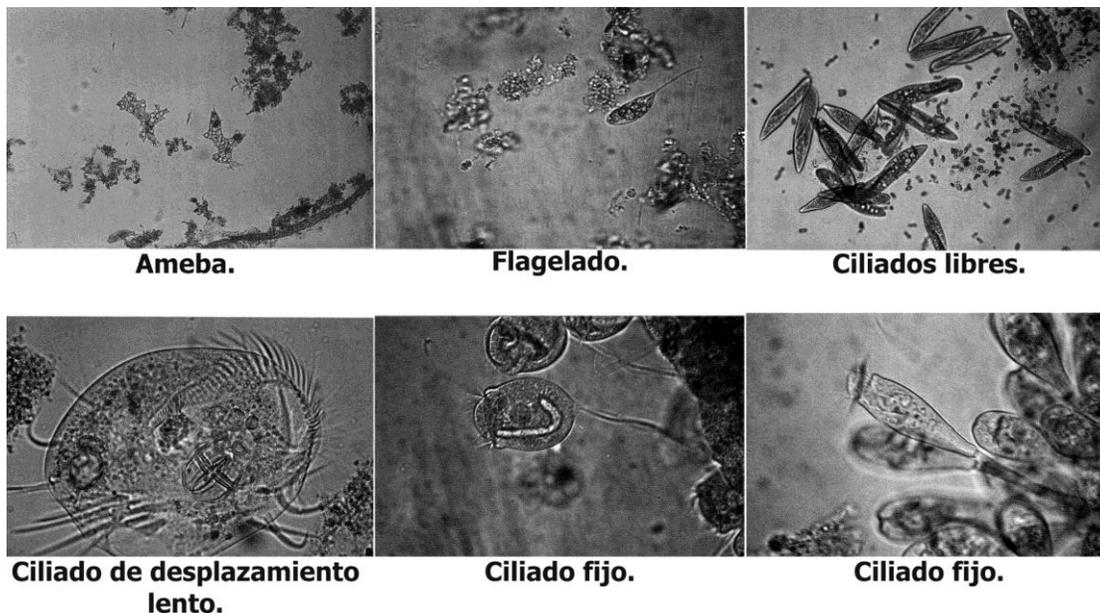
mayoría de las algas se consideran microorganismos unicelulares conocidos como fitoplancton (en el caso de las llamadas algas verde azuladas se conocen como cianobacterias), pero también pueden ser organismos macroscópicos (figura 2.8). Estos organismos se caracterizan por llevar a cabo fotosíntesis empleando la luz como su fuente de energía y agua como donador de electrones, además de crecer en un medio mineralizado empleando  $\text{CO}_2$  como fuente de carbono, aunque algunas especies pueden ser heterótrofas. Se pueden reproducir de manera sexual ó asexual, y dentro de los problemas ambientales en los que pueden contribuir de acuerdo a su proliferación es la eutricación de aguas naturales (Bitton G., 1994; Maier R., 2000).



**Figura 2.8** Algas comúnmente encontradas en aguas residuales.

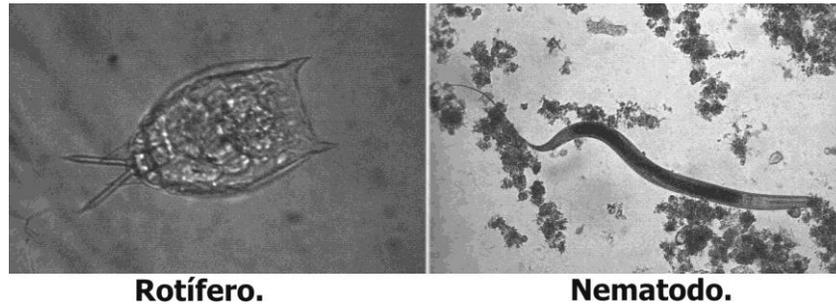
- **Protozoarios.** Son microorganismos unicelulares considerados como organismos libres, y pueden estar presentes en colonias o aislados de manera

individual. Se considera que la mayoría de estos microorganismos son aerobios estrictos, aunque organismos como las amebas y flagelados pueden sobrevivir en condiciones anaerobias. Se puede clasificar a estos organismos en cinco grupos característicos por la forma en la que desempeñan su locomoción dentro del sistema (Gerardi M., 2006), con lo cual se tendrán: amebas, flagelados, ciliados libres, ciliados fijos y ciliados de desplazamiento lento. La presencia de estos microorganismos en sistemas de tratamiento biológico es muy usual, encontrándose en sus diversas formas; dentro de las funciones o contribuciones de estos microorganismos al sistema, se pueden destacar: la facilitación en la formación de floculos, consumo del material celular de desecho provisto por otros microorganismos y reciclado de nutrientes, especialmente por parte de los ciliados.



**Figura 2.9** Protozoarios comúnmente encontrados en sistemas de aguas residuales.

- **Rotíferos y nematodos.** Son microorganismos multicelulares (metazoos) que en conjunción con los protozoarios promueven la formación de floculos del material en suspensión.



**Figura 2.10** Morfología observada de un rotífero y nematodo.

- **Bacterias.** Son considerados como los microorganismos de mayor interés dentro de los sistemas biológicos de tratamiento de aguas residuales (Gerardi M., 2006), existiendo una amplia variedad de especies, que de acuerdo a su morfología, metabolismo y requerimientos nutricionales pueden ser clasificados. Generalmente son asociados como los precursores idóneos para llevar a cabo la remoción de compuestos tanto orgánicos como inorgánicos dentro de los sistemas de tratamiento de aguas residuales, mas sin embargo, no son los únicos organismos responsables de la efectividad de un tratamiento biológico, también se debe poner en consideración la contribución que se tiene por parte de los demás microorganismos ya mencionados para poder obtener una efectividad considerablemente amplia en los sistemas biológicos.

Dentro de los sistemas de tratamiento biológico de aguas residuales, se puede apreciar la actividad microbiana por medio del aumento de la biomasa ó lodo, el cual inicialmente es inoculado al sistema en una cantidad adecuada en términos de la relación existente entre el alimento y la masa de microorganismos disponibles, este parámetro es comúnmente empleado para el diseño de sistemas de tratamiento biológico (Metcalf & Eddy, 2003) y está definido como se muestra en la ecuación (2.1).

$$F/M = \frac{S_0}{\theta X} \dots\dots\dots 2.1$$



Donde  $S_0$  es la concentración de sustrato disponible inicialmente dentro del sistema,  $\theta$  es el tiempo de retención hidráulico y  $X$  es la concentración de microorganismos inoculados.

Colectivamente existe una interrelación entre los microorganismos presentes en el sistema y las condiciones de operación establecidas, estas relaciones se establecen en función de la disponibilidad de fuentes de carbono y energía necesarias para llevar a cabo la síntesis de material celular. De esta manera se ven involucrados factores ambientales (abióticos) y factores biológicos (bióticos), los cuales sirven como parámetros de control que deben ser considerados dentro del establecimiento de las condiciones de operación de un sistema de tratamiento biológico (tabla 2.4).

**Tabla 2.4** Factores bióticos y abióticos considerados en los sistemas de tratamiento de aguas residuales.

<b>Factores abióticos</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Alcalinidad</li><li>➤ Presencia de iones amonio (<math>\text{NH}_4^+</math>)</li><li>➤ Cantidad de oxígeno disuelto (OD)</li><li>➤ Tiempo de retención hidráulico (<math>\theta</math>)</li><li>➤ Nutrientes</li><li>➤ pH</li><li>➤ Cantidad y tipo de sustrato</li><li>➤ Temperatura</li><li>➤ Residuos tóxicos</li><li>➤ Turbulencia</li></ul>
<b>Factores bióticos</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Presencia de bacterias nitrificantes</li><li>➤ Presencia de organismos filamentosos</li><li>➤ Presencia de bacterias formadoras de floculos</li><li>➤ Tiempo de residencia celular (<math>\theta_c</math>)</li><li>➤ Concentración de sólidos suspendidos volátiles (SSV)</li><li>➤ Presencia de bacterias desnitrificantes</li><li>➤ Abundancia relativamente amplia de microorganismos protozoarios</li></ul>

Cabe destacar que los factores bióticos están relacionados directamente con las interacciones que ocurren entre los diferentes microorganismos presentes en un



sistema biológico, con lo cual, se podrán tener relaciones que puedan afectar o beneficiar el sistema según sea el caso que se presente, destacando así, las interacciones de tipo competitiva, de simbiosis y depredación, que la comunidad microbiana presente establezca. De tal forma que la competitividad y la depredación son dos de los factores que pueden influir de manera adversa al sistema, ya que para el caso de presentarse competitividad, los microorganismos presentes tendrán cierta dominancia sobre otros; un caso muy común es la que se presenta entre bacterias y hongos u organismos filamentosos, ya que en el caso de presentarse dentro del sistema una tasa de concentración considerablemente baja en nutrientes, los microorganismos filamentosos se verán favorecidos y aprovecharán mejor las condiciones que se presentan, repercutiendo en la actividad bacteriana; para el caso de la depredación y de manera análoga, se apreciará una afectación a la cantidad de bacterias presentes dentro del sistema, ya que estas se convierten en presas tanto de protozoarios como de metazoos (Gerardi M., 2006).

### **2.2.2 Clasificación bacteriana.**

Como se menciona con anterioridad, las bacterias son consideradas como los microorganismos de mayor interés dentro de los sistemas de tratamiento biológico de aguas residuales, ya sean del tipo industrial o del tipo doméstico (Gerardi M., 2006; Metcalf & Eddy, 2003); esto se debe a la capacidad que poseen de asimilar tanto compuestos inorgánicos como orgánicos, mismos que son considerados como contaminantes al encontrarse en concentraciones elevadas. La versatilidad de las bacterias para sobrevivir a ambientes cambiantes ó extremos está asociada a su capacidad de reproducción acelerada, lo cual ocurre a través de una fisión binaria en donde una célula madre se divide en dos células hijas (Maier R., 2000), de tal forma que la adaptación u aclimatación a un ambiente extremo puede atribuirse a la capacidad que poseen los microorganismos a efectuar transformaciones fisiológicas en su sistema metabólico, así como también a la posibilidad de presentar cambios fenotípicos que no alteran su genética ó cambios



genotípicos como tales, los cuales favorecen de manera positiva a su capacidad de adaptación aún en ambientes tóxicos (Moreno, I. 2006).

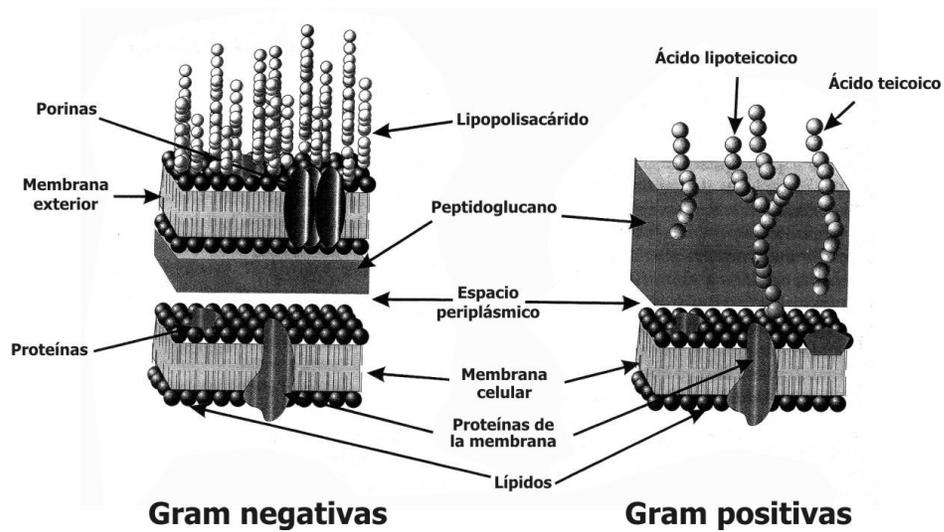
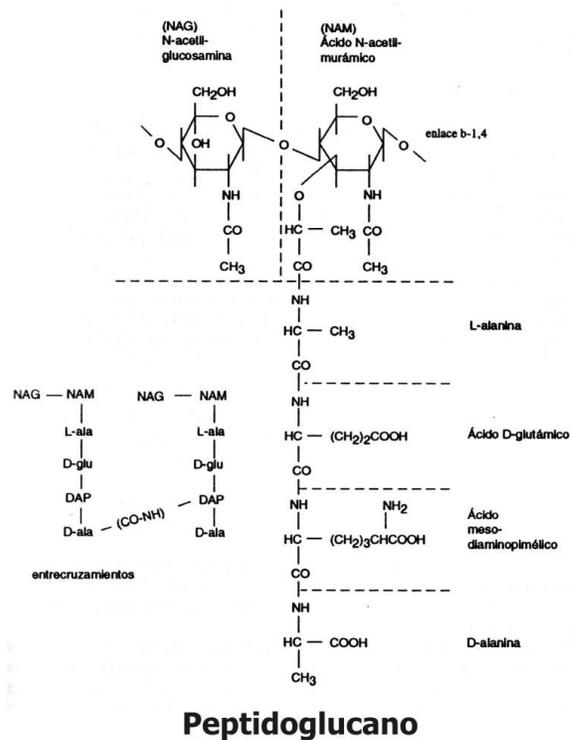
Las bacterias son organismos unicelulares que pueden clasificarse en base a su morfología, tipo de pared celular, requerimientos nutricionales y metabolismo, existiendo una amplia gama de especies, las cuales podrán disponer de diferentes compuestos como precursores para la síntesis de material celular y que dependiendo del género al cual se refiera estas podrán aprovechar en mayor medida los componentes de interés empleándolos como sustrato. La clasificación que se efectúa a las bacterias comprende una jerarquía de categorías, las cuales quedan comprendidas en: especies, géneros y familia, en orden creciente de categoría; cabe señalar, que también existe la posibilidad de que una especie pueda dividirse en dos o más cepas, mismas que concuerdan con la definición de la especie, pero que presentan diferencias menores. Así entonces, se puede decir que los miembros de una familia bacteriana tendrán similar estructura, utilizarán la misma forma de energía, y reaccionarán normalmente de forma similar a ciertos colorantes; las especies de tal familia a su vez, pueden agruparse en géneros sobre la base de diferencias en actividades químicas, requerimiento de nutrientes, condiciones de crecimiento y en cierto grado, en forma y tamaño. Convencionalmente cada especie bacteriana recibe un nombre en forma de binomio latino, el cual está compuesto por el nombre del género al que pertenece la especie, seguido de un epíteto específico que actúa como una etiqueta particular de la especie a la que se refiere, de esta forma y también por convención, el binomio latino se escribe en cursiva, de manera que el nombre del género se escribe comenzando con mayúscula y el epíteto en minúsculas (ejemplo: *Escherichia coli*); en el caso de referirse a las familias y órdenes, estos se escriben comenzando con mayúscula y empleando los sufijos –aceae en caso de hablar de familia (ejemplo: Enterobacteriaceae) y –ales en caso de hablar del orden (ejemplo: Actinomycetales), cabe mencionar que la denominación de las



---

bacterias está formalmente controlada por las normativas establecidas por el Comité Internacional de Bacteriología Sistemática (Singleton P., 2004).

La clasificación inicial y más común para diferenciar especies bacterianas está basada en la conformación de su pared celular, la cual hace referencia a la cantidad de peptidoglucano de la cual se encuentren conformadas. El peptidoglucano es un polímero que está constituido por numerosos enlaces entrecruzados de cadenas de N-acetil-murámico y N-acetil-glucosamina (figura 2.11), de esta forma en 1884 Christian Gram propone un teñido diferencial en donde se refleja la capacidad de retención por parte de la pared celular empleando dos colorantes diferentes, mismos que son capaces de contrastar la composición y estructura de la pared celular de la que están compuestas las bacterias, denotando así a las bacterias gram positivas a aquellas en las que su pared celular está constituida por una capa extensa de peptidoglucano, además de estar conformada por ácidos teicoicos y ácidos lipoteicoicos; y bacterias gram negativas a aquellas en las que la cantidad de peptidoglucano es menor, además de que su pared está constituida por dos membranas compuestas por fosfolípidos y difiriendo entre ellas por la integración de lipopolisacáridos y porinas (proteínas) en la membrana externa (Maier R., 2000; Scragg A., 2011). Cabe denotar que debido a que las bacterias gram negativas poseen una membrana externa, esta posee atributos que pueden servir como antígenos, mismos que permiten una tolerancia relativa a agentes tóxicos, este efecto se puede atribuir al contenido de lipopolisacáridos que conforman la membrana externa. Otro aspecto que se destaca, es la amplitud del espacio periplásmico, en el cual están contenidas las enzimas que permiten la asimilación de nutrientes, con lo cual, se denota una permeabilidad por parte de las de la membrana externa (en el caso de las bacterias gram negativas) misma que permite el paso de moléculas relativamente pequeñas e impidiendo la permeación de moléculas de mayor tamaño, sin embargo, el acceso es provisto por los conductos que las proteínas (porinas) proveen.

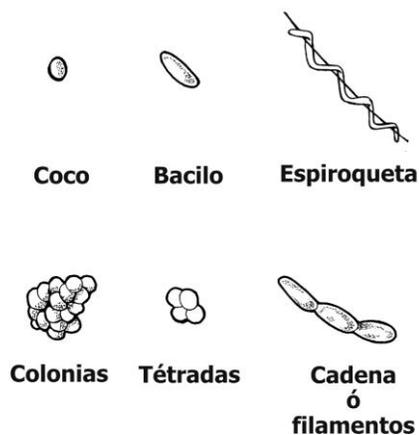


**Figura 2.11** Conformación diferencial de bacterias Gram negativas y positivas de acuerdo a su pared celular.

En función de las observaciones efectuadas durante la tinción se puede clasificar a las bacterias de acuerdo a su morfología, de tal forma que se podrá delimitar el



tamaño de las mismas, sin embargo, los tamaños más usuales oscilan entre 0.3 y 3  $\mu\text{m}$ . Dentro de las morfologías que presentan las bacterias se tienen tres tipos: bacilos (cilindros en forma de bastones), cocos (esferas) y espiroquetas (helicoidales), sin embargo, durante la formación de células hijas éstas pueden no separarse, con lo cual se pueden presentar arreglos en el crecimiento de células nuevas dando origen a colonias, tétradas y cadenas o filamentos como se observa en la figura 2.12 (Gerardi M., 2006).



**Figura 2.12** Morfologías bacterianas.

Partiendo de las clasificaciones generales citadas anteriormente, a las particulares que conllevan a la detección fidedigna de una especie bacteriana en particular, es necesaria la práctica de más de un ensayo específico, con lo cual, la conjunción de dichos ensayos proporcionan información referente a las necesidades tanto nutricionales como ambientales, las cuales son características particulares que definen a una especie. Para efectuar una identificación bacteriana a nivel género y especie, se pueden recurrir a métodos tradicionales y a métodos a nivel de biología molecular (Moreno, I. 2006; Singleton P., 2004).

Para la implementación de los métodos tradicionales se disponen de una serie de técnicas que se llevan a cabo de manera consecutiva y que al ser analizadas en conjunto brindan la información necesaria que permite delimitar el género y



especie de las bacterias a identificar, la metodología tradicional parte de la obtención de un cultivo puro, el cual se puede obtener por medio de un aislamiento, el cual se puede obtener por medio de las siguientes técnicas (Ramírez, R., et. al., 2006):

- ❖ Separación física de los microorganismos por medio de diluciones.
- ❖ Por agotamiento de un pequeño inóculo en un medio de cultivo sólido.
- ❖ Mediante la utilización de medios de cultivo selectivos que inhiben el crecimiento de organismos no deseados.
- ❖ Aprovechando características particulares de los microorganismos tales como: la formación de esporas, el metabolismo anaerobio y/o facultativo, la capacidad del organismo a la utilización de sustratos poco comunes, entre otras.

Una vez obtenido el cultivo puro, se llevan a cabo diferentes pruebas, partiendo de métodos generales tales como: tinciones, morfología, motilidad, crecimiento aerobio/anaerobio y producción de catalasa, hasta métodos que describen el comportamiento metabólico bacteriano por medio de ensayos bioquímicos simples consistentes en la detección de algunas enzimas y respuesta a distintos sustratos (Singleton P., 2004; MacFaddin J., 2004). Aunque cabe mencionar que este tipo de métodos pueden arrojar resultados poco significativos si ocurren cambios tales como la posibilidad de desarrollar mutaciones, así como también presentar cambios desarrollados por plásmidos, siendo estos últimos capaces de codificar enzimas y de este modo presentar respuestas variables, estas posibles variaciones pueden comprometer las pruebas ya que estos cambios no pueden ser detectables de forma sencilla (Singleton P., 2004).

Por otro lado, en los métodos basados en biología molecular se puede obtener directamente la identificación bacteriana a partir de una comunidad mixta, el principio de las metodologías aplicadas está basado en la información obtenida a partir de las secuencias de ácido desoxirribonucleico (ADN) que son extraídas y



amplificadas a partir de una muestra problema, de este modo se efectúa el análisis de las secuencias que se extraen y se pueden obtener resultados concretos y fidedignos a nivel de especie (Singleton P., 2004).

En la tabla 2.5 se muestran algunos de los más importantes grupos bacterianos de acuerdo a su funcionalidad y a las características que presentan debido a su capacidad asimilativa a sustratos de interés.

**Tabla 2.5** Clasificación bacteriana establecida en los sistemas de tratamiento de aguas residuales basado en las características y funciones que desempeñan (Gerardi M., 2006).

<b>Tipo de bacterias</b>	<b>Descripción</b>	<b>Géneros característicos</b>
<b>Acetogénicas</b>	Son consideradas como bacterias fermentativas productoras de acetato ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), este tipo de bacterias convierten ácidos orgánicos, alcoholes y cetonas en acetato, dióxido de carbono e hidrógeno.	<i>Acetobacter</i> <i>Syntrobacter</i> <i>Syntrophomonas</i>
<b>Coliformes</b>	El grupo que conforman las bacterias coliformes son algunos bacilos gram negativos, y la presencia de este tipo de bacterias es un indicativo de contaminación fecal. Este grupo se asocia directamente con la familia de bacterias Enterobacteriaceae.	<i>Citrobacter</i> <i>Enterobacter</i> <i>Escherichia</i> <i>Hafnia</i> <i>Klebisella</i> <i>Serratia</i> <i>Yersinai</i>
<b>Cianobacterias</b>	Son bacterias fotosintéticas y con frecuencia son consideradas como algas verde azules, en ocasiones se les puede encontrar como células individuales ( <i>Chlorella</i> ), cadenas celulares o filamentos ( <i>Oscillatoria</i> ) de longitudes aproximadas de entre 100 y 500 $\mu\text{m}$ . Este tipo de bacterias pueden encontrarse en algunos sistemas biológicos de lodos activados y contribuyen a la inestabilidad del sistema.	<i>Anabaena</i> <i>Chlorella</i> <i>Euglena</i> <i>Oscillatoria</i>
<b>Desnitrificantes</b>	Son bacterias facultativas capaces de emplear nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) en caso de encontrarse en condiciones de baja concentración de oxígeno disuelto, para poder llevar a cabo la degradación de la materia orgánica presente; de esta manera el nitrógeno puede retornar a la atmósfera en forma de nitrógeno molecular ( $\text{N}_2$ ) y óxido de nitrógeno ( $\text{N}_2\text{O}$ ).	<i>Alcaligenes</i> <i>Bacillus</i> <i>Pseudomonas</i>
<b>Fermentativas</b>	Son las bacterias de mayor interés en los procesos de digestión anaerobia, en los cuales transforman sustratos complejos en formas más simples; de esta manera contribuyen a la	<i>Bacteroides</i> <i>Bifidobacteria</i> <i>Clostridium</i> <i>Escherichia</i>



	producción de ácidos orgánicos que son asimilados por bacterias que son capaces de remover fósforo ya que también con conocidas como bacterias acidogénicas, ya que este tipo de bacterias convierten aminoácidos, ácidos grasos y azúcares en ácidos orgánicos tales como: acetato ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), butirato ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$ ), formato ( $\text{HCOOH}$ ), lactato ( $\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$ ), y propionato ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$ ).	<i>Lactobacillus</i> <i>Proteus</i>
<b>Filamentosas</b>	Por lo general a los microorganismos filamentosos se les considera como los precursores más comunes en los problemas de estabilización de lodos activados. Se considera un aproximado de 30 microorganismos filamentosos, de los cuales 10 son bacterias, sin embargo, las bacterias contribuyen a la degradación de materia orgánica y a la formación de floculos.	<i>Haliscomenobacter hydrossis</i> <i>Microthrix parvicella</i> Nocardioformes <i>Sphaerotilus natans</i> <i>Thiothrix</i> Tipo 0041 Tipo 0092 Tipo 0675 Tipo 1701 Tipo021N
<b>Formadoras de floculos</b>	Este tipo de bacterias de acuerdo al tiempo en el que estén presentes dentro de un sistema biológico son capaces de producir el suficiente material celular como para formar un aglutinamiento y dar pasó a la formación de floculos.	<i>Achromobacter</i> <i>Aerobacter</i> <i>Citromonas</i> <i>Flavobacterium</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Zoogloea</i>
<b>Cocos y bacilos aerobios gram negativos</b>	Dentro de este grupo bacteriano se consideran bacterias que son capaces de llevar a cabo la remoción de fósforo, remoción de materia orgánica soluble, la formación de floculos y nitrificación, con lo cual se puede considerar que dentro de los sistemas de lodos activados se encontrará que un 20% de este tipo de bacterias conformaran el total de la comunidad bacteriana presente.	<i>Acetobacter</i> <i>Acinetobacter</i> <i>Alcaligenes</i> <i>Nitrobacter</i> <i>Nitrosomonas</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Zoogloea</i>
<b>Bacilos facultativos gram negativos</b>	Análogo al grupo mencionado anteriormente, se consideran diferentes tipos de bacterias, tales como: degradadoras de fósforo, productoras de acetato, productoras de ácidos, desnitrificantes, formadoras de floculos e hidrolíticas, las cuales conforman aproximadamente el 80% restante de la comunidad bacteriana presente en un sistema de lodos activados.	<i>Aeromonas</i> <i>Escherichia</i> <i>Flavobacterium</i> <i>Klebsiella</i> <i>Proteus</i> <i>Salmonella</i>
<b>Hidrolíticas</b>	Este tipo de bacterias producen exoenzimas que solubilizan sustratos complejos mediante su transformación en formas más simples que pueden, mismas que también pueden ser degradadas por las demás bacterias que estén presentes.	<i>Bacteroides</i> <i>Bifidobacteria</i> <i>Clostridium</i>
<b>Formadoras de metano</b>	Estas bacterias tal y como su clasificación lo menciona son productoras de metano, mismo que es generado a través de dos rutas posibles, una por medio de la descomposición del acetato	<i>Methanobacterium</i> <i>Methanococcus</i> <i>Methanomonas</i> <i>Methanosarcinia</i>



	y la segunda por medio de la asimilación de dióxido de carbono e hidrógeno.	
<b>Nitrificantes</b>	Son bacterias aerobias estrictas, que oxidan amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) y el nitrito a nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ).	<i>Nitrosomonas</i> <i>Nitrosospira</i> <i>Nitrobacter</i> <i>Nitrospira</i>
<b>Actinomicetos o Nocardioformes</b>	Es un grupo de bacterias filamentosas gram positivas especializadas en la formación de esporas, y cuyo tamaño es relativamente pequeño pese a ser organismos que poseen filamentos (<50 $\mu\text{m}$ ). Generalmente a este grupo de bacterias se les asocia la formación de espuma en los sistemas biológicos de tratamiento de aguas residuales.	<i>Actinomadura</i> <i>Arthrobacter</i> <i>Corynebacterium</i> <i>Micromonospora</i> <i>Nocardia</i> <i>N. amarae</i> <i>N. asteroides</i> <i>N. caviae</i> <i>N. pinensis</i> <i>N. rhodochrus</i>
<b>Patógenas</b>	Se dividen en dos tipos principales de bacterias, las patógenas verdaderas y las oportunistas. De tal manera que existen diversos géneros que pueden ser causantes de infección, sin embargo, se consideran dos tipos de bacterias que representan riesgos muy significantes en los sistemas de tratamiento de aguas residuales, las cuales son <i>Campylobacter jejuni</i> y <i>Leptospira interrogans</i> .	<i>Campylobacter jejuni</i> <i>Leptospira interrogans</i>
<b>Acumuladoras de fósforo</b>	Este tipo de bacterias regulan la cantidad de fósforo dentro de los sistemas de tratamiento biológico, siendo los ortofosfatos ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ ) y los polifosfatos ( $\text{P}_2\text{O}_7^{3-}$ ) sus principales sustratos.	<i>Acinobacter</i> <i>Aerobacter</i> <i>Beggiatoa</i> <i>Enterobacter</i> <i>Klebsiella</i> <i>Proteobacter</i>
<b>Saprófitas</b>	Son bacterias organótrofas capaces de asimilar fuentes de carbono a partir de células muertas, y que también son capaces de flocular.	<i>Achromobacter</i> <i>Alcaligenes</i> <i>Bacillus</i> <i>Flavobacterium</i> <i>Micrococcus</i> <i>Pseudomonas</i>
<b>Conformadoras de vainas o filamentos</b>	Este tipo de bacterias se conforman en cadenas y son gram negativas, de este modo la cadena se puede asemejar a los organismos filamentosos, mas sin embargo, también son capaces de desagruparse y encontrarse de manera individual.	<i>Haliscomenobacter hydrossis</i> <i>Sphaerotilus natans</i>
<b>Espiroquetas</b>	Pueden encontrarse espiroquetas aerobias, anaerobias y facultativas, y la forma en la cual son capaces de reproducirse es cuando se tienen condiciones de una baja tensión de oxígeno.	<i>Spirochaeta</i> <i>Leptospira</i>
<b>Oxidantes de sulfuro</b>	Este tipo de bacterias oxidan azufre inorgánico mediante la adición de oxígeno, y es por medio de esta oxidación por la cual obtienen energía. Se consideran bacterias sin filamentos y con	<i>Thiobacillus</i> <i>Thiospirillopsis</i> <i>Thiovulum</i> <i>Beggiatoa</i>



	filamentos, las cuales son capaces de efectuar este proceso de oxidación.	<i>Thiothrix</i>
<b>Reductoras de sulfuro</b>	Estas bacterias son anaerobias y emplean el sulfato para poder degradar el sustrato.	<i>Desulfovibrio</i> <i>Desulfotomaculum</i>

Tal y como se observa en la tabla 2.5, existe una diversidad muy amplia de géneros de bacterias encontrados en sistemas de tratamiento de aguas residuales, de tal manera que se ilustra la existencia de bacterias con funciones específicas tales como las oxido-reductoras de sulfuro ó nitrificantes, y bacterias que pueden tener varios roles, destacando el género de las *Pseudomonas*. Por otro lado, refiriéndose a efectos patogénicos propiciados por bacterias en términos generales se pueden presentar ciertas afectaciones al organismo por parte de las personas que llegan a manipular de manera continua y directa a las bacterias, mas sin embargo, debe señalarse que deben existir condiciones específicas mismas que propicien el desarrollo de enfermedades por parte de las bacterias, de las cuales dependerá tanto el grado de virulencia (capacidad de causar enfermedad) y la resistencia del hospedador, de este modo las rutas de infección delimitaran la posibilidad de presentar afectaciones a la salud (Singleton P., 2004).

### 2.2.3 Cinética Enzimática.

Las enzimas son proteínas complejas sintetizadas por todos los organismos vivos, y en ocasiones pueden estar conformadas por grupos no proteicos también conocidos como cofactores, los cuales pueden fungir como promotores de la reacción y pueden incluir a iones metálicos (como  $Mg^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $K^+$  y  $Zn^{2+}$ ) ó compuestos orgánicos derivados de la vitamina B (también conocidos como coenzimas), de esta manera la principal función de las enzimas es la asimilación de los sustratos necesarios para el desarrollo de material celular (Gerardi M., 2006). Se considera a las enzimas como catalizadores biológicos de las reacciones bioquímicas que llevan a cabo los organismos, de manera que incrementan la rapidez de reacción sin sufrir cambios químicos permanentes y sin repercutir en los equilibrios que se establecen, con lo cual, al no presentar ningún



cambio estructural, las enzimas pueden ser reutilizadas. Cabe mencionar que existe cierto grado de especificidad de las enzimas, el cual está en relación directa con el sustrato utilizado y el tipo de reacción que estas catalizan, aunque por lo general se presenta una baja especificidad en enzimas degradativas en comparación con aquellas enzimas que efectúan biosíntesis (Scragg A., 2011).

Las enzimas pueden ser clasificadas en función de las reacciones que catalizan, de esta forma se dividen en seis tipos principales (Scragg A., 2011):

- ❖ Reacciones de óxido-reducción catalizadas por óxido-reductasas.
- ❖ Reacciones de transferencia de grupo catalizadas por transferasas.
- ❖ Reacciones hidrolíticas catalizadas por hidrolasas.
- ❖ Reacciones de eliminación con formación de un doble enlace, catalizadas por liasas.
- ❖ Reacciones de isomeración catalizadas por isomerasas.
- ❖ Reacciones donde se unen dos moléculas a expensas de una fuente de energía, generalmente ATP, catalizadas por ligasas (o sintetetasas).

Tal y como se observa, comúnmente a las reacciones que son catalizadas por enzimas se les adiciona el sufijo –asa al nombre ya sea del sustrato o de la reacción que catalizan, mas sin embargo, existe una denotación sistemática para cada enzima, la cual es regulada por la European Commission.

La forma en la que actúan las enzimas es por medio de la proporción de sitios activos, de esta manera la enzima forma un complejo enzima-sustrato, el cual puede tener dos funciones metabólicas que consisten ya sea en la degradación del sustrato formando compuestos más simples (catabolismo) ó en la asimilación del sustrato para dar paso a compuestos más complejos (anabolismo). Este efecto puede vincularse en los sistemas biológicos de tratamiento de aguas residuales mediante la producción de lodos, en donde un incremento en la cantidad de lodos

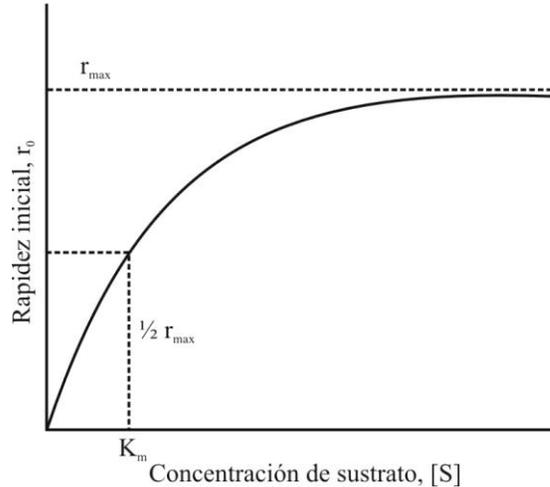


---

es atribuido a efectos anabólicos, y de manera recíproca y en sentido contrario, el decremento de lodos estará asociado a reacciones catabólicas.

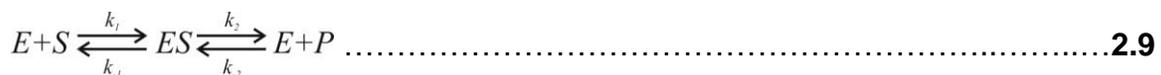
Para poder establecer las condiciones a las cuales la actividad enzimática presenta mejoras en cuestión de la asimilación del sustrato, es necesario recurrir al análisis del comportamiento cinético, en el cual se establecen condiciones específicas y controladas que brindan la información necesaria como para poder determinar las mejores condiciones a las cuales la enzima presenta resultados deseados y satisfactorios.

Así entonces, la cinética enzimática consistirá en el estudio de la rapidez de reacción a la cual una determinada cantidad de sustrato  $[S]$  disminuye en función del tiempo  $t$  ( $-dS/dt$ ), aunque también puede ser representada en términos de la aparición de productos  $[P]$  ( $dP/dt$ ). En la figura 2.13 se observa la variación de la rapidez inicial de la reacción  $r_0$  en función de la concentración del sustrato, nótese que al encontrarse el sustrato en concentraciones bajas la rapidez de la reacción aumenta de manera lineal, y en contraste al tener una cantidad de sustrato considerablemente alta, la rapidez presenta incrementos cada vez menores con lo cual se puede denotar a esta zona como la rapidez máxima  $r_{max}$ .



**Figura 2.13** Variación de la rapidez inicial de reacción en función de la concentración del sustrato.

Como se mencionó anteriormente, la enzima que cataliza la reacción forma un complejo enzima-sustrato [ES], de este modo tal y como se aprecia en la figura 2.13 existe un determinado instante en el cual se tiene una saturación, la cual está relacionada con la formación de dicho complejo, esto sucede debido a que al iniciar la reacción se tiene a disponibilidad una concentración dada de enzima [E] misma que reacciona con el sustrato disponible [S] a una determinada rapidez de reacción  $r$ , posteriormente el complejo da paso a la formación de producto [P] dejando a la enzima libre [E], así entonces al momento de llegar a la saturación, se tendrá una baja disponibilidad en la concentración de enzima [E] debido a que se encontrará mayoritariamente en forma del complejo enzima-sustrato [ES] como se observa en la reacción (2.9), con lo cual, el paso determinante será el de la formación de producto [P] mismo que se llevará a cabo con una rapidez mucho menor que la rapidez con la cual se forma el complejo enzima-sustrato [ES].



En 1913 Leonor Michaelis y Maud Menten proponen una teoría general para las cinéticas enzimáticas, misma que más tarde fue extendida por Briggs y Haldane



(Scragg A., 2011), en esta teoría se analizan los primeros instantes de la reacción, en donde la concentración del producto [P] es cero, de esta forma la reversibilidad de la reacción posterior a la formación del complejo [ES] se hace despreciable, con lo cual se considera también que la liberación del complejo se lleva a cabo con mayor rapidez de tal forma que [E] y [S] se consideran en equilibrio, así entonces se tiene:



Considerando entonces el estado de equilibrio en donde  $k_2 \ll k_{-1}$  se tiene la siguiente expresión:

$$k_1 E S = k_{-1} ES \dots\dots\dots 2.2$$

Por otro lado y de manera semejante, dentro de los estudios realizados por Briggs y Haldane en 1925, se toma a consideración la existencia de un estado estacionario, donde las concentraciones de [E] y [ES] permanecen constantes, con lo cual, el equilibrio que se considera es el establecido por [ES] debido a que la rapidez de formación del complejo enzima-sustrato es igual a su descomposición conllevando a que  $k_2$  no será mucho menor que  $k_{-1}$ , así entonces se establecen los equilibrios citados en las ecuaciones 2.3, 2.4 y 2.5.

$$ES = k_1 E S \text{ rapidez de formación} \dots\dots\dots 2.3$$

$$ES = k_{-1} ES + k_2 ES = k_{-1} + k_2 ES \text{ rapidez de descomposición} \dots\dots\dots 2.4$$

$$k_1 E S = k_{-1} + k_2 ES \text{ en el equilibrio} \dots\dots\dots 2.5$$

Cabe mencionar que la concentración total de la enzima  $[E_T]$  se definirá como la suma de la concentración de la enzima libre [E] y la enzima que se encuentra formando el complejo [ES] como se muestra en la ecuación 2.6.



$$E_T = E + ES \dots\dots\dots 2.6$$

Así entonces despejando la concentración de enzima libre de las ecuaciones (2.2) y (2.5) se puede llegar a las expresiones (2.7) y (2.8).

$$E = ES \frac{k_{-1}}{k_1 S} \dots\dots\dots 2.7$$

$$E = \frac{ES}{k_1 S} (k_{-1} + k_2) \dots\dots\dots 2.8$$

Nótese que las ecuaciones (2.7) y (2.8), que describen los comportamientos cinéticos bajo las consideraciones hechas por Michaelis-Menten y Briggs-Haldane respectivamente, difieren simplemente en la consideración que se toma por parte de la etapa consecutiva de la reacción de descomposición que conlleva a la formación de productos. Ahora bien, debido a que no se considera la posibilidad de reversibilidad en la etapa de descomposición ó formación de productos, la rapidez de reacción global estará definida por la ecuación (2.9).

$$r_0 = \frac{d P}{dt} = k_2 ES \dots\dots\dots 2.9$$

Sustituyendo (2.7) y (2.8) en (2.6) y dejando la expresión en términos de [ES] se pueden obtener los siguientes dos casos:

Caso 1 (Michaelis-Menten):

$$E_T = ES \frac{k_{-1}}{k_1 S} + ES \dots\dots\dots 2.10$$

$$E_T = ES \left[ 1 + \frac{k_{-1}}{k_1 S} \right] \dots\dots\dots 2.11$$



$$ES = \frac{E_T}{1 + \frac{k_{-1}}{k_1 S}} \dots\dots\dots 2.12$$

Caso 2 (Briggs-Haldane):

$$E_T = \frac{ES}{k_1 S} (k_{-1} + k_2) + ES \dots\dots\dots 2.13$$

$$E_T = ES \left[ 1 + \frac{k_{-1} + k_2}{k_1 S} \right] \dots\dots\dots 2.14$$

$$ES = \frac{E_T}{1 + \frac{k_{-1} + k_2}{k_1 S}} \dots\dots\dots 2.15$$

Sustituyendo en la ecuación (2.9) las ecuaciones (2.12) y (2.15) que describen los dos casos anteriormente citados, se pueden obtener las dos ecuaciones correspondientes que relacionen la rapidez de reacción con la concentración total de la enzima  $[E_T]$  y la concentración de sustrato  $[S]$ .

$$r_0 = \frac{k_2 E_T S}{S + \frac{k_{-1}}{k_1}} = \frac{k_2 E_T S}{S + K_m} \dots\dots\dots 2.16$$

$$r_0 = \frac{k_2 E_T S}{S + \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}} = \frac{k_2 E_T S}{S + K_m} \dots\dots\dots 2.17$$

Tal y como se aprecia en las ecuaciones (2.16) y (2.17), la única diferencia que se tiene es en las relaciones entre constantes, una derivada de la suposiciones establecidas por Michaelis y Menten ( $k_{-1}/k_1$ ), y la otra derivada de las suposiciones hechas por Briggs y Haldane ( $(k_{-1}+k_2)/k_1$ ), sin embargo, ambas expresiones se



pueden representar como  $K_m$ , que se define como la constante de Michaelis y por consiguiente el término que describe la rapidez de reacción enzimática se puede expresar como viene dado en la ecuación (2.18). De esta manera la diferencia principal entre ambas expresiones de  $K_m$  estará directamente relacionada con los valores relativos de  $k_{-1}$  y  $k_2$ , con lo cual, si la mayor parte del complejo enzima-sustrato [ES] se disocia para formar [E] y [S] se tendrá que  $k_2 \ll k_{-1}$  y por consiguiente  $K_m$  podría representar la afinidad de una enzima a un determinado sustrato, mas sin embargo si  $k_2 \gg k_{-1}$  no necesariamente implicará una baja afinidad.

$$r_0 = \frac{k_2 E_T S}{S + K_m} \dots\dots\dots 2.18$$

Si se considera que se ha llegado a una saturación en donde el paso limitante de la reacción es la disociación de la enzima, se puede decir que se llegó a la rapidez máxima de reacción en donde  $[E_T] = [ES]$ , de esta manera la ecuación (2.18) se puede expresar como se cita en la ecuación (2.19).

$$r_0 = \frac{r_{max} S}{K_m + S} \dots\dots\dots 2.19$$

A partir de la ecuación (2.19) se puede interpretar que cuando  $[S] > K_m$ , la rapidez  $r_0$  se aproximará a  $r_{max}$ , y que cuando  $[S] = K_m$  la expresión que defina a la rapidez de la reacción será:  $r_0 = r_{max}/2$ , esto puede apreciarse en la figura 2.13.

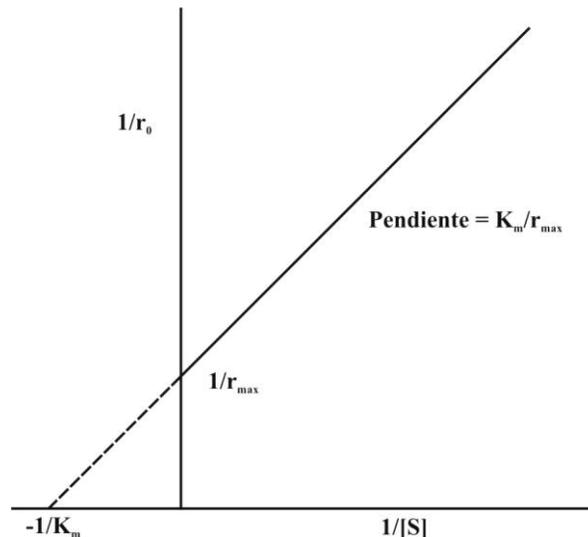
Cabe señalar que las enzimas encontradas en células microbianas son capaces de asimilar más de un tipo de sustrato de acuerdo a las necesidades metabólicas que requieren, con lo cual, el comportamiento cinético se vuelve más complejo que el descrito por enzimas del tipo Michaelis-Menten, sin embargo las diversas interacciones asimilativas presentan un comportamiento análogo al descrito por la cinética de un solo sustrato (Scragg A., 2011).



Debido al comportamiento hiperbólico que presenta la cinética de un solo sustrato, para poder determinar los valores de  $r_{\max}$  y  $K_m$  se suele recurrir a la linealización de la ecuación (2.19), con la cual, se pueden disponer de diversas expresiones algebraicas como la establecida por Lineweaver-Burk, en donde la rapidez de reacción se expresa de la siguiente manera:

$$\frac{1}{r_0} = \frac{K_m}{r_{\max}} \frac{1}{S} + \frac{1}{r_{\max}} \dots\dots\dots 2.20$$

De esta forma se sugiere la construcción de un gráfico en el cual se obtenga la variación del inverso de la rapidez de reacción en función del inverso de la concentración de sustrato, tal y como se observa en la figura 2.14.



**Figura 2.14** Gráfico de linealización de Lineweaver-Burk.

Dentro de los aspectos que se deben considerar en el estudio de las cinéticas enzimáticas, es la posibilidad de que la rapidez de reacción se vea afectada por la presencia de ciertos compuestos distintos del sustrato a los cuales se les denomina efectores ó moduladores, mismos que pueden intervenir en la reacción enzimática ya sea de manera positiva (activadores) ó negativa (inhibidores) modificando de este modo la rapidez de reacción. Debido a que es muy común



que exista una amplia gama de compuestos capaces de intervenir en la asimilación de sustratos de interés en los sistemas de tratamientos biológicos de aguas residuales, las implicaciones negativas que se pudiesen presentar en la rapidez de reacción enzimática resultan de un mayor interés, ya que estas podrían repercutir en la estabilización del sistema o incluso podrían resultar ser factores determinantes en cuanto a las capacidades de remoción en el sistema, así entonces, se consideran principalmente tres tipos de inhibición asociadas a efectores, mismas que se describen a continuación:

➤ Inhibición competitiva.

En este tipo de inhibición una sustancia de estructura química semejante a la del sustrato es capaz de ocupar el sitio activo de la enzima, con lo cual se inhibe la unión enzima sustrato, la reacción que describe este tipo de inhibición se muestra a continuación:



De esta forma el sitio activo que proporciona la enzima podrá estar a disposición del agente inhibidor, sin embargo, el efecto que esté presente en (2.11) dependerá de la concentración del sustrato [S] disponible y el inhibidor [I].

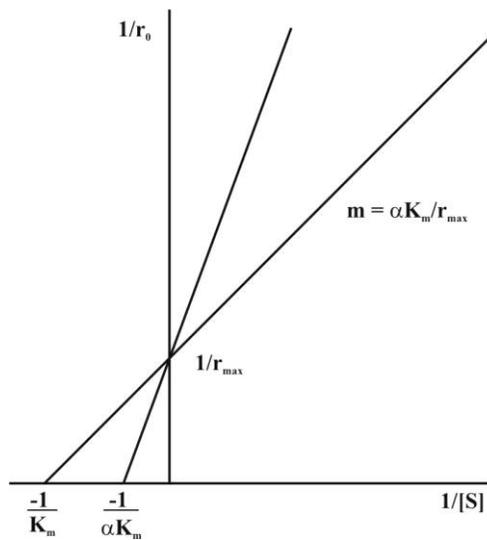
Si se incluye el efecto de la inhibición de la reacción (2.11) en la ecuación (2.18), y se efectúa el análisis del equilibrio establecido en donde en esta ocasión se incluiría [EI] en la ecuación (2.6), la ecuación de rapidez enzimática descrita por Michaelis-Menten que describe el efecto de una inhibición competitiva estaría dado por la ecuación (2.21).

$$r_0 = \frac{r_{\max} S}{K_m \left( 1 + \frac{I}{K_i} \right) + S} \dots\dots\dots \mathbf{2.21}$$



Así entonces, se observa que en (2.21) el término  $K_m$  se encuentra modulado por la inclusión del efecto de la concentración del inhibidor que estuviese presente en el medio, mismo que puede simplificarse de la expresión bajo el término  $\alpha$  (Mariscal G., 2010). Linealizando la ecuación (2.21) simplificada con el término  $\alpha$  de acuerdo a Lineweaver-Burk se obtiene la ecuación (2.22) y el gráfico mostrado en la figura 2.15.

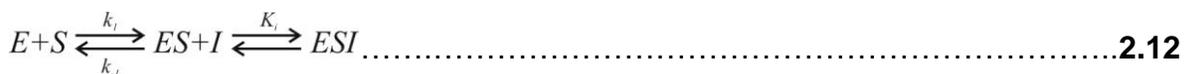
$$\frac{1}{r_0} = \frac{\alpha K_m}{r_{\max}} \frac{1}{S} + \frac{1}{r_{\max}} \dots\dots\dots 2.22$$



**Figura 2.15** Linealización de la inhibición competitiva.

➤ Inhibición incompetitiva.

En la inhibición incompetitiva el agente inhibidor se une al complejo enzima-sustrato [ES], con lo cual se presentará una distribución de la enzima en la formación de dos posibles complejos [ES] y [ESI], de tal manera que la formación del complejo terminal [ESI] depende de  $K_i$ , la cual viene dada por la reacción (2.12).





En este tipo de inhibición la enzima presenta dos sitios de unión, uno para el sustrato y otro para el inhibidor, de manera que el complejo formado por [EIS] es incapaz de dar el producto final, en consecuencia  $r_{\max}$  aumentará debido al factor  $1 = I/K_i$ , y  $K_m$  disminuirá, así entonces  $K_m$  representará una medida de la habilidad del sustrato para poder formar el complejo [ES]. De esta manera la ecuación (2.18) modificada que representa la inhibición incompetitiva es:

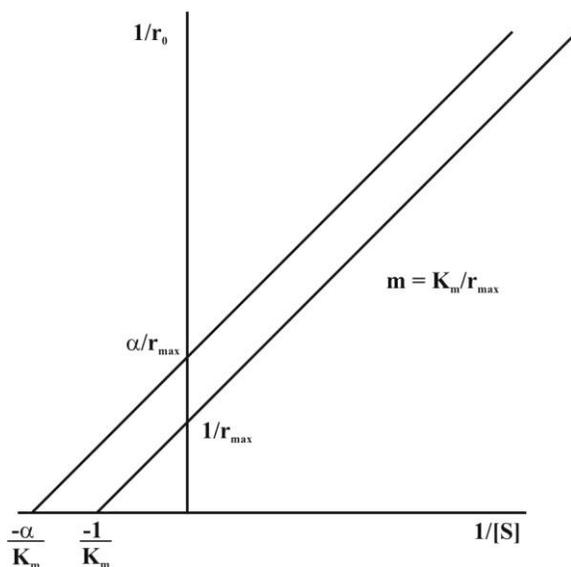
$$r_0 = \frac{r_{\max} S}{\alpha K_m + S} \dots\dots\dots 2.23$$

En la ecuación (2.23) el término  $\alpha$  está también definido por  $1 + \frac{I}{K_i}$  al igual que en la ecuación (2.22), sin embargo, está referido al equilibrio que se establece en la reacción (2.12).

Al efectuar la linealización de la inhibición incompetitiva descrita por la ecuación (2.23), se obtiene la siguiente ecuación:

$$\frac{1}{r_0} = \frac{K_m}{r_{\max}} \frac{1}{S} + \frac{\alpha}{r_{\max}} \dots\dots\dots 2.24$$

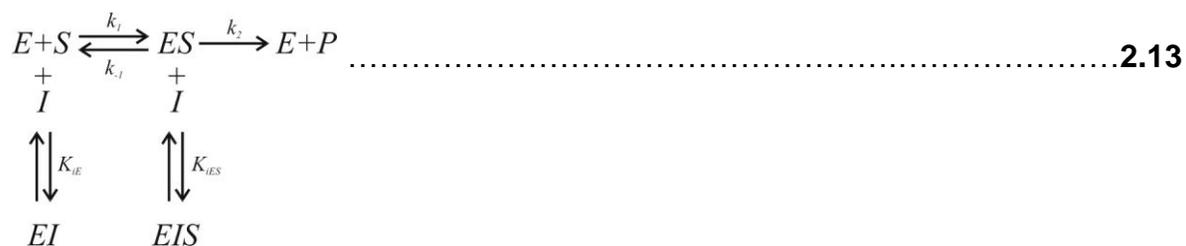
Para este tipo de inhibición tanto  $K_m$  como  $r_{\max}$  varían en función de la concentración del inhibidor, dicho efecto se puede apreciar en la figura 2.16 donde se representa la linealización del tipo Lineweaver-Burk.



**Figura 2.16** Linealización de la inhibición incompetitiva.

➤ Inhibición mixta.

En este caso pueden ocurrir los mecanismos representados en la inhibición competitiva y en la incompetitiva, de esta manera la reacción que representa la inhibición mixta es:



De esta forma se pueden presentar dos casos, en el primer caso, se puede considerar que las concentraciones de [EI] y [EIS] se encuentran en equilibrio, lo cual conlleva a que  $K_{iE} = K_{iES} = K_i$  suponiendo que la concentración del sustrato no afecta la unión que se lleva a cabo con el inhibidor; y para el segundo caso dicha suposición se descarta lo cual genera que  $K_{iE} \neq K_{iES} \neq K_i$ .

Si se considera el primer caso de inhibición, la expresión de la ecuación (2.18) puede expresarse como en la ecuación (2.25) en donde la inhibición será

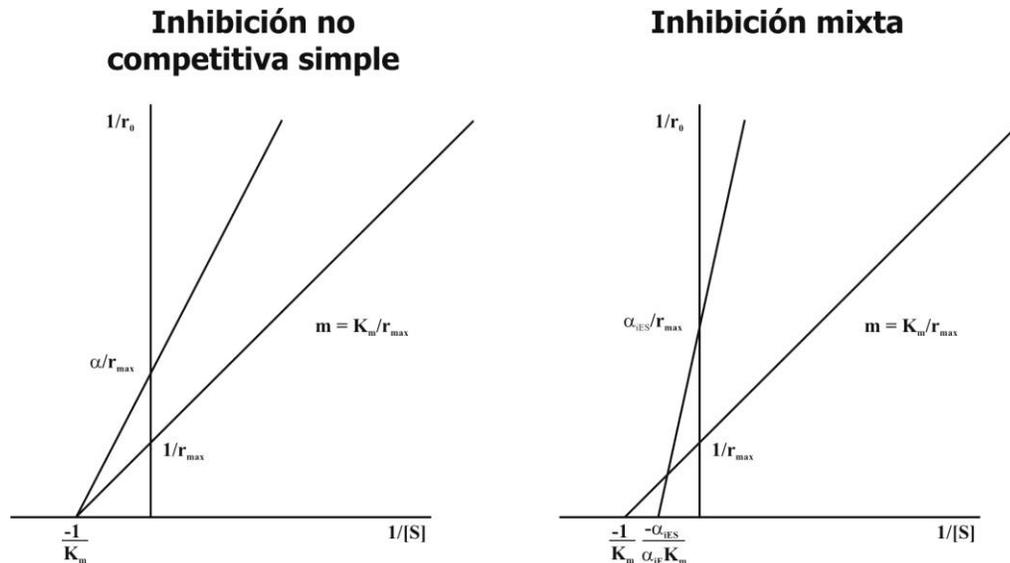


propriadamente una inhibición no competitiva simple, donde  $K_m$  no se altera por la presencia del inhibidor (Scragg A., 2011), para el caso donde  $K_i$  no es idéntica, de acuerdo a la reacción (2.13), la expresión corresponderá a la ecuación (2.26), correspondiendo propriadamente una inhibición mixta (Mariscal G., 2010) donde  $K_m$  disminuirá si  $K_{iES} < K_{iE}$  ó aumentará si  $K_{iES} > K_{iE}$ , además de también variar  $r_{max}$ .

$$r_0 = \frac{r_{max} S}{K_m + S} \frac{1}{\alpha} \dots\dots\dots 2.25$$

$$r_0 = \frac{r_{max} S}{\alpha_{iE} K_m + \alpha_{iES} S} \dots\dots\dots 2.26$$

Si se efectúa la linealización de ambos casos se pueden obtener las dos representaciones gráficas mostradas en las figura 2.17.



**Figura 2.17** Linealización de la inhibición no competitiva simple y mixta.



---

#### 2.2.4 Crecimiento bacteriano.

El crecimiento bacteriano consiste básicamente en la división de una célula en dos células similares o idénticas (fisión binaria), de esta forma el crecimiento se encuentra estrechamente ligado a la reproducción debido a que conlleva a un aumento coordinado de la masa en todas sus partes constitutivas, tomando en cuenta que no se considerará como un simple incremento total debido a que a este incremento másico se le sumará la contribución dada por parte de la acumulación de compuestos de almacenamiento dentro de la célula (Singleton P., 2004).

Para poder llevarse a cabo el crecimiento bacteriano de manera satisfactoria, deberán prevalecer ciertas condiciones ambientales mismas que sean adecuadas dependiendo de la ó las especies presentes, de esta manera los requerimientos básicos que se deben considerar son los siguientes:

- ❖ Nutrientes. Las bacterias pueden emplear un amplio rango de compuestos como nutrientes tales como azúcares y otros carbohidratos, aminoácidos, esteroides, alcoholes, hidrocarburos, metano, sales inorgánicas y dióxido de carbono, sin embargo, ninguna bacteria individual puede usar todos estos compuestos, ya que se ve limitada por el rango de enzimas que puede producir para aprovechar todos estos compuestos, además de que deberá contar con sistemas de entrada que permita la asimilación de todos los compuestos mencionados. Aunque cabe mencionar que existen bacterias capaces de cubrir todos sus requerimientos nutricionales a partir de sales inorgánicas simples y sustancias como dióxido de carbono y amonio; y en contraste existen bacterias que requieren de compuestos orgánicos más o menos complejos que se derivan de otros organismos.
- ❖ Energía. Esta se puede obtener ya sea quimiotróficamente o fototróficamente dependiendo de la especie que se trate.



- ❖ Agua. Debido a que el 80% de la masa de una bacteria es agua, se deberá contar con un cierto rango de disponibilidad de la misma ya que los nutrientes y productos de desecho entran y salen en solución. La disponibilidad está referida a que es posible que el agua se encuentre “atrapada” ya sea por la presencia de geles hidrofílicos o por iones en solución.
- ❖ Temperatura. Dependiendo del tipo de bacteria, existirá una temperatura óptima a la cual se reporte una tasa de crecimiento acelerada, de esta forma el crecimiento podrá verse afectado entre más se aleje de dicha temperatura. De este modo de acuerdo a su rango óptimo de temperatura se pueden clasificar a las bacterias como: termófilas (crecimiento óptimo a temperaturas mayores de 45°C), mesófilas (crecimiento óptimo a temperaturas de entre 15 y 45°C) y psicrófilas (crecimiento óptimo a temperaturas menores de 15°C).
- ❖ pH. Generalmente la mayoría de las bacterias presentan un crecimiento óptimo a pH neutro, sin embargo, existen especies consideradas como acidófilas cuyo pH óptimo se sitúa entre pH = 2 a pH = 4 y alcalófilas con pH óptimo de entre 8.5 y 9.5.
- ❖ Oxígeno. La necesidad de oxígeno estará en función de la especie que se trate y de las condiciones que se tengan en el medio, con lo cual dependiendo de los procesos de interés se deberán satisfacer las necesidades requeridas por las mismas.
- ❖ Iones inorgánicos. Pese a que las bacterias requieren de la disponibilidad de ciertos iones, estos deberán estar presentes en bajas concentraciones, ya que al encontrarse en elevadas concentraciones podrán considerarse como factores de inhibición para el crecimiento de las mismas. La función de los iones varía dependiendo del componente que se trate, como por ejemplo: el magnesio que interviene en los procesos de la membrana externa, el hierro que influye en los procesos de respiración así como también en algunos procesos enzimáticos, y el manganeso y níquel que actúan en enzimas o sistemas enzimáticos.

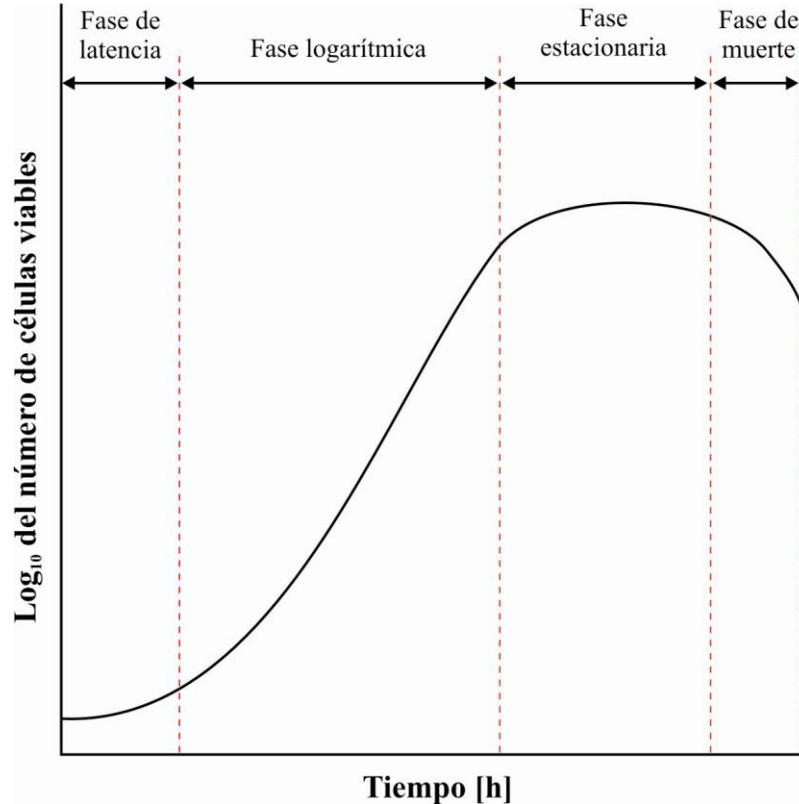


---

Cabe señalar que algunas bacterias pueden adaptarse a cambios bruscos que pudiesen suscitarse en su medio ambiente conllevando a la necesidad de sintetizar nuevos tipos de proteínas que cumplan funciones específicas mismas que permiten la sobrevivencia del organismo pudiendo derivar en la supresión de otro tipo de proteínas, esta adaptación puede desembocar en cambios en la expresión de diversos genes (Singleton P., 2004).

Como ya se menciona la manera típica de reproducción bacteriana se lleva a cabo mediante una fisión binaria, misma que se efectúa a un determinado tiempo de acuerdo a las condiciones ambientales que se tengan dentro del sistema en el cual se encuentren, a este tiempo se le denomina tiempo de duplicación.

Si se considerara un cultivo en lotes o Batch en donde una determinada cantidad de bacterias es introducida a un sistema cerrado en donde se tengan condiciones adecuadas para el crecimiento de las mismas, se podría obtener el desarrollo de la población en términos del incremento del número de células factibles en función del tiempo, con lo cual se obtendría una curva de crecimiento característica (figura 2.18).



**Figura 2.18** Curva de crecimiento bacteriano.

La primer fase que se observa en la curva de crecimiento corresponde a la fase de latencia, en dicha fase las bacterias al ser introducidas a un nuevo medio llevarán a cabo la síntesis de las enzimas necesarias para poder asimilar los nutrientes disponibles, de esta manera en esta etapa del crecimiento se lleva a cabo una adaptación cuya prolongación dependerá de las condiciones en las cuales las bacterias hayan sido introducidas, de tal forma que si las bacterias proceden de un medio que se encuentre a condiciones mucho muy semejantes a las del nuevo sistema en el cual son introducidas, el periodo en el que se desarrolle la fase de latencia puede ser mucho muy corto o incluso ausente, y de manera contraria, si estas provienen de un medio en el cual las condiciones discrepen de las nuevas condiciones a las cuales sean sometidas, la fase de latencia puede extenderse de manera considerable.



La segunda fase observada corresponde a la fase logarítmica ó exponencial, en la cual se podrá observar un incremento proporcional en donde la síntesis de los constituyentes celulares aumentará a una rapidez constante, de modo que la población de células se duplica y continuará duplicándose a intervalos regulares (Maier R., 2000). La ecuación que describe la rapidez a la cual se lleva a cabo el crecimiento en la fase exponencial viene dada por:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \dots\dots\dots 2.27$$

Donde X representa el número de células viables (masa/volumen), t el tiempo y  $\mu$  es la tasa de crecimiento específico (1/tiempo). Desarrollando la ecuación (2.27) se obtiene la ecuación (2.30).

$$\frac{dX}{X} = \mu dt \dots\dots\dots 2.28$$

$$\int_{X_0}^X \frac{dX}{X} = \mu \int_0^t dt \dots\dots\dots 2.29$$

$$\ln X = \mu t + \ln X_0 \dots\dots\dots 2.30$$

Si se considera la relación  $X/X_0 = 2$  debido a que se efectuará una duplicación celular descrita como  $2^n X_0$ , la ecuación (2.30) se expresa como:

$$2 = e^{\mu t} \dots\dots\dots 2.31$$

De esta manera en la ecuación (2.31) el tiempo t, corresponderá al tiempo de generación. Sin embargo, debido a que la tasa de utilización de nutrientes y la fuente de carbono limita el crecimiento, se presentará un instante en el cual  $dX/dt = 0$ , el cuál corresponderá a la fase estacionaria, durante esta fase se puede suscitar una baja disponibilidad de sustrato sumada a una acumulación de productos, mismos que pueden repercutir en el crecimiento de las células nuevas



que se generan, conllevando de esta forma a un equilibrio que se establece entre el número de células vivas y muertas que están presentes en el medio, durante esta etapa del crecimiento se considera el efecto del metabolismo endógeno, en donde las bacterias que sufren lisis pueden proveer fuentes de sustrato disponibles para las células nuevas.

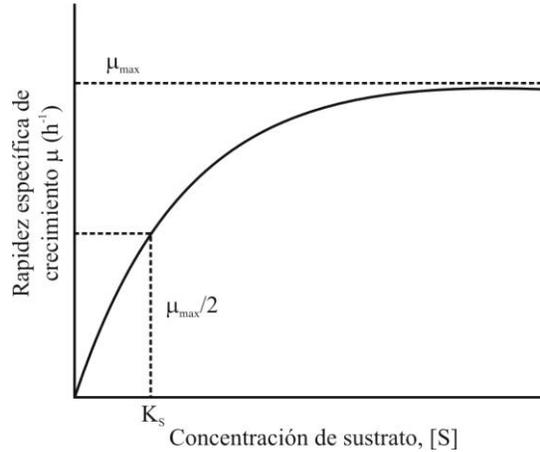
Finalmente la última etapa del crecimiento corresponde a la fase de muerte, en la cual se tendrá un decremento en la cantidad de células viables, y la expresión que describe esta etapa corresponderá a la de la ecuación (2.32)

$$\frac{dX}{dt} = -k_d X \dots\dots\dots \mathbf{2.32}$$

En donde  $k_d$  es el coeficiente de descomposición endógena (1/tiempo); cabe señalar que la fase de muerte por lo general ocurre a una rapidez mucho menor en comparación con la fase de crecimiento exponencial. De esta forma el término  $k_d X$  debe ser incluido en la ecuación general del crecimiento microbiano, expresado por la ecuación (2.33) que es la ecuación de rapidez que describe el crecimiento bacteriano.

$$\frac{dX}{dt} = \mu X - k_d X \dots\dots\dots \mathbf{2.33}$$

El efecto de la concentración de sustrato disponible durante el crecimiento puede evaluarse en términos de la rapidez específica de crecimiento en función de la concentración de sustrato [S], describiendo un comportamiento similar al observado en la cinética enzimática (figura 2.13).



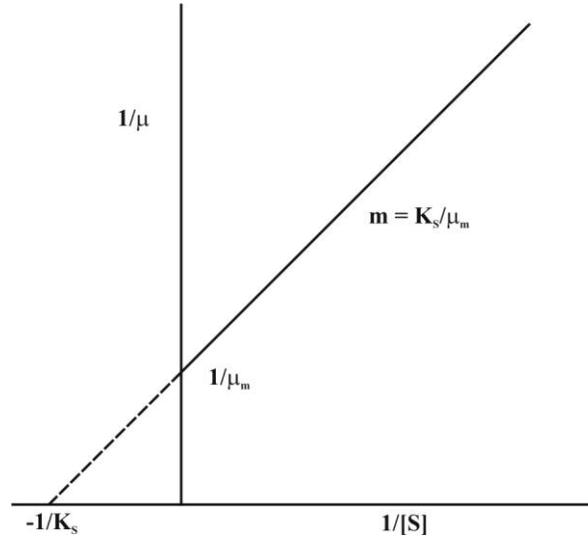
**Figura 2.19** Efecto de la concentración de sustrato sobre la tasa de crecimiento específica.

En 1940 Jacques Monod propuso una ecuación que describe el comportamiento que se observa en la figura 2.19 y que se describe en la ecuación (2.34).

$$\mu = \frac{\mu_m S}{K_s + S} \dots\dots\dots 2.34$$

Donde  $\mu$  es la rapidez específica de crecimiento ( $tiempo^{-1}$ ),  $S$  es la concentración de sustrato (masa/volumen),  $\mu_m$  es la rapidez específica de crecimiento máxima y  $K_s$  es la constante de Monod (masa/volumen) que representa la concentración de sustrato a la mitad de la máxima tasa de crecimiento. Durante la fase de crecimiento exponencial se tiene que  $S > K_s$ , y en consecuencia  $\mu = \mu_m$ , con lo cual  $K_s$  representará la afinidad de los organismos por el sustrato. Para resolver la ecuación de Monod se efectúa una linealización de la ecuación (2.34), tomando los recíprocos de la expresión y desarrollando un gráfico de  $1/\mu$  en función de  $1/S$ , en donde la pendiente corresponderá a  $K_s/\mu_m$ , la ordenada al origen a  $1/\mu_m$  y la abscisa al origen a  $-1/K_s$  como se observa en la figura 2.20.

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_s}{\mu_m} \frac{1}{S} + \frac{1}{\mu_m} \dots\dots\dots 2.35$$



**Figura 2.20** Linealización de la ecuación de Monod.

Debido a la importancia de la evaluación de la eficacia en la conversión de sustrato en biomasa, se puede determinar el rendimiento de la misma a partir de la siguiente expresión:

$$\frac{dX}{dt} = -Y \frac{dS}{dt} \dots\dots\dots 2.36$$

$$Y = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \dots\dots\dots 2.37$$

Dónde Y es el coeficiente de crecimiento celular, mismo que será característico del microorganismo debido a la capacidad de asimilación del sustrato en función de las condiciones presentes en el medio. Si se considera el instante en el que el crecimiento es máximo se podría suponer que  $S = 0$ , por lo que la ecuación (2.37) puede quedar como:

$$X_{\max} = YS_0 + X_0 \dots\dots\dots 2.38$$



Ahora bien, si se toma a consideración sólo la fase del crecimiento exponencial se puede reescribir la ecuación (2.27) sustituyendo la ecuación (2.36) obteniendo la siguiente expresión:

$$-Y \frac{dS}{dt} = \mu X \dots\dots\dots 2.39$$

Dejando la ecuación (2.39) en términos de la rapidez específica de crecimiento se obtiene:

$$\mu = - \frac{\left( \frac{dS}{dt} \right) Y}{X} \dots\dots\dots 2.40$$

### 2.3 Biodegradación de compuestos nitrogenados.

El nitrógeno es considerado como un nutriente de importancia, que junto con el fósforo contribuyen a problemas de eutrofización de lagos y embalses, siendo el fósforo el nutriente controlante para que se suscite dicho fenómeno; otro de los efectos negativos implicados por la presencia de altas concentraciones de compuestos nitrogenados en efluentes residuales o de tratamiento, es que su presencia contribuye en el consumo del oxígeno disuelto especialmente en su forma amoniacal debido a que se consumirá oxígeno para poder pasar a su estado oxidado (nitritos y nitratos), repercutiendo de este modo en la supervivencia de fauna marina si se descargan altas cantidades de compuestos nitrogenados.

Considerando un agua residual bruta común, el nitrógeno suele estar presente en forma de amoniaco o de nitrógeno orgánico, y en menor medida se presentan bajas o incluso nulas concentraciones de nitratos y nitritos (Metcalf & Eddy, 2003); tomando en consideración que comúnmente el nitrógeno en su forma orgánica



estará presente como aminoácidos ó urea, aunque tomando en cuenta las características del agua residual este puede estar presente en otras formas.

Se han empleado diversos métodos para la eliminación del nitrógeno mismos que pueden ser químicos, físicos ó biológicos, más sin embargo, se deben considerar las características físico-químicas del agua residual problema. En la tabla 2.6 se listan algunos de los procesos empleados para la remoción de compuestos nitrogenados.

**Tabla 2.6** Procesos empleados para la remoción de compuestos nitrogenados (Metcalf & Eddy, 2003).

Tipo de proceso	Proceso	Efectos de eliminación sobre el tipo de compuesto nitrogenado			% Eliminación total del nitrógeno
		Orgánico	$\text{NH}_3 - \text{NH}_4^+$	$\text{NO}_3^-$	
Tratamiento convencional	Primario	10 – 20 %	Ningún efecto	Ningún efecto	5 – 10
	Secundario	15 – 20 % urea → $\text{NH}_3 - \text{NH}_4^+$	< 10 %	Ligero	10 – 30
Biológico	Asimilación bacteriana	Ningún efecto	40 – 70 %	Ligero	30 – 70
	Desnitrificación	Ningún efecto	Ningún efecto	80 – 90 %	70 – 95
	Cultivo de algas	Conversión parcial a $\text{NH}_3 - \text{NH}_4^+$	Conversión celular	Conversión celular	50 – 80
	Nitrificación	Limitado	Conversión a nitratos	Ningún efecto	5 – 20
	Estanques de estabilización	Conversión parcial a $\text{NH}_3 - \text{NH}_4^+$	Eliminación parcial por arrastre	Eliminación parcial	20 – 90
Químico	Cloración de breakpoint	Incierto	90 – 100 %	Ningún efecto	80 – 95
	Coagulación química	50 – 70 %	Ligero	Ligero	20 – 30
	Adsorción sobre carbono	30 – 50 %	Ligero	Ligero	10 – 20
	Intercambio iónico selectivo para amoníaco	Ligero, incierto	80 – 97 %	Ningún efecto	70 – 95
	Intercambio iónico selectivo para nitrato	Ningún efecto	Ningún efecto	75 – 90 %	70 – 90



<b>Físico</b>	Filtración	30 – 95 % sólo en suspensión	Ningún efecto	Ningún efecto	20 – 40
	Arrastre con aire	Ningún efecto	60 – 95 %	Ningún efecto	50 – 90
	Electrodialisis	100 % sólo en suspensión	30 – 50 %	30 – 50 %	40 – 50
	Osmosis inversa	60 – 90 %	60 – 90 %	60 – 90 %	80 – 90

Tal y como se observa en la tabla 2.6, existen diversas alternativas para la eliminación del nitrógeno, pero muy pocos de los procesos citados aseguran una eliminación considerablemente elevada de la cantidad de nitrógeno total, con lo cual se aprecian limitantes en función del tipo de compuesto nitrogenado del cual se trate debido a las interconversiones que se presentan de manera natural.

Dentro de la amplia gama de alternativas disponibles para la eliminación del nitrógeno, se prefiere el empleo de procesos biológicos debido a que los procesos fisicoquímicos suelen ser costosos, de funcionamiento irregular, y presentan problemas en cuanto al mantenimiento (Metcalf & Eddy, 2003), aunque no son descartados y la implementación puede efectuarse de manera combinada.

### **2.3.1 Ciclos biológicos.**

Al implementar un proceso de tratamiento biológico para la remoción de contaminantes presentes en aguas residuales, resulta de gran importancia comprender que dichos tratamientos basan su principio en la acción controlada de los procesos que de manera natural se presentan, pero diferirán de las condiciones ambientales a las cuales suscitan.

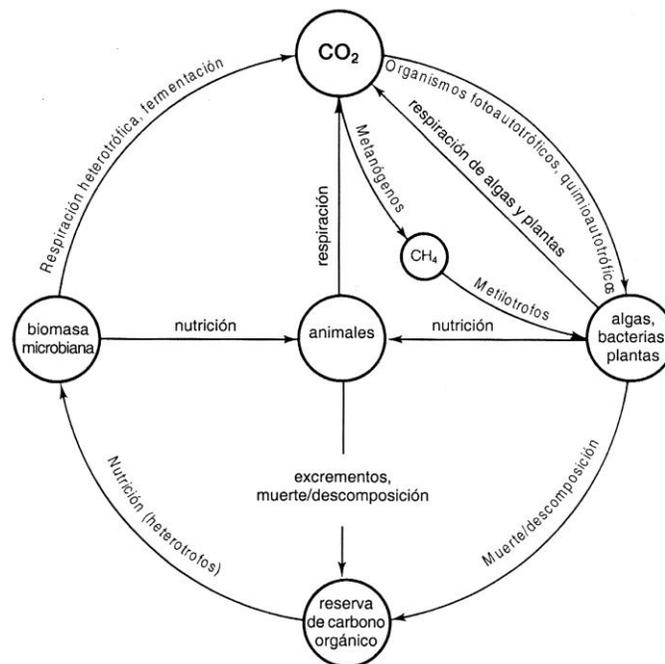
Como se ha mencionado anteriormente, para que las bacterias subsistan de manera satisfactoria necesitan de una fuente de carbono, energía y nutrientes, de esta forma se puede disponer de una amplia gama de fuentes, mismas que de manera natural se satisfacen de acuerdo a los ciclos naturales que se presentan. Considerando su importancia se pueden considerar tres ciclos biológicos



principales que involucran la acción bacteriana: el ciclo del carbono, el ciclo del nitrógeno y el ciclo del azufre (Singleton P., 2004), mismos que se describen a continuación:

- ◆ Ciclo del carbono.

Se puede disponer del carbono a partir de diversas fuentes, inicialmente se podría considerar la asimilación de este a partir de la degradación de la materia orgánica por parte de los microorganismos saprófitos, a su vez, a partir del resultado asimilativo se puede producir carbono inorgánico como resultado del proceso de respiración derivado de una determinada producción de biomasa, consecuentemente esta producción puede ser asimilada por organismos autótrofos, con lo cual este vuelve a ser aprovechado y conlleva al enlace cíclico que de manera simplificada puede observarse en la figura 2.21. Cabe señalar que tanto la fijación de  $\text{CO}_2$  como la presencia de compuestos xenobióticos (contaminantes ambientales resistentes a la biodegradación debido a que poseen enlaces éter (C-O-C)) repercuten de manera desequilibrante al ciclo, ya que en el caso del  $\text{CO}_2$  puede existir una relación asimilativa baja en comparación con su producción, así como acumulación por efecto de los xenobióticos.



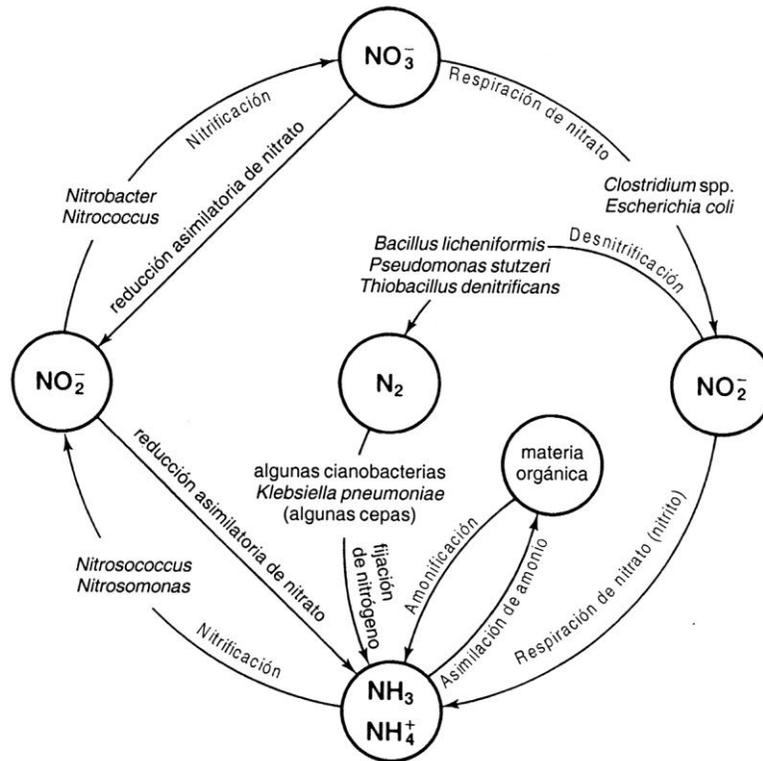
**Figura 2.21** Ciclo biológico del carbono (Singleton P., 2004).

◆ **Ciclo del nitrógeno.**

Satisfacer las necesidades de una fuente de nitrógeno es de vital importancia debido a que este es un componente constitutivo de proteínas y ácidos nucleicos, de esta forma los mecanismos de asimilación del nitrógeno comprenden diferentes rutas, mismas que se ilustran en la figura 2.22. La asimilación más común de nitrógeno se efectúa a partir de su forma amoniacal, en donde se lleva a cabo la incorporación de un grupo amino, el cual tiene como principal objetivo el actuar como un donante de nitrógeno por medio de subsecuentes reacciones de transaminación derivando en la transformación de nuevos compuestos nitrogenados, sin embargo, también se puede efectuar la asimilación del nitrógeno en forma de nitrato conllevando a un proceso productor de energía el cual se denomina nitrificación; cabe señalar que el proceso de nitrificación se



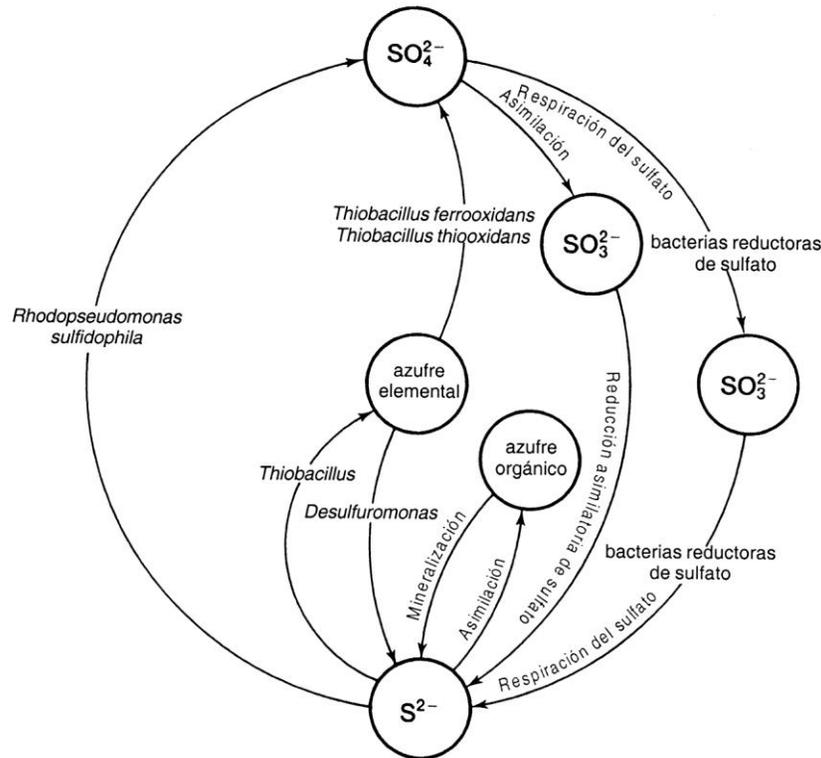
llevará a cabo si se satisfacen la demanda de oxígeno requerido por las bacterias, mismas que son específicas.



**Figura 2.22** Ciclo biológico del nitrógeno (Singleton P., 2004).

◆ Ciclo del azufre.

El azufre forma parte de algunos aminoácidos y diferentes cofactores enzimáticos, el cual es un compuesto de importancia para la metabolización de diversos sustratos. La asimilación del azufre se lleva a cabo principalmente a partir del sulfato, pero antes de ser incorporado se lleva a cabo una reducción a sulfuro, dicha reducción si no es controlada puede desembocar en la formación de sulfuro de hidrógeno, presentándose en el caso de no haber una asimilación adecuada (figura 2.23).



**Figura 2.23** Ciclo biológico del azufre (Singleton P., 2004).

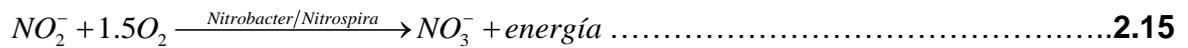
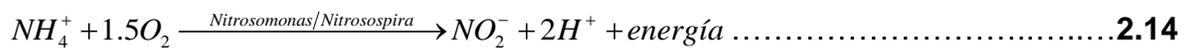
Como se ilustra en las figuras 2.21, 2.22 y 2.23, se efectúa una descomposición de sustancias orgánicas complejas a compuestos inorgánicos simples (mineralización) conllevando una posible asimilación bacteriana bajo condiciones específicas, y con ello es posible implementar sistemas biológicos controlados que permiten la estabilización de materia orgánica adecuando a las condiciones idóneas de acuerdo a los compuestos de interés.

### 2.3.2 Nitrificación y desnitrificación bacteriana.

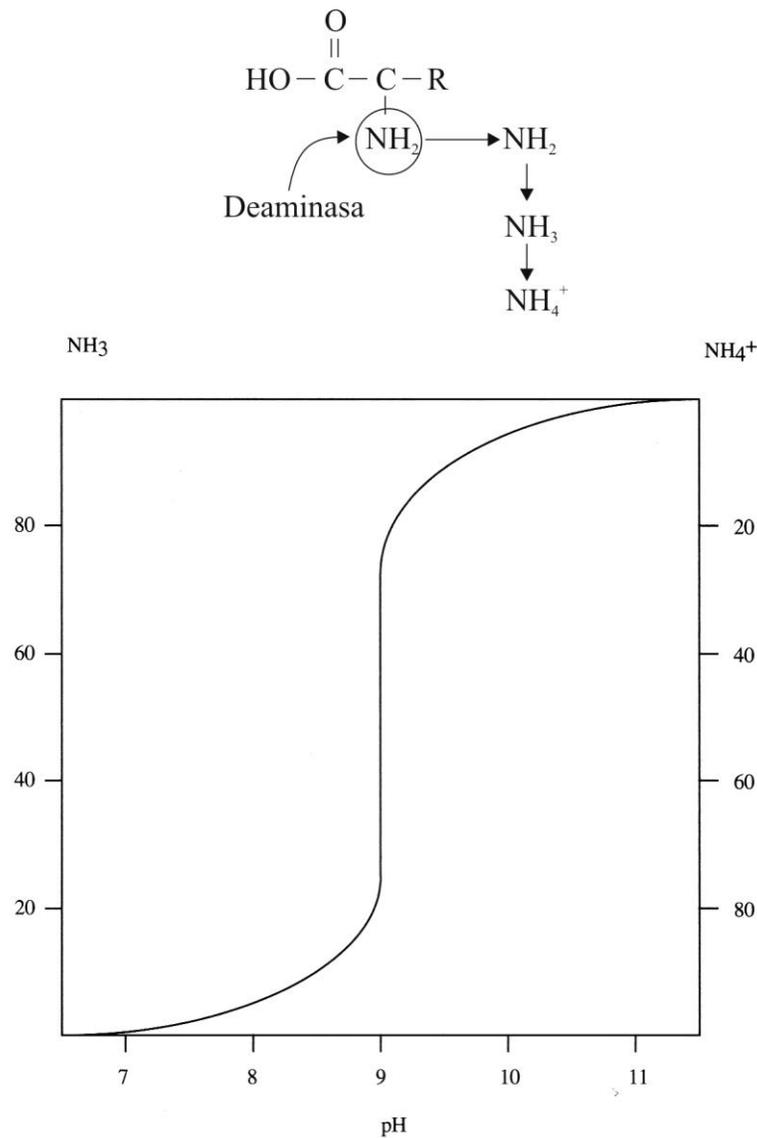
Como se observa en la figura 2.22, existen dos tipos de procesos en los cuales de acuerdo a la forma en la cual se asimila el nitrógeno se denominarán como nitrificación y desnitrificación.



El proceso de nitrificación se lleva a cabo mediante bacterias aerobias estrictas, las cuales efectúan la conversión de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) y posteriormente a nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) partiendo de materia orgánica que contenga un grupo amino como se describe en las reacciones (2.14) y (2.15), de este modo dichas bacterias son consideradas como específicas, y de acuerdo a la etapa asimilativa de conversión pueden ser *Nitrosomonas*, *Nitrospira*, *Nitrobacter* ó *Nitrospira*.



La primera etapa del proceso que conduce a la nitrificación consiste en la extracción del grupo amino por medio de la enzima deaminasa, la cual conllevará a una distribución de amonio y amoniaco (figura 2.24), misma que dependiendo de la cantidad y proporción en la que estén presentes se verá afectado el pH.



**Figura 2.24** Distribución de amonio y amoniaco en función del pH (Gerardi M., 2006).

Las bacterias que llevan a cabo el proceso de nitrificación son bacterias quimioautótrofas, de modo que obtendrán su fuente de carbono a partir de su forma inorgánica, y su fuente de energía provendrá a partir de la mineralización del nitrógeno; de tal forma que la rapidez a la cual se reproducen las bacterias nitrificantes es considerablemente baja, dado que en condiciones óptimas el



tiempo de generación de estas especies puede suscitarse entre 8 y 10 horas, y en condiciones severas su tiempo de generación oscilara entre 2 ó 3 días lo cual conlleva a tiempos de residencia celular prolongados en función de las condiciones que se tengan (Gerardi M., 2006).

Existen diversos factores que afectan el proceso de nitrificación, destacando entre ellos la temperatura y el tiempo de residencia celular mismos que se relacionan y se ilustran en la tabla 2.7.

**Tabla 2.7** Relación entre la temperatura y el tiempo de residencia celular durante el proceso de nitrificación.

Temperatura [°C]	$\theta_c$ [días]	Efecto en la nitrificación
30	7	Temperatura óptima de nitrificación
25	10	Condiciones aceptables para la nitrificación
20	15	
15	20	Se tendrá un 50% en el decaimiento de la eficacia
10	30	Se tendrá un 20% en el decaimiento de la eficacia
5	~	La nitrificación cesa

Otros factores involucrados en el desempeño de la nitrificación son:

- La alcalinidad. Es un factor importante que indica la variación entre las conversiones que ocurren durante la nitrificación, y las reacciones que pueden influir en la disminución de esta son:



De modo que se tiene una relación directa entre el pH y la alcalinidad, y debido a esto el pH puede ser un indicativo de la buena o mala tasa de nitrificación,



considerando que esta ocurre en intervalos de pH entre los 7.3 a los 8.5, en donde se asume que la nitrificación es constante, aunque por otro lado, operar a condiciones de pH mayores a 7.3 en los sistemas de tratamiento biológico, repercutirá en la baja de la remoción en términos del carbono orgánico, así como también en una baja concentración de fosfatos debido a la precipitación de ortofosfatos por iones calcio presentes.

- La concentración de oxígeno disuelto. Para obtener una buena tasa de nitrificación la concentración de oxígeno disuelto deberá mantenerse por encima de los 3 mg/L, lo cual contribuye a la remoción del carbono orgánico beneficiando a las bacterias nitrificantes.
- La toxicidad. La fuente de carbono utilizable y el sustrato son las dos únicas formas en donde las bacterias nitrificantes pueden presentar condiciones tóxicas (figura 2.8). De esta manera la presencia de compuestos orgánicos de cadenas cortas tales como alcoholes y algunas aminas podrían repercutir inhibiendo la acción de las bacterias nitrificantes, así entonces, solo cuando la presencia de estas especies se encuentre a bajas concentraciones ó haya sido degradada por completo, podrá existir la nitrificación.

**Tabla 2.8** Factores inhibitorios y de toxicidad para bacterias nitrificantes.

	<b>Forma</b>	<b>Ejemplo</b>
<b>Formas de toxicidad</b>	Cloro libre residual	Ácido hipocloroso (HOCl) ó ión $OCI^-$
	Inorgánica	Metales pesados
	Orgánica	Fenoles y carbono reconocible (COD)
	pH	< 5.0
	Sustrato	Amoniaco y ácido nitroso
	Luz solar	Radiación ultravioleta
	Temperatura	< 5.0 °C
	<b>Formas de</b>	Compuesto orgánico



<b>carbono inhibitorias</b>	Metanol	CH <sub>3</sub> OH
	Metilamina	CH <sub>3</sub> NH <sub>2</sub>
	Etanol	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH
	n-propanol	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH
	i-propanol	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CHOH
	n-butanol	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH
	t-butanol	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> COH
	Acetato de etilo	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
	Etanolamina	CH <sub>3</sub> NH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH

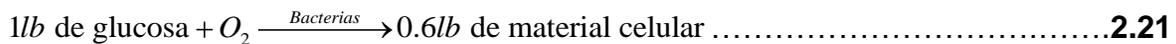
La inhibición por sustrato puede presentarse por parte de la fuente de energía de las bacterias nitrificantes, las cuales son el amonio y el nitrito, presentándose una toxicidad si la concentración de amonio se encuentra por arriba de 480 mg/L, implicando un incremento del pH en donde se establecerá un desequilibrio ácido-base que influirá en la conversión de nitrito a ácido nitroso debido a que el amonio presente se estaría oxidando rápidamente a nitrito de lo que este se oxidaría a nitrato, este efecto queda descrito por las reacciones (2.18) y (2.19).



Por otro lado el proceso de desnitrificación es llevado a cabo por medio de bacterias facultativas, las cuales emplean los nitratos y nitritos para poder llevar a cabo la degradación de la materia orgánica tomando como fuente de oxígeno el disponible en dichas especies, con lo cual, deberá prevalecer un gradiente en la cantidad de oxígeno molecular presente para que las bacterias empleen el que se encuentre disponible en la forma de nitratos y nitritos, y debido a esto también existirá una variación en la producción de biomasa conllevando a un decremento como se describe en las reacciones (2.21) y (2.22), además de que el tiempo de



generación no es tan prolongado como el de las bacterias nitrificantes ya que este oscila entre los 15 y 30 min, y la síntesis de las enzimas necesarias para la asimilación del oxígeno proveniente de los nitratos y nitritos es acelerado en condiciones de baja concentración de oxígeno disuelto.



A diferencia de las bacterias nitrificantes, se puede disponer de diversas especies de bacterias capaces de efectuar el proceso de desnitrificación, sin embargo, los géneros que reportan un mayor número de especies capaces de realizar la desnitrificación son las *Pseudomonas*, *Alcaligenes* y *Bacillus*.

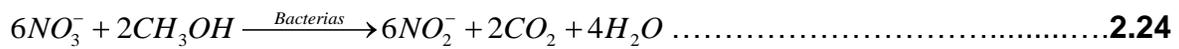
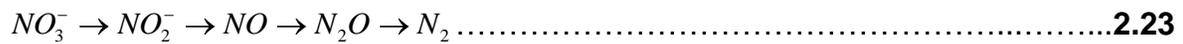
**Tabla 2.9** Géneros comunes en sistemas de lodos activados que contienen especies desnitrificantes (Gerardi M., 2006).

<i>Achromobacter</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Neisseria</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Flavobacterium</i>	<i>Paracoccus</i>
<i>Agrobacterium</i>	<i>Gluconobacter</i>	<i>Propionibacterium</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Holobacterium</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Hyphomicrobium</i>	<i>Rhizobium</i>
<i>Chromobacterium</i>	<i>Kingella</i>	<i>Rhodopseudomonas</i>
<i>Corynebacterium</i>	<i>Methanonas</i>	<i>Spirillum</i>
<i>Denitrobacillus</i>	<i>Moraxella</i>	<i>Thiobacillus</i>
<i>Enterobacter</i>		<i>Xanthomonas</i>

Cabe señalar, que se deberá disponer de una cierta cantidad de carbono orgánico para que la desnitrificación se lleve a cabo satisfactoriamente, estableciéndose de este modo una relación directa entre la cantidad de oxígeno disponible, ya que



para degradar la materia orgánica se requerirá de un aceptor de electrones, mismo que en función de la cantidad de oxígeno en forma de nitratos o nitritos disponga, efectuándose así la asimilación del material orgánico presente y conllevando a una asimilación del nitrógeno en función de la cantidad de amonio y nitrato disponibles en el sistema considerados como sustratos energéticos. Los principales sustratos energéticos considerados en la etapa de desnitrificación son el nitrato y el nitrito, produciéndose intermediarios como el oxido nitroso y el oxido nítrico (reacción 2.23), sin embargo, la reducción del nitrato y del nitrito (reacción 2.24 y 2.25 respectivamente) se considerarán como los determinantes en el rendimiento energético total englobado en la reacción general 2.20.



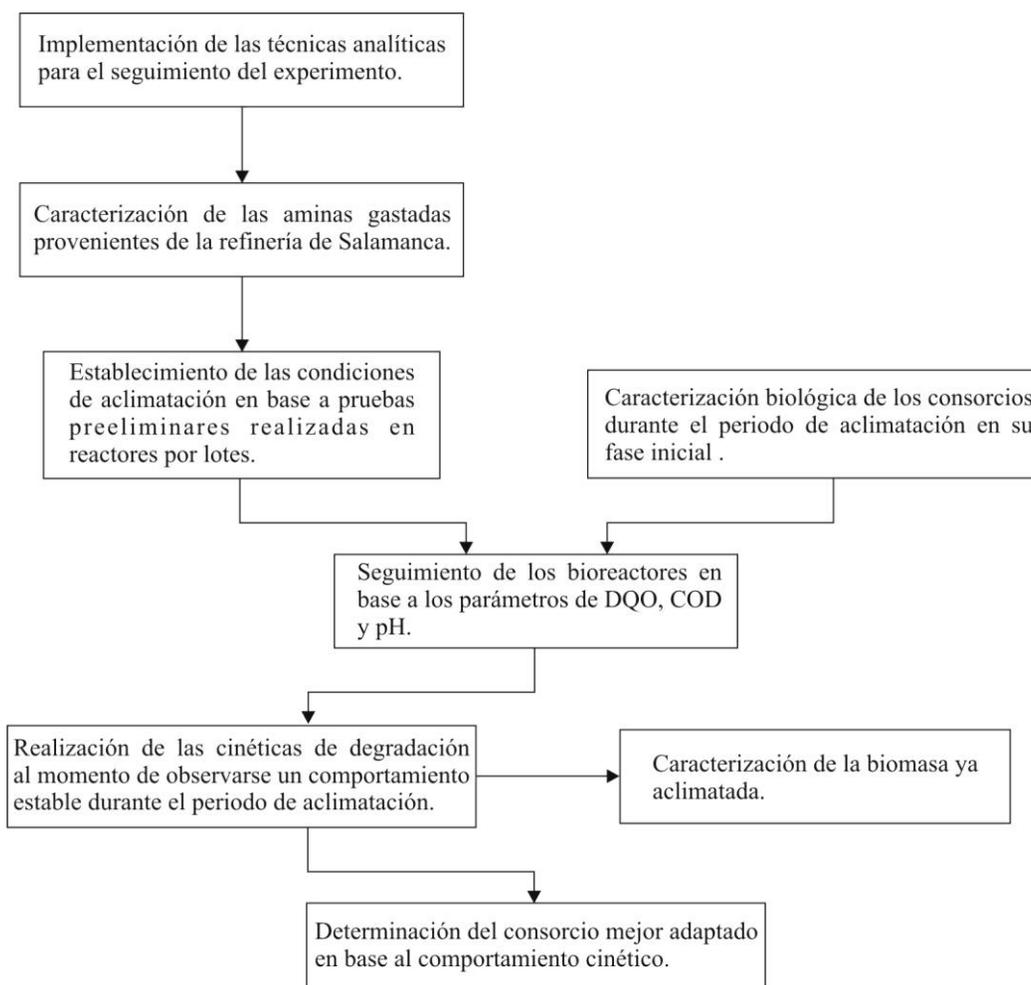
Uno de los aspectos más importantes que se aprecian en la reacción (2.25) es la producción de alcalinidad que se atribuye a la formación de los iones  $OH^-$ , la cual se conjuga con la producción de iones bicarbonato que se generan a partir de la disolución de  $CO_2$ , de este modo si se conjunta la etapa de nitrificación que conlleva a un decremento en la alcalinidad, esta puede verse recuperada a partir del proceso de desnitrificación, sin embargo, las condiciones a las cuales se lleva a cabo una óptima desnitrificación será a pH de entre 7.0 y 7.5, lo cual tendrá que ser considerado al implementar un proceso combinado.



## CAPÍTULO 3.

### 3. METODOLOGÍA.

En este capítulo se describe la metodología experimental desarrollada en este trabajo de tesis, misma que se ilustra de manera general en la figura 3.1 y se detalla en los subsecuentes apartados de este capítulo.



**Figura 3.1** Diagrama general del procedimiento experimental.



### 3.1 Implementación de técnicas analíticas.

Se realizaron los procedimientos analíticos referidos en normas mexicanas (NMX) y métodos estandarizados (ASTM, APHA-AWWA-WPCF) para los parámetros de interés que se establecieron en este trabajo, mismos que se encuentran citados en la tabla 3.1, detallando los procedimientos llevados a cabo en el apartado de anexos.

**Tabla 3.1** Técnicas implementadas para la determinación de los parámetros de interés.

Parámetro	Referencia	Unidades
Demanda química de oxígeno (DQO)	NMX-AA-030-SCFI-2001	mg/L
Carbono orgánico disuelto (COD)	APHA-AWWA-WPCF (5310)	mg/L
Sólidos suspendidos totales (SST)	NMX-AA-034-SCFI-2001	mg/L
Sólidos suspendidos volátiles (SSV)	NMX-AA-034-SCFI-2001	mg/L
Nitratos ( $\text{NO}_3^-$ )	APHA-AWWA-WPCF (4500-N)	mg/L
Nitritos ( $\text{NO}_2^-$ )	NMX-AA-099-SCFI-2006 APHA-AWWA-WPCF (4500-N)	mg/L
Nitrógeno orgánico ( $\text{N-N}_{\text{org}}$ )	NMX-AA-026-SCFI-2001 APHA-AWWA-WPCF (4500-N)	mg/L
Nitrógeno amoniacal ( $\text{N-NH}_3$ )	NMX-AA-026-SCFI-2001 APHA-AWWA-WPCF (4500-N)	mg/L
Nitrógeno total Kjeldahl ( $\text{N-N}_{\text{tk}}$ )	NMX-AA-026-SCFI-2001 APHA-AWWA-WPCF (4500-N)	mg/L
Sulfuros	ASTM UOP 209-00	% peso
Oxígeno disuelto (OD)	NMX-AA-012-SCFI-2001	mg/L
Sólidos sedimentables	NMX-AA-004-SCFI-2000	mL/L
Turbidez	NMX-AA-038-SCFI-2001	NTU
pH	ASTM-D-1293-99 (2005)	

Para establecer los parámetros de interés se tomo en consideración las características de las aminas gastadas las cuales son consideradas como residuo en el proceso de endulzamiento del petróleo, cabe mencionar que las características a las cuales provenía la muestra corresponden al proceso de



endulzamiento de la refinería “Ing. Antonio M. Amor” ubicada en Salamanca Guanajuato.

### **3.2 Caracterización de la biomasa.**

Para poder caracterizar la biomasa se emplearon técnicas microbiológicas tales como la tinción de gram, pruebas de oxidasa y pruebas bioquímicas empleando un kit de identificación comercial (Remel RapID™), con la finalidad de poder diferenciar los dos consorcios empleados en base a la composición de su población.

#### **3.2.1 Fuente del inculo.**

Con la finalidad de obtener una población de microorganismos adecuada para la asimilación de las aminas gastadas, se seleccionaron dos tipos de consorcios que de acuerdo a su procedencia y características pudieran brindar una población que fuese diferenciable.

El primer consorcio seleccionado se obtuvo originalmente de la planta de tratamiento de aguas residuales de Ciudad Universitaria, aunque cabe mencionar que la fuente del inculo tomado para esta experimentación provenía de un sistema ya adaptado al tratamiento de aguas residuales con fenol como contaminante modelo (Mariscal G., 2010), para lo cual se considero que la adaptación de este consorcio a la amina gastada se vería favorecida debido a las condiciones extremas de las cuales procedía.

El segundo consorcio seleccionado fue proporcionado por el Instituto de Ingeniería de la UNAM, el cual provenía de un proceso anaerobio de la industria cervecera, con lo cual se considero adecuado ya que las aminas contienen una cantidad considerablemente alta de nitrógeno, y por lo tanto se habría de considerar una población de bacterias facultativas capaces de asimilar nitratos y nitritos para efectuar un proceso de desnitrificación.

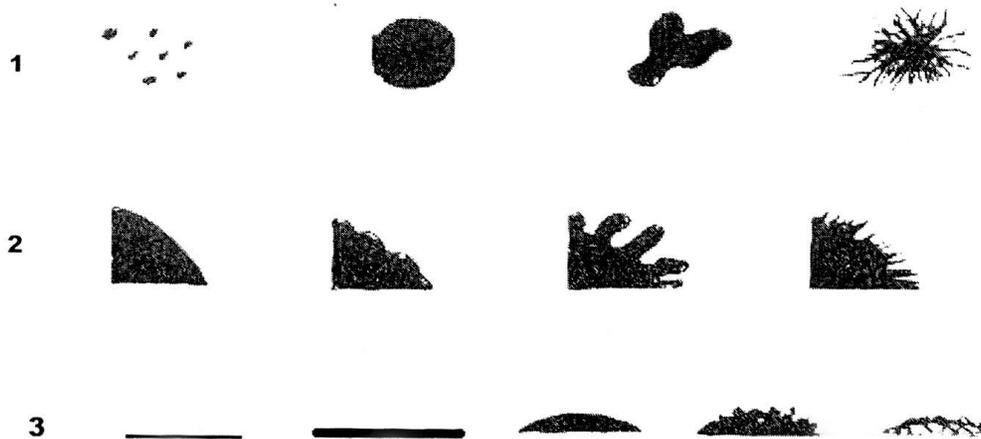


### 3.2.2 Aislamiento e identificación de cultivos bacterianos.

Para poder caracterizar la biomasa adecuadamente se efectuó en primer instancia el aislamiento de los microorganismos presentes en ambos consorcios, para ello se realizó una separación física de los microorganismos empleando medios de cultivo sólidos.

Para el aislamiento de los microorganismos se emplearon medios de cultivo comerciales BD Bioxon, siendo estos: Agar Nutritivo, Agar Infusión Cerebro Corazón (IBH) y Agar Cetrimida, dichos medios se seleccionaron debido a que estos son comúnmente utilizados en el estudio bacteriológico, considerando que el medio nutritivo y el medio infusión cerebro corazón permiten el crecimiento de una gran variedad de microorganismos, lo que permite identificar la mayoría de las especies presentes, por otro lado, el medio cetrimida se selecciono debido a que este es considerado como un medio de cultivo selectivo que favorece el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*, y debido a esto se podría apreciar si existe la presencia de especies pertenecientes al género de las *Pseudomonas*, ya que estas producen una amplia gama de enzimas que les permite asimilar diferentes sustratos (Gerardi M., 2006).

El método de separación física establecido consistió en la diferenciación de las especies presentes en base a la formación de colonias características (figura 3.2), las cuales se originan a partir de un individuo que asimila los nutrientes provistos por el medio y bajo condiciones controladas lleva a cabo su reproducción originando una colonia compuesta del mismo tipo de microorganismos que es apreciable a simple vista, y en base a las características observadas puede distinguirse de otras colonias formadas en el medio. Una vez localizadas las colonias diferenciables, con ayuda de un asa microbiológica y bajo condiciones axénicas se transfirieron las colonias a medios de cultivo nuevos, buscando de este modo un crecimiento de colonias únicas que tuvieran las mismas características fenotípicas, lo cual indicaría que el aislamiento fuera adecuado.



**Figura 3.2** Características morfológicas observadas en colonias desarrolladas en agar, contemplando: 1. Forma, 2. Borde, 3. Elevación y 4. Color (Ramírez R., et. al., 2006).

Una vez obtenidos los cultivos puros, se procedió a la identificación de los mismos, y para ello se efectuaron pruebas bioquímicas de análisis cualitativo mediante el empleo de un kit comercial (Remel Rapid™) como el que se muestra en la figura 3.3. Dichas pruebas consisten en la identificación de especies a partir de su acción frente a monosustratos cromogénicos específicos que emplean sistemas indicadores para poder apreciar el comportamiento de los mismos, el cual es característico para cada especie.





**Figura 3.3** Pruebas bioquímicas Remel RapID™ ONE y RapID™ NF Plus empleadas para la identificación de los microorganismos.

Antes de emplear las pruebas bioquímicas se efectuaron tinciones de gram y pruebas para la determinación de producción de enzimas oxidasa, mismas que son requeridas para poder efectuar la identificación de manera satisfactoria (el procedimiento llevado a cabo se detalla en el anexo 6.12).

Con base a los resultados de las pruebas preliminares realizando las tinciones de gram y oxidasa de las bacterias aisladas, se emplearon dos tipos de pruebas bioquímicas basadas en el principio anteriormente descrito pero diferenciadas entre sí por el tipo de sustrato que estas contenían en cada uno de los pocillos de reacción que se observan en la figura 3.3, de modo que la interpretación de los datos se obtiene en base a los cambios observados, mismos que permiten obtener un código característico que de acuerdo al fabricante permite la identificación de las especies al ser introducido al software ERIC proporcionado por el mismo.

### **3.3 Aclimatación de la biomasa.**

Debido a que se emplearon dos consorcios microbianos distintos se designaron como R1 y R2 a los sistemas establecidos para poder diferenciar la procedencia del inóculo, con lo cual se denotó como R1 al sistema conformado por microorganismos procedentes del sistema adaptado a la remoción de fenol,



mientras que R2 hace referencia a los microorganismos procedentes de la industria cervecera.

Una vez efectuada la caracterización de la amina gastada y apoyándose en trabajos anteriormente realizados (Macías R., 2007; Nakazawa A. y Alcantar F., 2007; Mariscal G., 2010), se establecieron las condiciones de aclimatación tomando en consideración los requerimientos necesarios para la síntesis de biomasa, con lo cual además de modular la cantidad de amina gastada considerada como el único sustrato provisto, se adicionaron los nutrientes indicados en la tabla 3.2 tomados de base a partir de la NMX-AA-028-SCFI-2001 para la determinación de la demanda bioquímica de oxígeno.

**Tabla 3.2** Composición de las soluciones nutritivas empleadas.

		Fórmula	Concentración [g/L]
Solución A	Fosfato monobásico de potasio	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.850
	Fosfato dibásico de potasio	$\text{K}_2\text{HPO}_4$	2.175
	Fosfato dibásico de sodio	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	3.340
	Cloruro de amonio	$\text{NH}_4\text{Cl}$	0.050
Solución B	Cloruro de calcio	$\text{CaCl}_2$	0.275
Solución C	Sulfato de magnesio	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.225

Los parámetros que se evaluaron para el seguimiento de la aclimatación fueron el pH y la DQO debido a la practicidad de la metodología de análisis, además de mantener una aireación constante suministrada a partir de una bomba convencional de pecera capaz de mantener una concentración de oxígeno disuelto promedio de 4.7 mg/L. Una vez definidos los parámetros de evaluación para el seguimiento de la aclimatación, se propusieron dos métodos con fines comparativos.



El primer método de aclimatación consistió en adicionar una cantidad de biomasa conocida en términos volumétricos de lodo inoculado a un reactor por lotes que contuviese una elevada carga de sustrato medido en términos de DQO con el objetivo de aplicar el principio que se establece para llevar a cabo una bioaumentación (Gerardi M., 2006), el cual consiste en obtener un inóculo propio del sistema y aumentar la biomasa que subsiste a las condiciones ambientales problema, sin embargo, debido a que no se encontró una población bacteriana contenida en la muestra bruta, se planteó esta metodología alternativa que permitiese obtener microorganismos persistentes a las condiciones más extremas posibles. De esta forma el sistema reaccionante establecido para la implementación de este método consistió de un volumen reaccionante de 2.5 L compuesto de una carga de sustrato de 1000 mg DQO/L aproximadamente y una cantidad de nutrientes de 20, 2 y 2 mL de las soluciones A, B y C respectivamente; este sistema se inoculó con 500 mL de lodos de R1, y se dio un seguimiento de 15 días para observar su desempeño evaluando la DQO cada 24 hrs.

Concluida la primera etapa de evaluación se estableció un nuevo sistema R1 bajo condiciones de DQO superiores a 1000 mg/L y modificando la cantidad de nutrientes a 15, 2 y 2 mL de las soluciones nutritivas A, B y C respectivamente, además de suministrar un volumen de lodos sedimentados de 60 mL al sistema reaccionante de 2.5 L, cabe mencionar que para este nuevo sistema el inóculo adicionado estaba conformado por una mezcla 1:1 de microorganismos originales R1 y los procedentes del primer sistema evaluado. Este segundo reactor se evaluó en un periodo de 30 días midiendo paulatinamente su respuesta en términos de la DQO.

Concretados los 30 días de evaluación y a partir del desempeño observado en el sistema, se efectuó una purga de lodos y se reacondicionó el sistema reaccionante periódicamente durante los meses de Noviembre, Diciembre, Enero y Febrero para evaluar la estabilidad del sistema fijando las siguientes condiciones de operación:



**Tabla 3.3** Condiciones establecidas para la evaluación de la estabilidad del reactor R1.

Volumen Reaccionante	3 L
Solución A	15 mL
Solución B	3 mL
Solución C	3 mL
Carga de sustrato promedio en términos de DQO	800 mg/L
Cantidad de inóculo adicionado al inicio de las reacciones	16 mL

Una vez obtenido el inóculo R2 se llevó a cabo su aclimatación empleando el segundo método propuesto, el cual consistió en partir de cargas de sustrato en términos de DQO que fueran de menor a mayor concentración e inoculando un volumen en términos de sólidos sedimentables menor en comparación con la metodología planteada en el sistema R1 al inicio de la aclimatación, estableciendo un volumen de 16 mL para el inóculo y conservando las mismas condiciones del sistema R1 planteadas en la tabla 3.3 después de efectuar la primera carga del sustrato de casi 500 mg/L de DQO con el objetivo de comparar los dos sistemas bajo las mismas condiciones a partir de los datos que se reportaron para el acondicionamiento del primer método.

Durante el periodo que se considero como final para la evaluación del desempeño de los reactores para poder llevar a cabo el estudio de la cinética de los sistemas, se presento una desestabilización en ambos reactores, con lo cual se tuvo que recurrir a un nuevo reacondicionamiento contemplando las posibles causas que los llevaron a la desestabilización.

De esta forma en base a los resultados observados por parte de los dos métodos propuestos, se opto por llevar a cabo una combinación de los mismos con el objeto de acelerar su reacondicionamiento y estabilización, de este modo para ambos sistemas se efectuó un proceso de filtración a través de un papel filtro de



poro medio que permitiese el paso de las bacterias desarrolladas en los sistemas ya acondicionados, y como se efectuó el aislamiento de los microorganismos durante esta etapa preliminar de adaptación, se llevaron a cabo subsecuentes inoculaciones de las bacterias aisladas en ambos sistemas para poder promover la adaptación y proliferación de la biomasa, dicho reacondicionamiento se efectuó durante el mes de marzo, en donde se mantuvo inicialmente una cantidad de sustrato suministrada de aproximadamente 700 mg DQO/L y fijando la cantidad de las soluciones nutritivas de 10, 3 y 3 mL para A, B y C, y manteniendo variable la cantidad de microorganismos inoculados, de tal manera que el período de evaluación del sistema termino por concluir en el mes de Mayo, una vez que es observada una tendencia constante.

Cabe mencionar, que durante la evaluación de los sistemas reaccionantes, se efectuaron subsecuentes ciclos de purga de lodos, mismos que al momento de ser introducidos de nuevo al sistema reaccionante en cuestión se inocularon en términos de lodos sedimentados debido a la practicidad de obtener un control poblacional sustituyendo al método de SSV como parámetro para la determinación del incremento de la biomasa.

### **3.4 Cinéticas de degradación de aminas gastadas.**

Una vez observado el desempeño de los sistemas, se establecieron las condiciones a las cuales se evaluaría el comportamiento cinético de los mismos considerando: el efecto de la cantidad de sustrato inicial suministrado, el efecto de la concentración del inoculo y la conversión de nitrógeno que llevan a cabo las bacterias, con lo cual se evaluaron los parámetros de pH, DQO, COD,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ , N-NH<sub>3</sub>, SST y SSV.

Para apreciar el efecto de la concentración del inoculo se llevaron a cabo dos cinéticas comparativas implementando dos sistemas reaccionantes. El primer sistema se inoculo con 30 mL de lodos sedimentados y una carga inicial de



---

sustrato aproximada de 500 mg/L en términos de DQO, mientras que para el segundo sistema se inocularon 60 mL de lodos sedimentados manteniendo la misma carga de sustrato dando un tiempo de residencia de 24 hrs y 10 hrs respectivamente tomando en consideración la concentración del inóculo.

Para la evaluación del efecto de la cantidad de sustrato se estableció una tercer condición cinética en la cual se suministró una carga de DQO de aproximadamente 1500 mg/L y manteniendo la concentración del inóculo inicial de 60 mL.

Con la finalidad de corroborar que la conversión de nitrógeno no fuera afectada por la aireación del sistema, se realizó un blanco bajo las mismas condiciones de reacción evaluándolo durante un periodo de 6 hrs.



## CAPÍTULO 4.

### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

En este capítulo se muestran los resultados experimentales obtenidos para cada una de las partes que conformaron la metodología planteada en este trabajo de tesis, además de llevar a cabo el análisis de los datos obtenidos.

#### 4.1 Caracterización de las aminas gastadas.

Los resultados obtenidos para la caracterización de la amina gastada obtenida de la refinería “Ing. Antonio M. Amor” ubicada en Salamanca Guanajuato se muestran en la tabla 4.1. Los valores reportados son el promedio resultante para cada uno de los análisis llevados a cabo.

**Tabla 4.1** Caracterización de la amina gastada.

Parámetro	Valor	Unidades	Referencia
Sólidos suspendidos totales (SST)	6711	mg/L	NMX-AA-034-SCFI-2001
Sólidos suspendidos volátiles (SSV)	6703	mg/L	NMX-AA-034-SCFI-2001
Demanda química de oxígeno (DQO)	426855	mg/L	NMX-AA-030-SCFI-2001
Carbono orgánico disuelto (COD)	130933	mg/L	APHA-AWWA-WPCF (5310)
Nitratos ( $\text{NO}_3^-$ )	2755	mg/L	APHA-AWWA-WPCF (4500-N)
Nitritos ( $\text{NO}_2^-$ )	No detectable	mg/L	NMX-AA-099-SCFI-2006 APHA-AWWA-WPCF (4500-N)
Nitrógeno amoniacal ( $\text{N-NH}_3$ )	414.9	mg/L	NMX-AA-026-SCFI-2001 APHA-AWWA-WPCF (4500-N)
Nitrógeno orgánico ( $\text{N-N}_{\text{org}}$ )	30514.5	mg/L	NMX-AA-026-SCFI-2001 APHA-AWWA-WPCF (4500-N)
Nitrógeno total Kjeldahl ( $\text{N-N}_{\text{tk}}$ )	30929.4	mg/L	NMX-AA-026-SCFI-2001 APHA-AWWA-WPCF (4500-N)
Turbidez	151.67	NTU	NMX-AA-038-SCFI-2001
pH	9.16	-----	ASTM-D-1293-99 (2005)
Sulfuros	No detectable	%	ASTM UOP 209-00

Tal y como se observa en la tabla 4.1 la concentración de los parámetros de DQO, COD,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{N-NH}_3$  y  $\text{N-N}_{\text{org}}$  son muy altos, razón por la cual se consideró en



primera instancia la necesidad de efectuar diluciones para poder trabajar de manera adecuada, además de resaltar el hecho de que la selección de un tratamiento biológico se consideraría como una alternativa de tratamiento secundario o inclusive terciario, debido a la alta cantidad de materia orgánica presente en este tipo de residuos.

Por otro lado se observa que la concentración de sulfuros se reportó como no detectable aún cuando la sensibilidad de la metodología implementada permite cuantificar concentraciones de hasta 0.02%, de esta forma se atribuyo este resultado al estado en el cual se encontraba la muestra, mismo que corresponde a una descomposición térmica tal y como se muestra en las figuras 2.5 y 4.1, razón por la cual la amina gastada podría considerarse como tal considerando que la absorción del sulfuro de hidrógeno no podría ser adecuada a las condiciones que presenta por la formación de sales estables al calor.



**Figura 4.1** Condición de la amina gastada proveniente de la refinería “Ing. Antonio M. Amor” ubicada en Salamanca Guanajuato.

## 4.2 Caracterización de la biomasa.

Con el objeto de observar las posibles variaciones que pudiese presentar la biomasa a la adaptación de la amina, se llevaron a cabo las caracterizaciones biológicas al inicio y al término de la aclimatación, ya que se considero la posibilidad de perder especies que estaban presentes al momento de iniciar la aclimatación, además de poder tener variantes observables de acuerdo a los métodos microbiológicos que se plantearon para la identificación de éstas.

### 4.2.1 Identificación de la biomasa al inicio de la aclimatación.

Inicialmente se llevo a cabo la siembra madre de los microorganismos empleando los medios de cultivo seleccionados, realizando el método de estriado e incubando durante un periodo de 48 hrs a una temperatura de 35°C para permitir el crecimiento de la mayoría de las especies presentes en ambos consorcios, con lo cual se pudo observar un crecimiento como el que se muestra en la figura 4.2, mismo que permitiría llevar a cabo el aislamiento de las especies diferenciables.



**Figura 4.2** Cultivo de microorganismos para el aislamiento (1. Agar nutritivo, 2. Agar Infusión Cerebro Corazón, 3. Agar Cetrimida).

Como se observa en la figura 4.2 el crecimiento de las colonias se diferencia en cuanto a forma, tamaño de la colonia y coloración, de este modo en base a las observaciones llevadas a cabo en el desarrollo del crecimiento de las colonias en los tres medios de cultivo, se tomaron muestras de cada colonia que pudiese ser



diferenciable y que tuviera un grado de separación adecuado, llevando a cabo la reinoculación en el mismo medio de cultivo origen, con la finalidad de obtener los cultivos puros para cada una de las especies observadas. Cabe mencionar que tal y como se esperaba, en el medio cetrimida solo crecieron colonias únicas, corroborando la posible existencia de especies pertenecientes al género de las *Pseudomonas*, mismas que estuvieron presentes en ambos consorcios seleccionados ya que para ambos se observó un crecimiento característico, el cual fue puntiforme blanquecino con bordes definidos.

Debido a la necesidad de llevar a cabo la resiembra de los microorganismos, se implementó un sistema de numeración para identificar a cada una de las especies con la finalidad de facilitar su manipulación.

Una vez corroborada la obtención de los cultivos puros en base a un crecimiento único de colonias con las mismas características al ser sembradas consecutivamente, se llevaron a cabo las pruebas preliminares de identificación correspondientes a las tinciones de gram y respuesta a la producción de enzimas oxidasa, con lo cual se reportan los resultados obtenidos en la tabla 4.2.

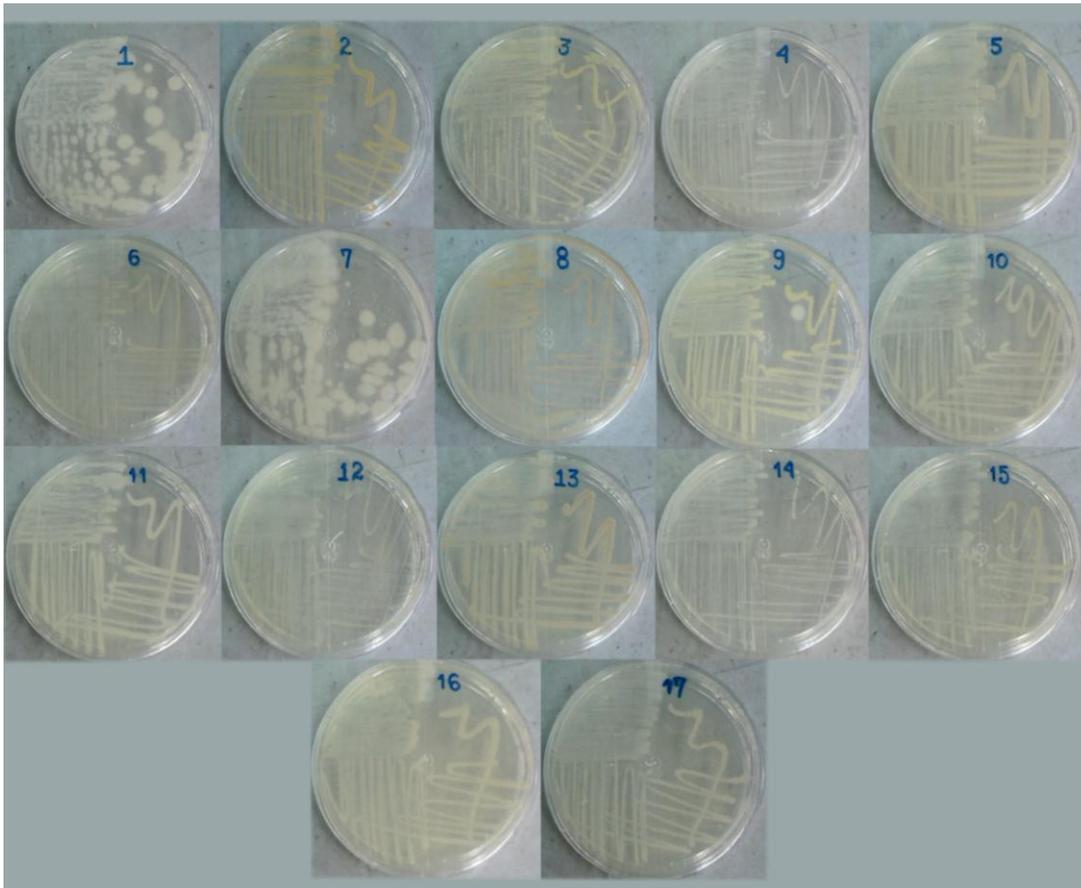
**Tabla 4.2** Resultados preliminares obtenidos a partir del aislamiento de las colonias.

No. ID.	Medio de aislamiento	Sistema de procedencia	Observaciones	Resultados de la tinción de Gram	Resultados de la prueba de oxidasa
1	Nutritivo	R1	Colonias puntiformes que crecen desarrollando una consistencia esponjosa y coloración blanca	-	+
2	Nutritivo	R1	Crece de manera puntiforme y desarrollan una coloración amarilla	-	+
3	Nutritivo	R1	Crece de forma oblicua en su conformación de borde y desarrollan una coloración amarilla	-	+



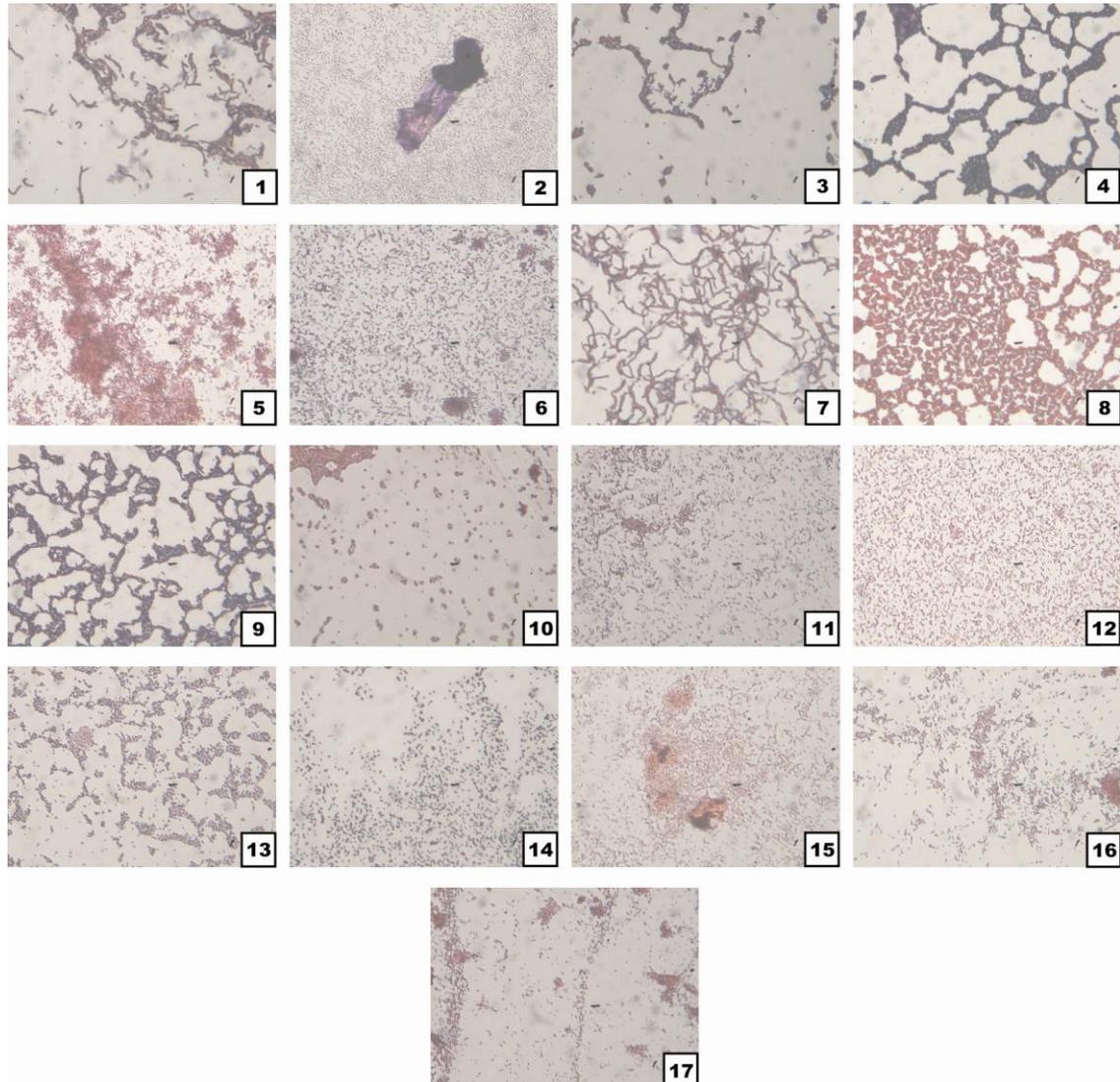
4	Nutritivo	R1	Crece de forma puntual desarrollando una coloración blanca y su proporción es pequeña	+	-
5	Nutritivo	R2	Crece con forma puntual desarrollando una coloración amarilla y sus bordes son amarillos	-	+
6	Nutritivo	R2	Crece de forma puntual presentando una coloración amarilla y siendo estas totalmente traslucidas	-	+
7	IBH	R1	Colonias puntiformes que crecen desarrollando una consistencia esponjosa y coloración blanca	-	+
8	IBH	R1	Crece de manera puntiforme y desarrollan una coloración amarilla	-	+
9	IBH	R1	Crece desarrollando una consistencia esponjosa y coloración amarilla	-	+
10	IBH	R1	Crece de forma puntual desarrollando una coloración blanca y su proporción es pequeña	-	+
11	IBH	R1	Son colonias puntiformes que crecen desarrollando una consistencia esponjosa y coloración blanca de proporción pequeña	-	+
12	IBH	R2	Crece con forma puntual desarrollando una coloración amarilla y sus bordes son amarillos	-	+
13	IBH	R2	Crece de forma puntual presentando una coloración amarilla y siendo estas totalmente traslucidas	-	+
14	IBH	R2	Crece de forma puntual, desarrollando una coloración blanca y siendo estas un tanto traslucidas	+	-
15	Cetrimida	R2	Desarrollan fluorescencia en el medio, son colonias traslucidas en toda su conformación y crecen en forma puntual	-	+
16	Cetrimida	R2	Desarrollan fluorescencia en el medio, son colonias traslucidas en sus bordes y crecen en forma puntual	-	+

17	Cetrimida	R1	Crecen de manera puntiforme, siendo estas pequeñas en tamaño y desarrollando una coloración blanca	-	+
----	-----------	----	--	---	---

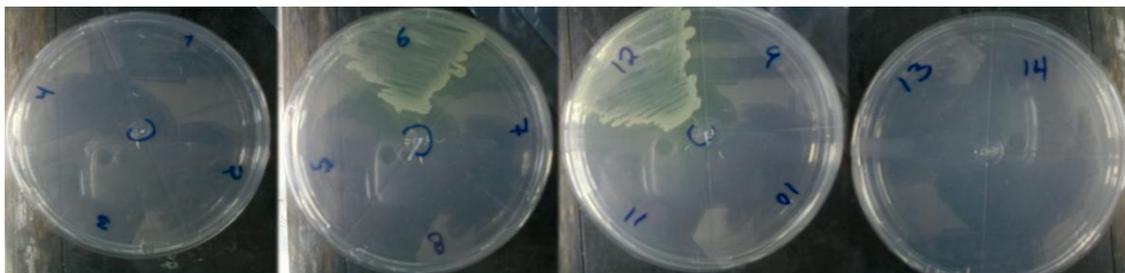


**Figura 4.3** Bacterias asiladas en medio de cultivo nutritivo.

En base a los resultados obtenidos en la tabla 4.2, se pudieron apreciar semejanzas en algunas colonias desarrolladas tanto en el medio nutritivo como en el medio de infusión cerebro corazón (figura 4.3), mismas que se corroboraron con las pruebas de oxidasa y las observaciones llevadas a cabo en el microscopio Olympus CH30 para las tinciones de gram a un coeficiente de aumento de 20X (figura 4.4) y corroborando a 100X, además de efectuar un cultivo de bacterias aisladas en el medio cetrimida con el objetivo de confirmar coincidencias entre las colonias desarrolladas en los medios no selectivos (figura 4.5) y de esta manera no llevar a cabo identificaciones redundantes para las pruebas bioquímicas.



**Figura 4.4** Resultados de la tinción de gram vistas al microscopio con un coeficiente de aumento de 20X.



**Figura 4.5** Cultivo de bacterias aisladas en el medio cetrimida a partir de los cultivos puros obtenidos en el medio nutritivo e infusión cerebro corazón.



Para llevar a cabo la identificación mediante el empleo de las pruebas bioquímicas RapID™ ONE ó NF Plus se tomó en cuenta los resultados a la prueba de producción de enzima oxidasa, y de esta forma se efectuó el procedimiento de acuerdo al fabricante partiendo del cultivo de las bacterias aisladas en medios nutritivos tal y como se muestra en la figura 4.3, con lo cual se obtuvieron los resultados reportados en la tabla 4.3.

**Tabla 4.3** Resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas.

No. ID.	Sistema	Prueba	Identificación	Probabilidad (contraindicaciones)	Nivel de aceptación
1/7	R1	NF Plus	<i>Alc. xylosoxidans</i> <i>Alc. faecalis</i> <i>Myroides odoratum</i>	98.71% (2) 1.08% (2) 0.21% (4)	Aceptable
2	R1	NF Plus	<i>Alc. faecalis</i>	>99.9% (2)	Cuestionable
3/9	R1	NF Plus	<i>Morax. osloensis</i> <i>Alc. faecalis</i>	89.24% (1) 10.74% (2)	Inadecuado
4	R1	ONE	<i>Moel. wisconsensis</i>	>99.9% (1)	Satisfactorio
5/13	R2	NF Plus	<i>N. weaveri</i> / <i>elongata</i>	>99.9% (0)	Implicito
6/12	R2	NF Plus	<i>Alc. faecalis</i> <i>Morax. nonliquefaciens</i> <i>Morax. osloensis</i> <i>Psychro. phenylpyruvicus</i>	94.42% (1) 3.62% (2) 1.79% (1) 0.14% (1)	Inadecuado
8	R1	NF Plus	<i>S. paucimobilis</i> <i>Alc. xylosoxidans</i>	93.53% (4) 6.47% (4)	Cuestionable
10	R1	NF Plus	<i>Brev. vesicularis</i> <i>Ps. stutzeri (Vb-1)</i>	98.17% (2) 1.83% (3)	Aceptable
11	R1	NF Plus	<i>Ochro. anthropi (Vd)</i> <i>Alc. xylosoxidans</i>	98.98% (2) 1.02% (3)	Aceptable
14	R2	ONE	<i>Acin. calcoaceticus</i>	>99.9% (1)	Aceptable
15	R2	NF Plus	<i>Alc. faecalis</i> <i>Morax. nonliquefaciens</i> <i>Morax. osloensis</i> <i>Psychro.</i>	94.42% (1) 3.62% (2) 1.79% (1) 0.14% (1)	Inadecuado



			<i>phenylpyruvicus</i>		
16	R2	NF Plus	<i>Alc. faecalis</i>	>99.9% (2)	Acceptable
17	R1	NF Plus	<i>Olig. urethralis</i> <i>Ps.</i> <i>pseudoalcaligenes</i> <i>Olig. ureolytica (IVe)</i>	99.42% (0) 0.29% (1) 0.17% (1)	Implícito

Como se muestra en la tabla 4.3, algunas de las pruebas bioquímicas llevadas a cabo tuvieron un nivel de aceptación inadecuado y cuestionable, lo cual pudo atribuirse a la existencia de errores al momento de inocular los paneles de prueba, sin embargo, también se reportaron resultados de identificación desde aceptables hasta implícitos, mismos que de acuerdo al método corresponden a las especies identificadas.

De acuerdo a los resultados obtenidos en las identificaciones con grado de aceptación adecuado, en el sistema R1 se encontraron especies pertenecientes a los géneros *Alcaligenes*, *Moellerella*, *Brevundimonas*, *Ochrobactrum* y *Oligella*, aunque se reportaron en segundo plano también especies pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* y *Myroides*, mientras que para el sistema R2 se encontraron especies correspondientes a los géneros *Neisseria*, *Acinetobacter* y *Alcaligenes*. De esta forma para ambos reactores se encontraron especies pertenecientes a géneros de los cuales se reportan especies con la capacidad de efectuar el proceso de desnitrificación (*Alcaligenes*, *Neisseria* y *Acinetobacter*), con lo cual se podría considerar dicho proceso en ambos sistemas, sin embargo, debido a que dentro de las especificaciones de las pruebas no se puede identificar especies de los géneros *Nitrosomonas*, *Nitrosospira*, *Nitrobacter* ó *Nitrospira*, no se corrobora ni mucho menos se descarta la posibilidad de encontrar este tipo de bacterias capaces de llevar a cabo el proceso de nitrificación.

Cabe mencionar que debido a contraindicaciones de la prueba no se reporto la existencia de especies pertenecientes al género de las *Pseudomonas* aún cuando



se efectuaron las pruebas a las especies cultivadas en el medio selectivo, mas no se descartan del todo ya que para el resultado de identificación obtenido para las bacterias con número de identificación 17 se reporto una contraindicación misma que descarto la presencia de estas lo cual pudo atribuirse en cierto modo al tipo de sustrato del cual provenían las bacterias y por ello se pudo originar un error que solo pudiese ser corroborado llevando a cabo una identificación basada en análisis de ADN.

#### 4.2.2 Identificación de la biomasa aclimatada.

Con la aclimatación de la biomasa realizada de manera satisfactoria, se procedió a la caracterización de la biomasa adaptada empleando el mismo procedimiento experimental citado anteriormente, para lo cual se obtuvieron los resultados mostrados en la tabla 4.4.

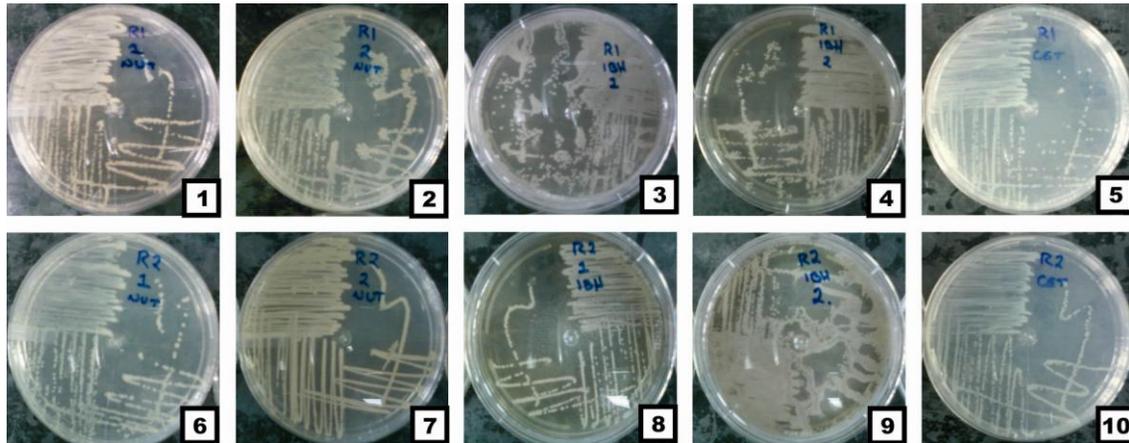
**Tabla 4.4** Resultados obtenidos del aislamiento de la biomasa adaptada.

No. ID.	Medio de aislamiento	Sistema de procedencia	Observaciones	Resultados de la tinción de Gram	Resultados de la prueba de oxidasa
1	Nutritivo	R1	Colonias puntiformes que crecen desarrollando una coloración amarilla	+	-
2	Nutritivo	R1	Crecen de manera puntiforme y desarrollan una coloración ligeramente amarilla	-	-
3	IBH	R1	Crecen de forma puntual y desarrollan una coloración amarilla un tanto opaca	-	-
4	IBH	R1	Crecen de forma puntual desarrollando una coloración amarillenta y su proporción es pequeña	-	-
5	Cetrimida	R1	Crecen de manera puntiforme, siendo estas pequeñas en tamaño y desarrollando una coloración blanca	-	+

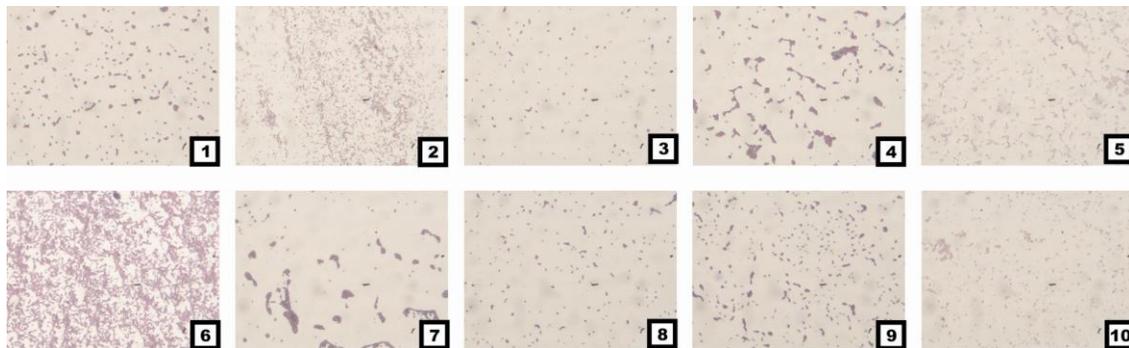


6	Nutritivo	R2	Crecen de forma puntual presentando una coloración ligeramente amarillenta	-	+
7	Nutritivo	R2	Colonias puntiformes que crecen desarrollando una coloración amarilla	-	-
8	IBH	R2	Crecen de manera puntiforme, siendo estas pequeñas en tamaño y desarrollando una coloración amarillenta	+	-
9	IBH	R2	Crecen de manera puntiforme desarrollando una coloración amarilla opaca	+	-
10	Cetrimida	R2	Crecen de forma puntual desarrollando una coloración blanca y su proporción es pequeña	-	+

De acuerdo a los resultados obtenidos en la tabla 4.4, para cada uno de los reactores se obtuvieron 5 tipos de colonias diferenciables, sin embargo, durante el aislamiento preliminar tal y como se observa en las figuras 4.6 y 4.7, las características morfológicas en cuanto a color, tamaño y forma de las colonias observadas fueron muy semejantes, así como también se presentaron analogías muy poco distinguibles para la tinción de gram, lo cual puede atribuirse a que los microorganismos ya adaptados a la amina pudieron desarrollar un metabolismo análogo, y de esta forma al momento de asimilar los sustratos provenientes de los medios empleados para su aislamiento dan como resultado una expresión fenotípica parecida.



**Figura 4.6** Aislamiento de bacterias aclimatadas.



**Figura 4.7** Tinción de gram de las bacterias aclimatadas vistas a un coeficiente de amplitud de 20X.

Por otro lado de acuerdo a los datos reportados en la tabla 4.5 para la identificación llevada a cabo se obtuvieron solo dos resultados aceptables, de los cuales el correspondiente al sistema R1 reporta como especies probables las pertenecientes a los géneros de *Salmonella*, *Acinetobacter* y *Shigella*, mientras que para el sistema R2 se reportaron especies pertenecientes a los géneros *Vibrio* y *Alcaligenes*, sin embargo, para las identificaciones que clasificaron como adecuadas no coincidieron los géneros encontrados al inicio de la aclimatación y mucho menos en las especies más probables reportadas, aun cuando se llevaron a cabo los mismos procedimientos y se efectuaron replicas de los mismos.



**Tabla 4.5** Resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas para la biomasa adaptada.

No. ID.	Sistema	Prueba	Identificación	Probabilidad (contraindicaciones)	Nivel de aceptación
1	R1	ONE	<i>Salmonella 1</i>	>99.9% (3)	Cuestionable
2	R1	ONE	<i>Salmonella pullorum</i> <i>Salmonella choleraesuis</i> <i>Salmonella 1</i>	52.23% (2) 36.04% (2) 11.65% (2)	Inadecuado
3	R1	ONE	<i>Salmonella 1</i>	>99.9% (3)	Cuestionable
4	R1	ONE	<i>Salmonella 1</i>	>99.9% (3)	Cuestionable
5	R1	ONE	<i>Salmonella choleraesuis</i> <i>Salmonella 1</i> <i>Acin. Calcoaceticus</i> <i>Shig. sonnei</i>	98.93% (2) 0.51% (3) 0.45% (3) 0.11% (4)	Adecuado
6	R2	NF Plus	<i>Ochro. anthropi (Vd)</i> <i>Ps. aeruginosa</i> <i>Shew. putrefaciens</i> <i>Alc. xylosoxidans</i>	84.66% (2) 13.09% (3) 2.01% (3) 0.23% (3)	Inadecuado
7	R2	NF Plus	<i>Alc. piechaudii</i> <i>Morax. lacunata</i> <i>Bord. bronchiseptica</i> <i>Alc. xylosoxidans</i>	63.10% (1) 34.40% (2) 0.31% (2) 0.10% (2)	Inadecuado
8	R2	ONE	<i>Salmonella 1</i>	>99.9% (3)	Cuestionable
9	R2	NF Plus	<i>Ps. oryzihabitans</i> <i>Burk. cepacia</i> <i>Acinetobacter</i>	64.64% (3) 34.52% (2) 0.85% (3)	Inadecuado
10	R2	NF Plus	<i>V. hollisae</i> <i>Alc. xylosoxidans</i>	99.08% (0) 0.83% (1)	Implícito

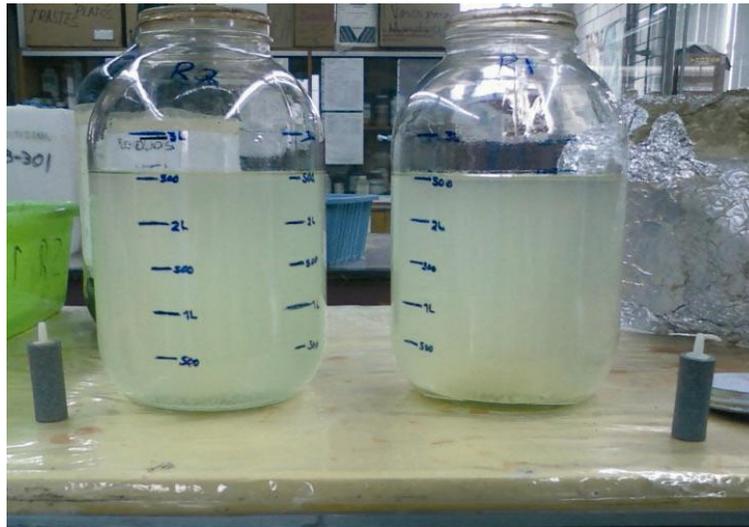
Las variaciones observadas en la identificación llevada a cabo con las pruebas bioquímicas también coinciden con los resultados reportados para la tinción de gram y la prueba de oxidasa, lo cual podría indicar que el efecto del sustrato (en este caso la amina) influye y es determinante para el empleo de este tipo de método de identificación, ya que como se menciono anteriormente también se observaron variaciones fenotípicas, las cuales influyeron experimentalmente ya



que la distinción entre las colonias formadas en los medios de cultivo eran muy semejantes en comparación con el aislamiento llevado a cabo al inicio del acondicionamiento de las bacterias en donde se observaron colonias totalmente distinguibles. Otro aspecto importante, es que en base a las observaciones llevadas a cabo, para el primer sistema se reportaron 8 especies probables de las cuales al concluir el periodo de aclimatación solo 5 subsistieron, mientras que para R2 se mantuvieron como probables el mismo número de especies, mismas que de acuerdo a las pruebas bioquímicas son especies diferentes, más sin embargo, se requeriría de un análisis más contundente para poder asegurar que tipo de especies se encuentran presentes en ambos sistemas, ya que de acuerdo a lo encontrado experimentalmente, el método empleado para la identificación se sensibiliza considerablemente a las variaciones de adaptación a sustratos específicos.

#### **4.3 Aclimatación de la biomasa.**

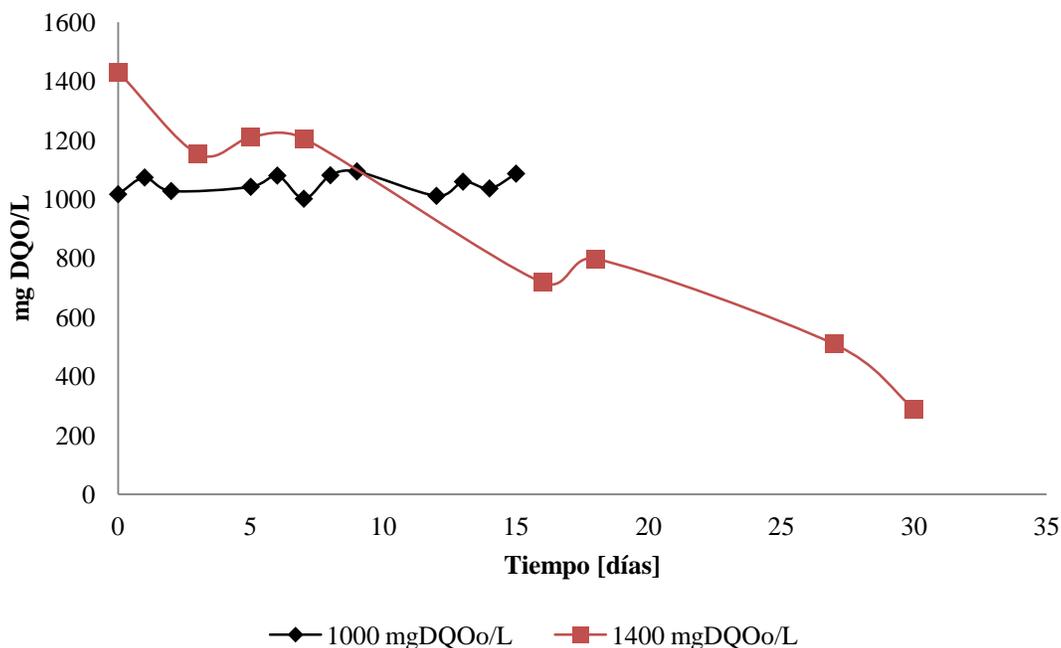
La aclimatación de la biomasa se llevo a cabo en reactores por lotes con capacidad de 4 L a los cuales se les suministro aire por medio de una bomba de pecera convencional empleando difusores como se muestra en la figura 4.8, en los cuales se realizaron las variaciones anteriormente descritas en el apartado correspondiente a la metodología experimental.



**Figura 4.8** Sistemas reaccionantes empleados para la aclimatación de la biomasa.

#### **4.3.1 Comportamiento de los parámetros de respuesta.**

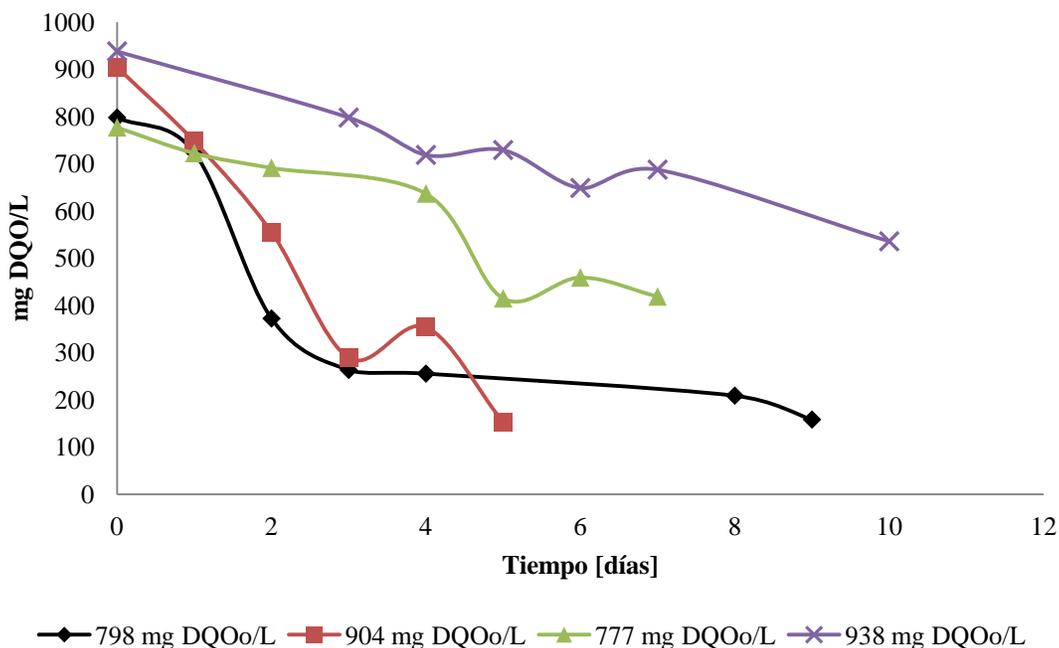
Para la primera etapa del trabajo experimental se realizó la aclimatación de la biomasa del sistema R1 empleando el método sugerido de bioaumentación, en donde se efectuaron variaciones en cuanto a la carga del inóculo, cantidad de sustrato inicial en términos de DQO y cantidad suministrada de nutrientes obteniendo el gráfico 4.1 en donde se observan los resultados al variar la carga inicial de sustrato de 1000 mg/L con una cantidad de lodos sedimentables inoculados de 500 mL y a partir de esta primer prueba se estableció la segunda prueba con 1400 mg/L inoculando una mezcla de lodos provenientes de la primer prueba al término de los 15 días y lodos del sistema R1 original en una proporción 1:1 de un volumen total de 60 mL de lodos sedimentados.



**Gráfico 4.1** Evaluación del sistema R1 con cargas iniciales de 1000 mg DQO/L y 1400 mg DQO/L.

Como se muestra en el gráfico 4.1 al inicio de la aclimatación para una carga inicial de 1000 mg/L de materia orgánica no hubo respuesta a la variación de DQO, mientras que para la segunda prueba llevada a cabo en un periodo de 30 días se logró disminuir la cantidad de sustrato suministrada al sistema consiguiendo hasta un 79.79% de remoción con una cantidad de inóculo menor en comparación con el primer sistema implementado, aunque cabe resaltar que para la segunda prueba llevada a cabo, el inóculo estaba compuesto por lodos provenientes del primer sistema con la finalidad de asemejar el efecto de la bioaumentación.

Tomando en consideración los resultados obtenidos en la evaluación de 30 días, se mantuvo el sistema R1 a las condiciones establecidas en la tabla 3.3, evaluando su comportamiento periódicamente obteniendo los resultados mostrados en el gráfico 4.2.



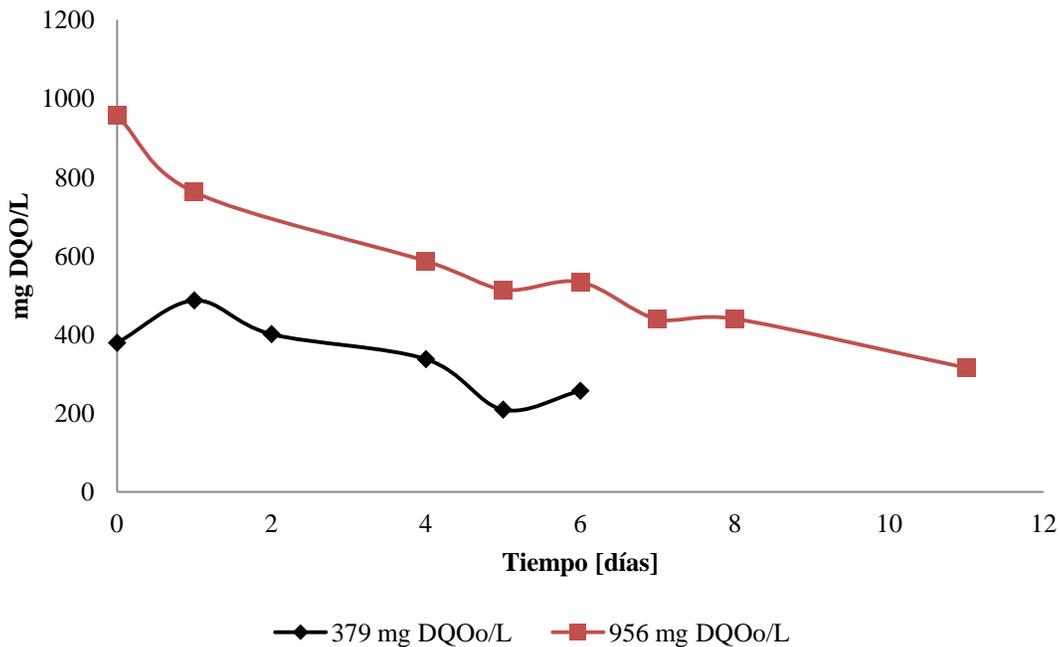
**Gráfico 4.2** Evaluación del sistema R1 en términos de la DQO.

El periodo de evaluación del sistema R1 que se reporta en el gráfico 4.2 comprende un tiempo de 4 meses, en los cuales se consideraron tiempos de residencia de 7 días y las cargas iniciales de DQO mostradas, tomando en cuenta que los valores de 798 y 904 mg DQO/L comprenden los primeros dos meses de evaluación en los cuales se obtuvieron valores finales de DQO de 158 y 153 mg/L respectivamente, mientras que los valores de 777 y 938 mg DQO/L son representativos de los últimos dos meses en donde la DQO final fue de 419 y 536 mg/L, de este modo fue posible apreciar que para el tiempo de residencia establecido de 7 días, al inicio de la aclimatación se lograron obtener remociones promedio de 81.64%, pero esta capacidad de remoción fue decayendo hasta obtener remociones promedio de 44.49%.

Para el sistema R2 la aclimatación se efectuó de manera paulatina suministrando una carga inicial de sustrato menor en comparación con el sistema R1 y manteniendo las condiciones establecidas en la tabla 3.3 para la adición de las



soluciones nutritivas y cantidad del inóculo, obteniendo de este modo los resultados observados en el gráfico 4.3.



**Gráfico 4.3** Acondicionamiento del sistema R2.

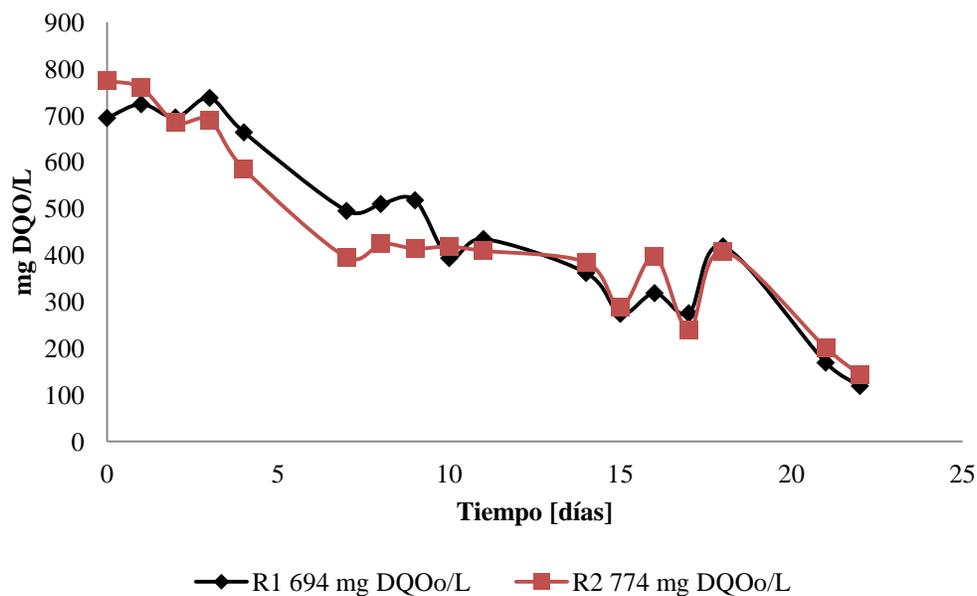
Como se observa en el gráfico 4.3 la adaptación del sistema R2 presento mejores resultados debido a que en muy poco tiempo la biomasa mostro una adaptación satisfactoria, además de que los tiempos de residencia que se establecieron fueron considerados a partir de R1 con la finalidad de llevar a cabo un comparativo, de este modo la remoción que se obtuvo al incrementar la cantidad de sustrato hasta ser comparativa con R1 fue de 67.04% en un tiempo de residencia de 11 días, cabe mencionar que durante la aclimatación de ambos sistemas se reportaron valores de pH que en promedio oscilaban entre los 7.5 y 8.0.

Durante la última etapa experimental se considero evaluar los sistemas al realizar un estudio del comportamiento cinético de los mismos, sin embargo, se presento una desestabilización ya que la remoción del sistema R1 disminuyo hasta un



26.59% y para R2 se obtuvo un 45.20% en un tiempo de residencia de 7 días, lo cual impidió el estudio cinético debido a que el comportamiento de los sistemas había cambiado drásticamente. Con estos resultados se consideró extender el tiempo hasta 22 días obteniendo así una remoción de 82.89% para R1 y 81.56% para R2.

Además de disminuir la remoción en términos de DQO, se observó que en ambos reactores la apariencia de los lodos cambio por completo, de modo que al colocar una muestra al microscopio se observó el crecimiento de organismos filamentosos, mismos que al ser vistos a una amplitud de 20X y 40X se corroboró que estos organismos eran algas, las cuales crecieron debido a que en proporción se tenía una gran cantidad de compuestos nitrogenados mismos que sumados al efecto del contacto con la luz solar propiciaron las condiciones adecuadas para que estas se desarrollaran.



**Gráfico 4.4** Comportamiento de los reactores durante la desestabilización.

Debido a que el rendimiento en la remoción del sustrato bajo considerablemente sumado al crecimiento de algas, se optó por reacondicionar los sistemas

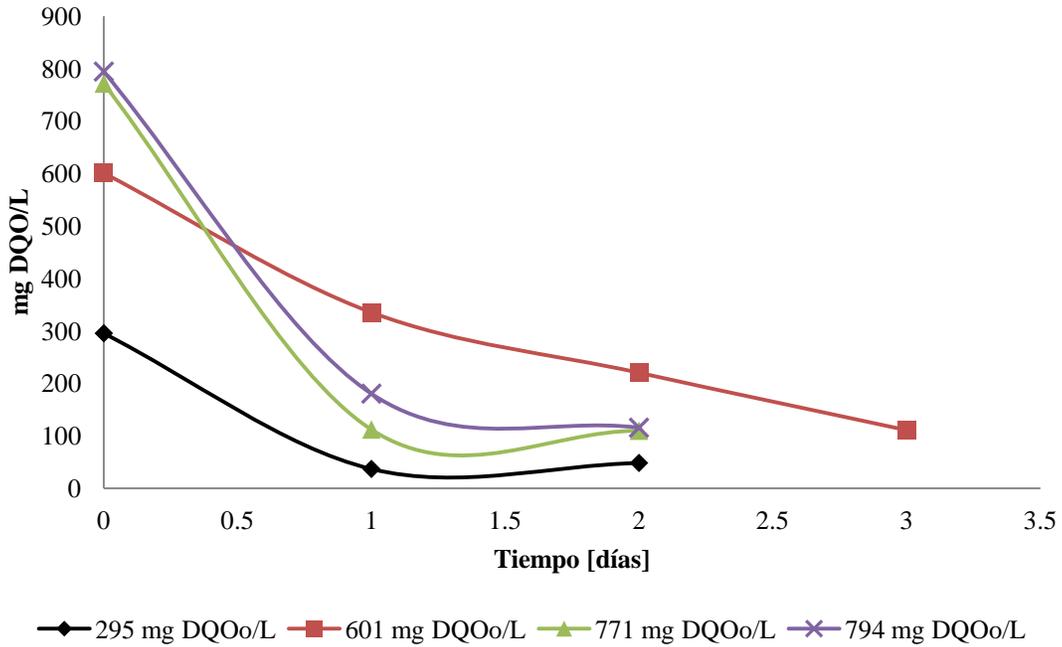


empleando una filtración en combinación con una reinoculación a partir de las bacterias aisladas mostradas en la figura 4.3, además de aislar los reactores como se muestra en la figura 4.9 con el objeto de inhibir el crecimiento de algas. De esta forma la aclimatación se monitorea variando la cantidad inicial de sustrato partiendo de bajas concentraciones debido a que la adaptación de la biomasa se ve favorecida al llevar a cabo este tipo de aclimatación.

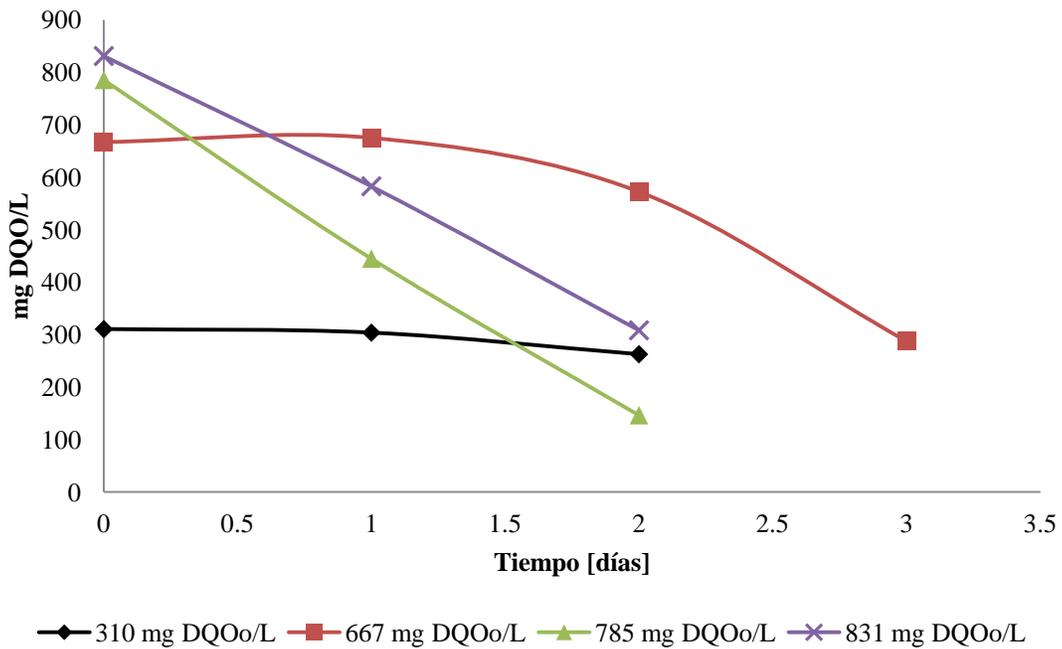


**Figura 4.9** Modificación de los sistemas reaccionantes.

En los gráficos 4.5 y 4.6 se observa el comportamiento de los sistemas al ser reacondicionados, en los cuales se pudieron obtener remociones que en promedio se asemejaron a los resultados obtenidos antes de la desestabilización. De esta forma la remoción promedio que se obtuvo para el sistema R1 fue de 84.13%, mientras que para R2 la remoción promedio se mantuvo en un 54.15%, sin embargo, el tiempo de residencia disminuyó de 7 a 3 días además de mantenerse un pH promedio de 8.08 y 8.22 para R1 y R2 respectivamente, de modo que al inicio del reacondicionamiento se logró observar que el efecto de la bioaumentación a partir de las bacterias aisladas tuvo un impacto positivo ya que el tiempo de residencia al cual se obtiene una remoción aceptable disminuyó considerablemente.



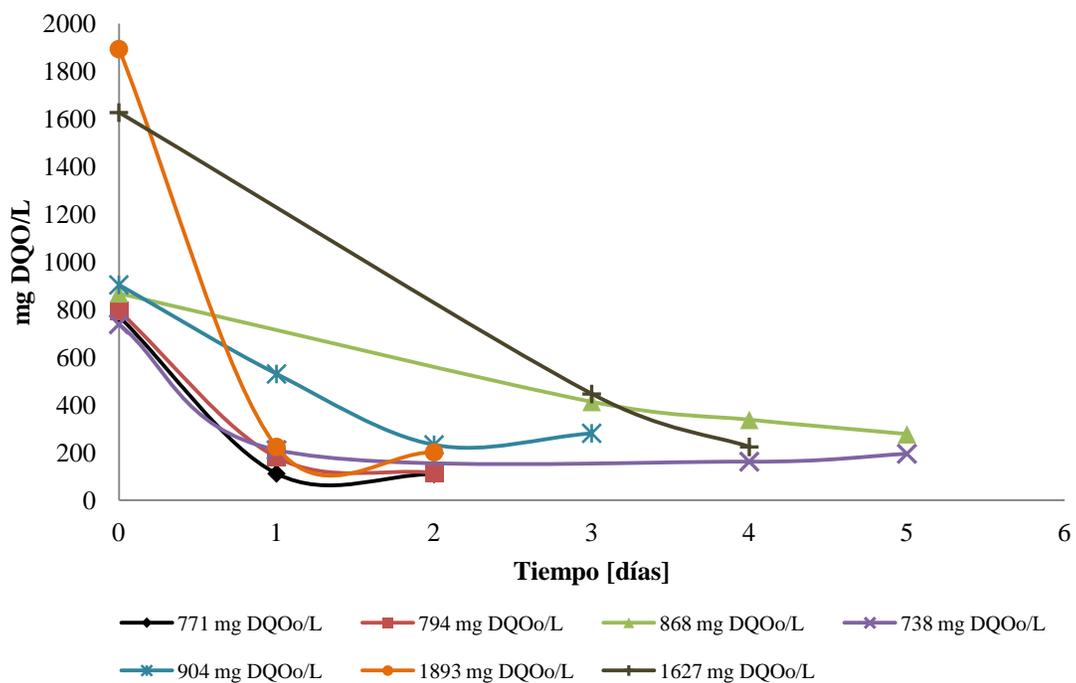
**Gráfico 4.5** Resultados obtenidos para el reacondicionamiento del sistema R1.



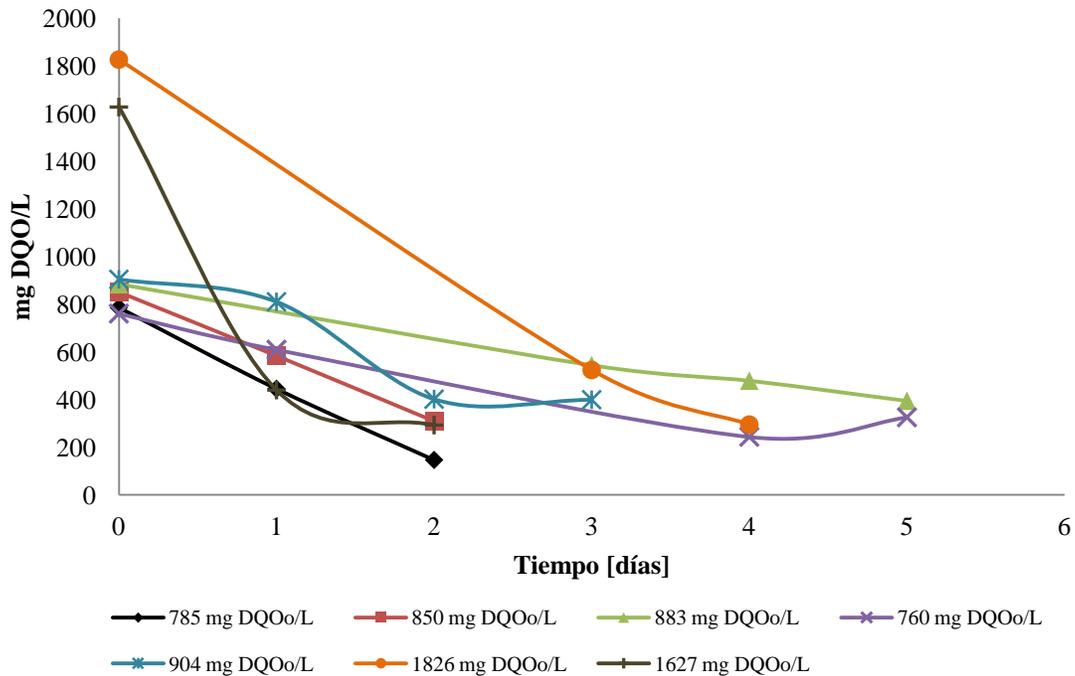
**Gráfico 4.6** Resultados obtenidos para el reacondicionamiento del sistema R2.



Una vez reacondicionados los sistemas, se procedió a evaluar el comportamiento de los reactores para poder corroborar la estabilidad de los mismos y posteriormente llevar a cabo el análisis del comportamiento cinético característico, el resultado de dicha evaluación se observa en los gráficos 4.7 y 4.8 estableciendo diferentes cargas de materia orgánica representada como DQO.



**Gráfico 4.7** Resultados de la evaluación del sistema R1 después de reacondicionar el sistema.



**Gráfico 4.8** Resultados de la evaluación del sistema R2 después de reacondicionar el sistema.

Como puede apreciarse en los gráficos anteriores cada ciclo se establece a partir de la adición de sustrato indicada, de tal forma que ambos sistemas se estabilizaron en poco tiempo ya que la tendencia observada se mantuvo en cada uno de los ciclos señalados, con lo cual el porcentaje promedio de remoción obtenido fue de 79.63% para R1 y 68.50% para R2 con valores de pH promedio de 8.46 y 8.38 respectivamente, sin embargo, como se observa en cada uno de los gráficos respectivos, para cada sistema se efectuaron pruebas con un incremento considerable de la cantidad de sustrato en donde se obtuvieron remociones de casi un 85% en ambos sistemas a tiempos de residencia menores que los reportados antes de efectuar el procedimiento de estabilización propuesto.



#### 4.3.2 Criterio de selección de las condiciones de adaptación adecuadas.

De acuerdo a los datos reportados durante el desarrollo de la aclimatación y las variantes que se llevaron a cabo, se pudieron obtener las mejores condiciones a las cuales los sistemas se mantuvieron estables en función de la cantidad de nutrientes, volumen reaccionante y cantidad de inoculo suministrado, mismas que se reportan en la tabla 4.6.

**Tabla 4.6** Condiciones de aclimatación establecidas para los sistemas reaccionantes.

Volumen Reaccionante	2.5 L
Solución A	10 mL
Solución B	3 mL
Solución C	3 mL
Carga de sustrato promedio en términos de DQO	800 mg/L
Cantidad de inoculo adicionado al inicio de las reacciones	30 mL

Como se menciona en el apartado 3.3 correspondiente a la metodología experimental, la cantidad del inoculo adicionado fue tomada en términos del lodo volumétrico sedimentado debido a que este parámetro se obtiene de manera directa, lo cual también resulta ser conveniente considerando sistemas intermitentes en los cuales la purga de lodos se establece periódicamente en función del rendimiento de la biomasa, el cual de acuerdo a lo encontrado experimentalmente se corrobora ya que el rendimiento de la asimilación del sustrato disminuye considerablemente.

Cabe mencionar que la selección de la cantidad de nutrientes se estableció inicialmente a partir de lo reportado en trabajos anteriores, sin embargo, cuando se presento la desestabilización de los sistemas se considero bajar la cantidad



adicionada de la solución A debido a que el pH de las aminas imperaba mayoritariamente en los sistemas reaccionantes aún cuando se efectuaban diluciones, de manera que se consideró que el buffer de fosfatos podía reducirse debido a esta elevación del pH, de esta forma también se atribuyó este déficit de nutrientes a las causas de la desestabilización del sistema, y de acuerdo a las variaciones llevadas a cabo durante la experimentación se decidió mantener la proporción citada en la tabla 4.6.

#### **4.4 Cinéticas de degradación de las aminas gastadas.**

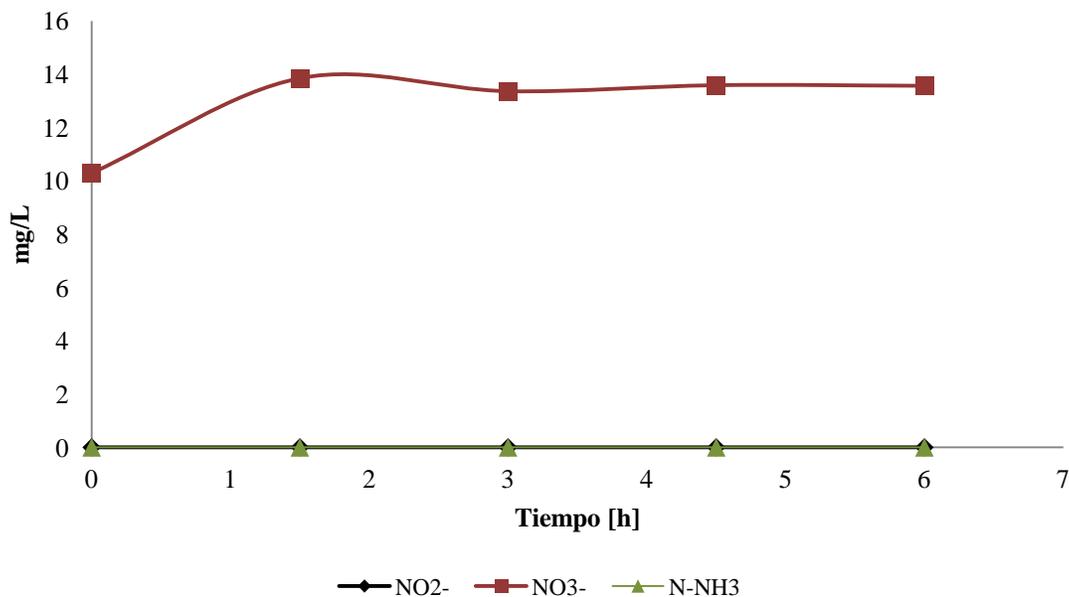
Una vez establecidas las condiciones de adaptación en los sistemas biológicos y en base a los resultados obtenidos durante la aclimatación de la biomasa se procedió a evaluar el comportamiento cinético de los mismos, de esta forma se fijo un volumen reaccionante de 3 L suministrando nutrientes de acuerdo a las proporciones de la tabla 4.6 y considerando un tiempo de residencia de 24 hrs en el cual se tomaron muestras cada 1.5 horas ya que de acuerdo a la evaluación durante la última etapa de la aclimatación el sustrato en términos de la DQO para ambos sistemas se asimilaba en 2 días aparentemente, sin embargo para la cinética planteada de 1500 mg DQO/L se decidió incrementar el tiempo de residencia a 32 hrs considerándolo un rango de tiempo adecuado para la asimilación del sustrato.

##### **4.4.1 Análisis comparativo de los consorcios.**

De acuerdo al planteamiento de las variaciones establecidas para llevar a cabo las cinéticas, se obtuvieron los resultados que a continuación se muestran considerando en primer instancia el efecto que tiene la carga inicial de materia orgánica medida en términos de la DQO y el COD y la cantidad de biomasa inoculada, y en segunda instancia las conversiones que se llevan a cabo para el nitrógeno.



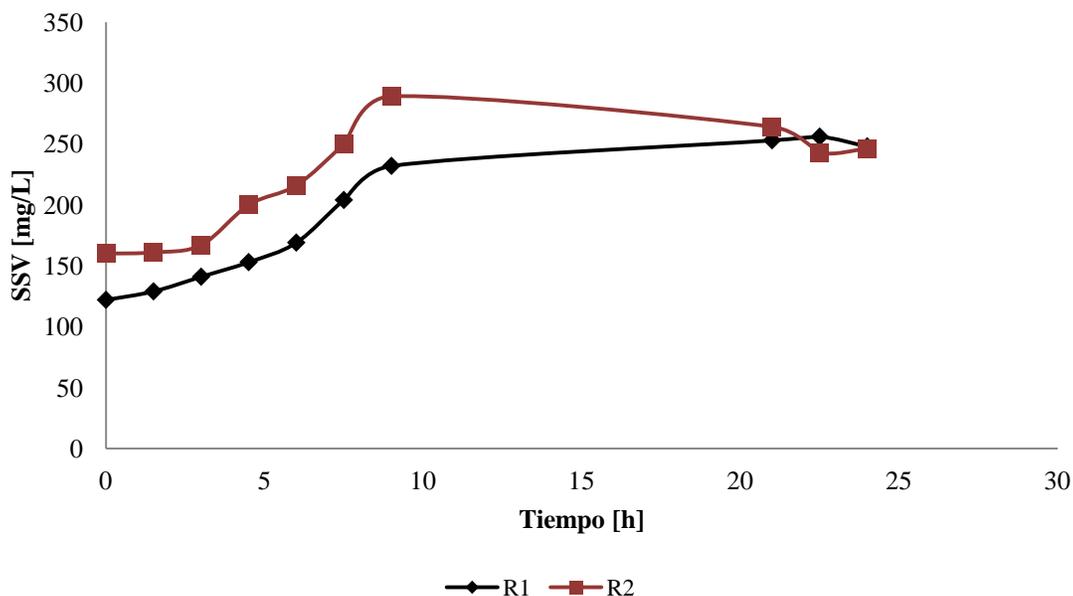
Cabe señalar que para el estudio de la conversión de nitrógeno que se lleva a cabo en ambos sistemas se efectuó el análisis de un blanco no inoculado, con el objeto de corroborar que las conversiones se originan por acción de los microorganismos, y no se ven afectadas por la aireación de los sistemas, de esta forma la evaluación llevada a cabo reportó los resultados que se observan en el gráfico 4.9, mismos que confirman que la variación de nitritos, nitratos y nitrógeno amoniacal no se ve afectada al suministrar aire a los sistemas.



**Gráfico 4.9** Comportamiento de las especies nitrogenadas en ausencia del inóculo.

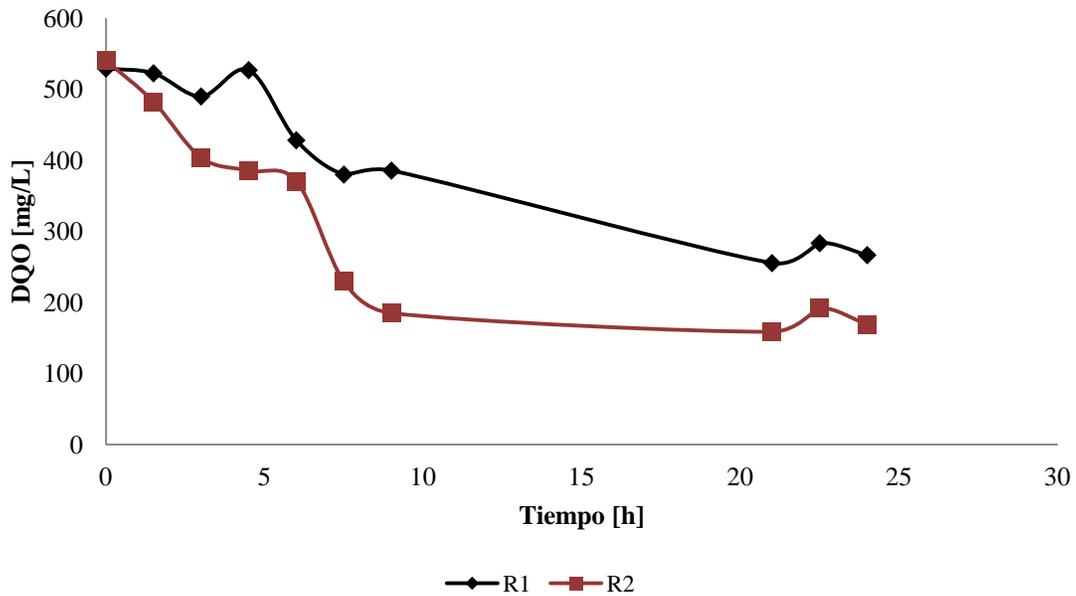
❖ Cinéticas con 30 mL de lodo inoculado y 500 mg DQO<sub>0</sub>/L.

La primer condición cinética establecida se llevó a cabo en un tiempo de residencia de 24 hrs reportando para la evaluación del crecimiento bacteriano los resultados que se muestran en el gráfico 4.10, en el cual se aprecia que al transcurrir 10 hrs de reacción se obtiene el máximo crecimiento para ambos sistemas, destacando que para el sistema R2 la producción de biomasa es mayor en comparación con la del sistema R1.

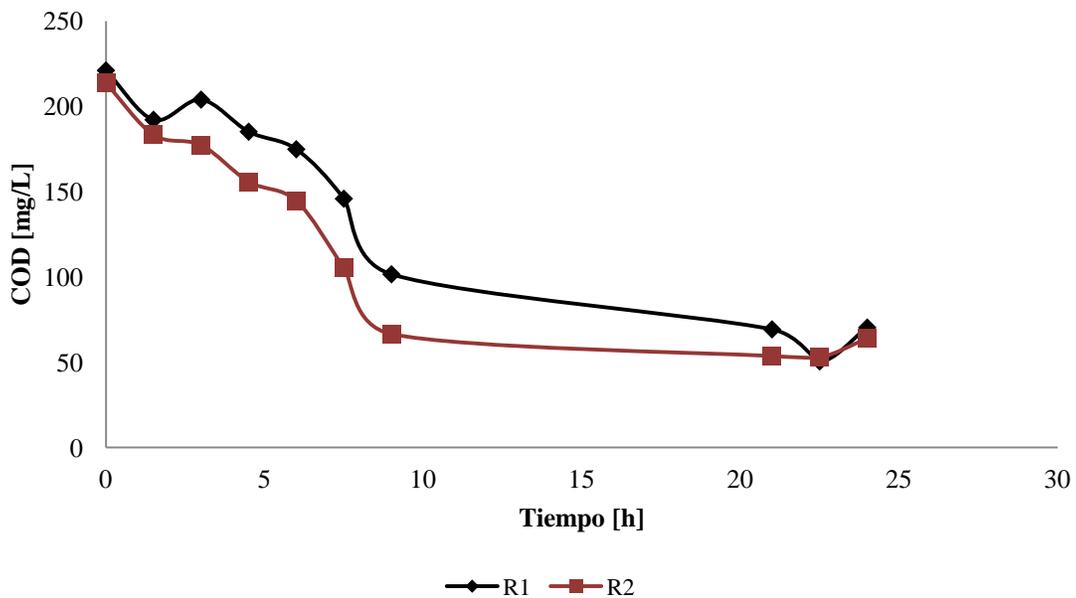


**Gráfico 4.10** Resultados obtenidos de SSV con 30 mL de lodos y 500 mg DQO/L.

Los resultados obtenidos para los parámetros de DQO y COD se muestran en los gráficos 4.11 y 4.12 respectivamente, en los cuales se observa que la degradación a su máxima tasa de utilización aparentemente se lleva a cabo en aproximadamente 10 hrs de reacción, concordando con la cantidad máxima de biomasa sintetizada de acuerdo al gráfico 4.10 para ambos sistemas, obteniendo remociones de 49.63% de DQO y 68.20% de COD para R1, mientras que para R2 se obtuvieron remociones de 68.74% y 70.09% considerando las 24 hrs de reacción establecidas, sin embargo, tal y como se mencionó anteriormente al transcurrir 10 hrs de reacción la variación para ambos parámetros muestra una tendencia continua misma que podría situarse entre la fase estacionaria y la fase de muerte de acuerdo a la tendencia del gráfico del crecimiento bacteriano en términos de SSV que se muestra en el gráfico 4.10.



**Gráfico 4.11** Resultados obtenidos de DQO con 30 mL de lodos y 500 mg DQO/L.



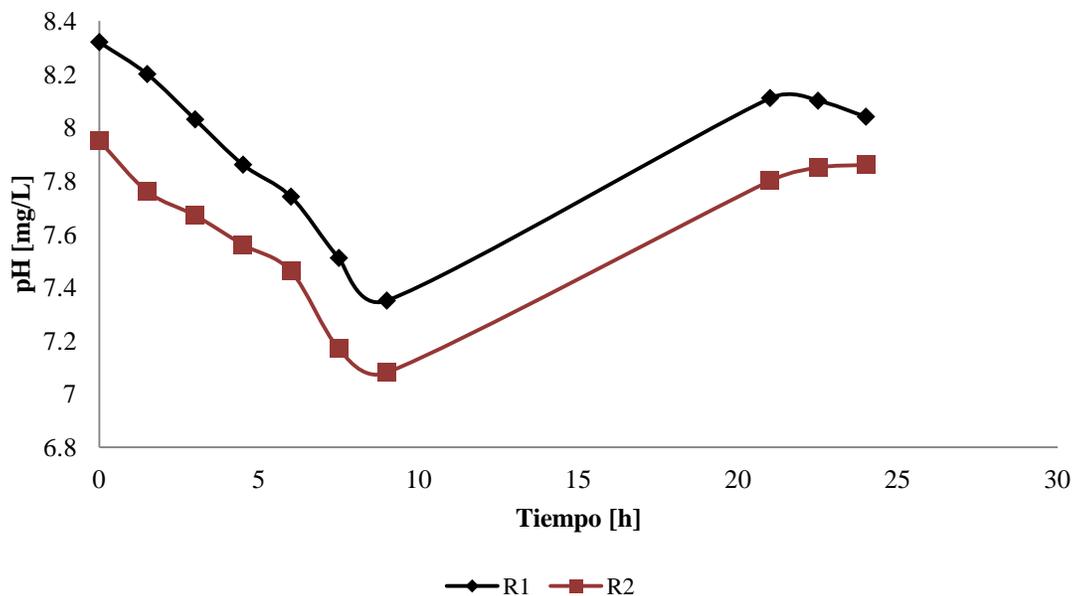
**Gráfico 4.12** Resultados obtenidos de COD con 30 mL de lodos y 500 mg DQO/L.

Para la conversión de nitrógeno se obtuvieron los resultados reportados en los gráficos 4.14, 4.15 y 4.16 los cuales de acuerdo a la tendencia observada, comienzan a variar al transcurrir 10 hrs de reacción, de esta forma la primer

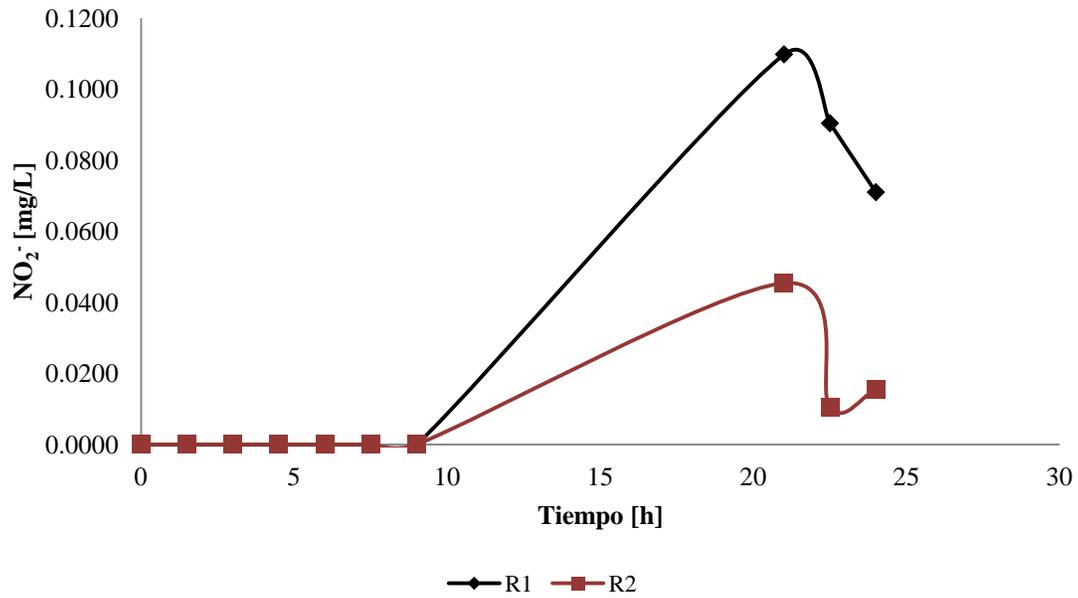


información que nos brindan es que al ser asimilada la materia orgánica comienza a presentarse una conversión apreciable.

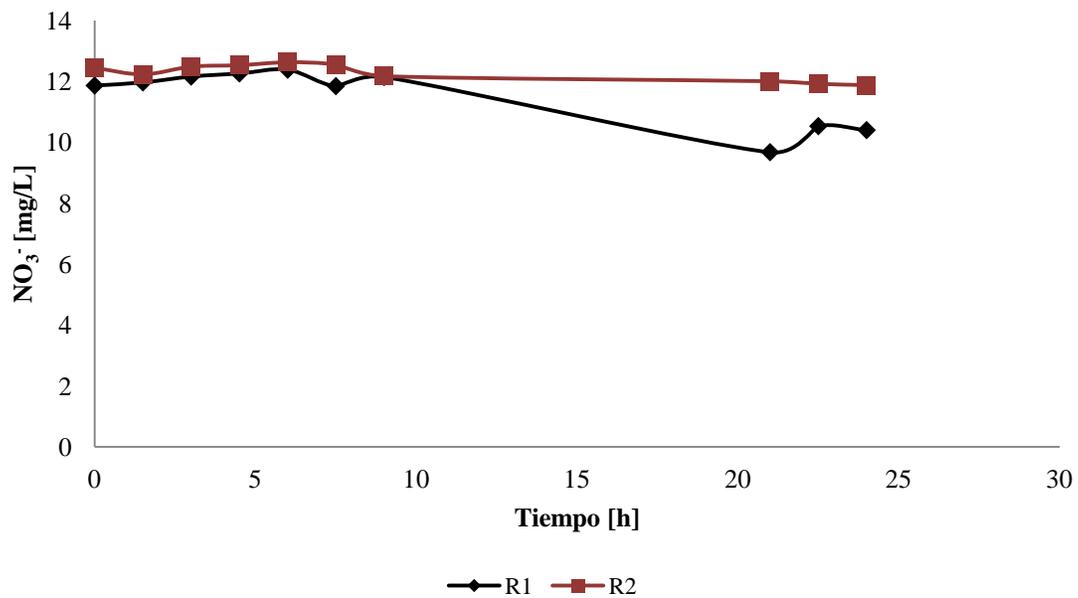
Por otro lado como se observa en el gráfico 4.13 la tendencia del pH se asemeja a la observada para la asimilación de DQO y COD, de tal forma que disminuye y posteriormente se vuelve a estabilizar, dicho efecto puede atribuirse a las conversiones que se establecen durante la asimilación de la materia orgánica presente en el sistema, en el cual se suscita una conversión en equilibrio de las especies  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NH}_3$  al momento de que las bacterias asimilan el sustrato provisto ya que de acuerdo al gráfico 4.16, la presencia de nitrógeno amoniacal comienza a elevarse entre las 5 y 10 hrs de reacción, mientras que para la conversión de nitratos y nitritos comienza a presentarse al momento de consumirse la materia orgánica en términos de DQO y COD, de esta forma para llevar a cabo el proceso de nitrificación se tendría que extender el tiempo de residencia.



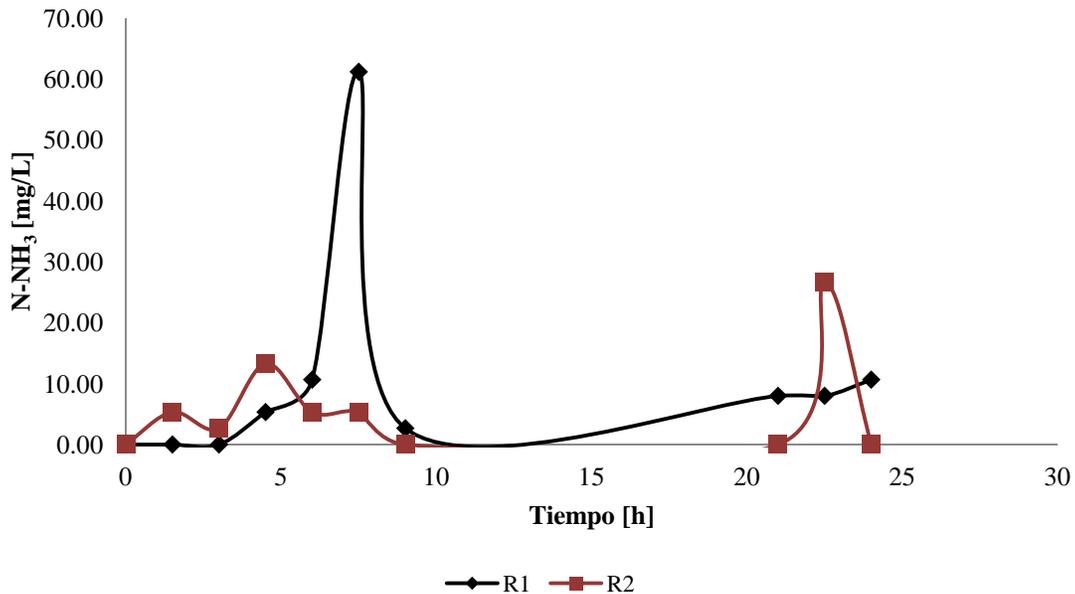
**Gráfico 4.13** Resultados obtenidos de pH con 30 mL de lodos y 500 mg DQO/L.



**Gráfico 4.14** Resultados obtenidos de  $\text{NO}_2^-$  con 30 mL de lodos y 500 mg DQO/L.



**Gráfico 4.15** Resultados obtenidos de  $\text{NO}_3^-$  con 30 mL de lodos y 500 mg DQO/L.



**Gráfico 4.16** Resultados obtenidos de N-NH<sub>3</sub> con 30 mL de lodos y 500 mg DQO/L.

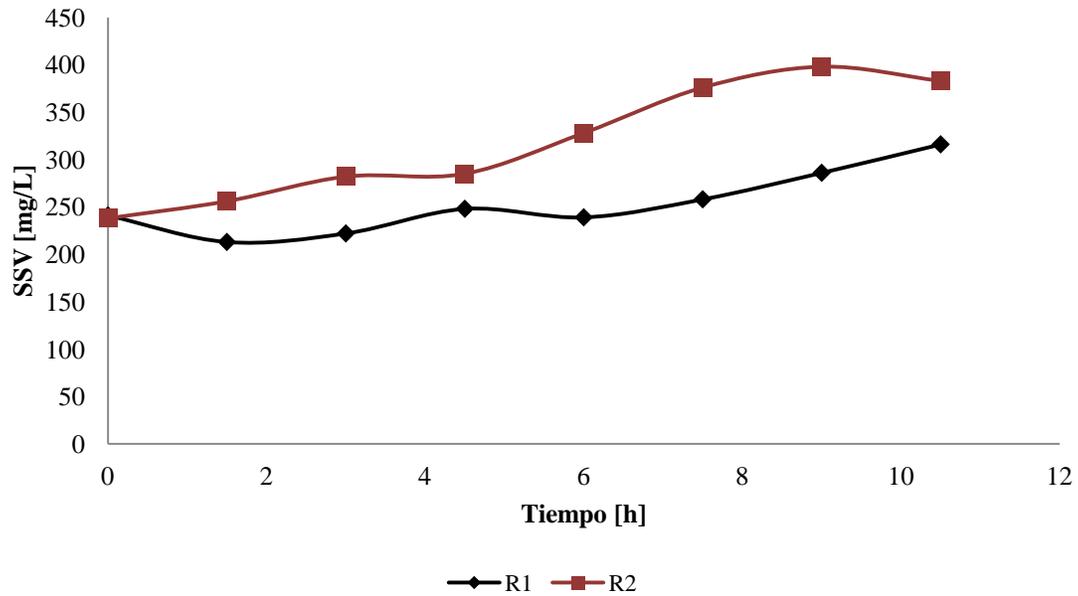
❖ Cinéticas con 60 mL de lodo inoculado y 500 mg DQO<sub>0</sub>/L.

Se estableció un tiempo de residencia de 10 hrs para la segunda condición cinética, tomando en cuenta los resultados obtenidos para la primer condición, considerando que al incrementar la cantidad de lodo inoculado la asimilación de la materia orgánica en términos de la DQO y el COD se llevaría a cabo en un tiempo de residencia menor.

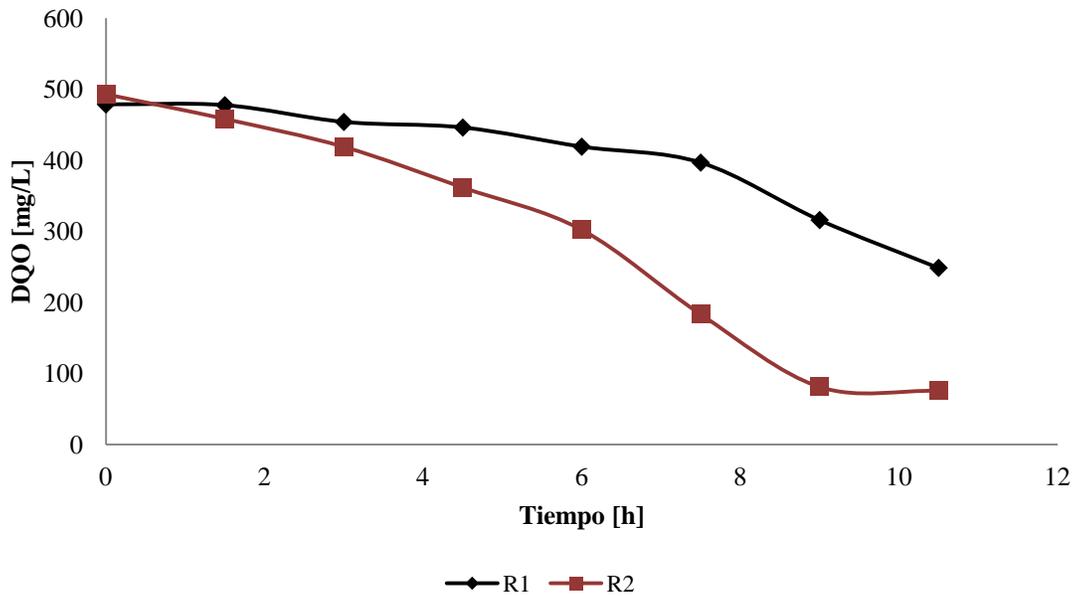
Para la evaluación del crecimiento se reportaron los resultados mostrados en el gráfico 4.17, en donde se puede apreciar que en la curva no se observan las fases de inactividad que se apreciaron en el gráfico 4.10, con lo cual las tendencias observadas para los gráficos 4.18 y 4.19 se aproximaron a la linealidad, obteniendo remociones de DQO y COD de 48.07% y 50.24% para R1, y para R2 se obtuvieron remociones de 84.65% y 88.04%, de manera que para el sistema R2 el efecto de la cantidad de inoculo inicial favoreció la remoción del sustrato



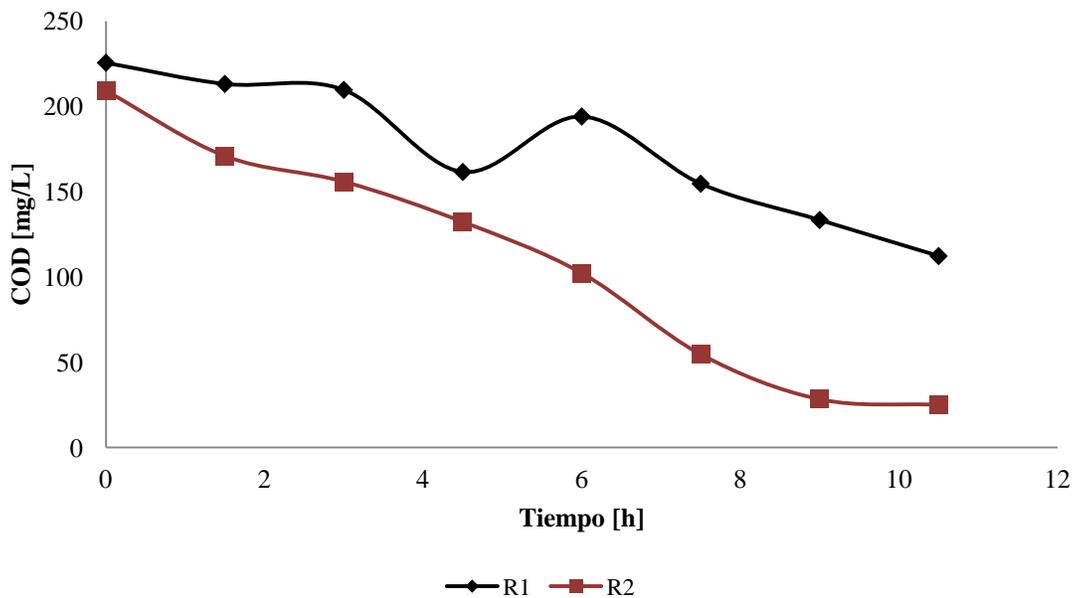
mientras que para R1 de acuerdo a los resultados obtenidos no repercute de manera significativa el incremento del inoculo debido a que para la primer condición cinética las remociones obtenidas de DQO y COD fueron de 49.63% y 68.20%.



**Gráfico 4.17** Resultados obtenidos de SSV con 60 mL de lodos y 500 mg DQO/L.



**Gráfico 4.18** Resultados obtenidos de DQO con 60 mL de lodos y 500 mg DQO/L.



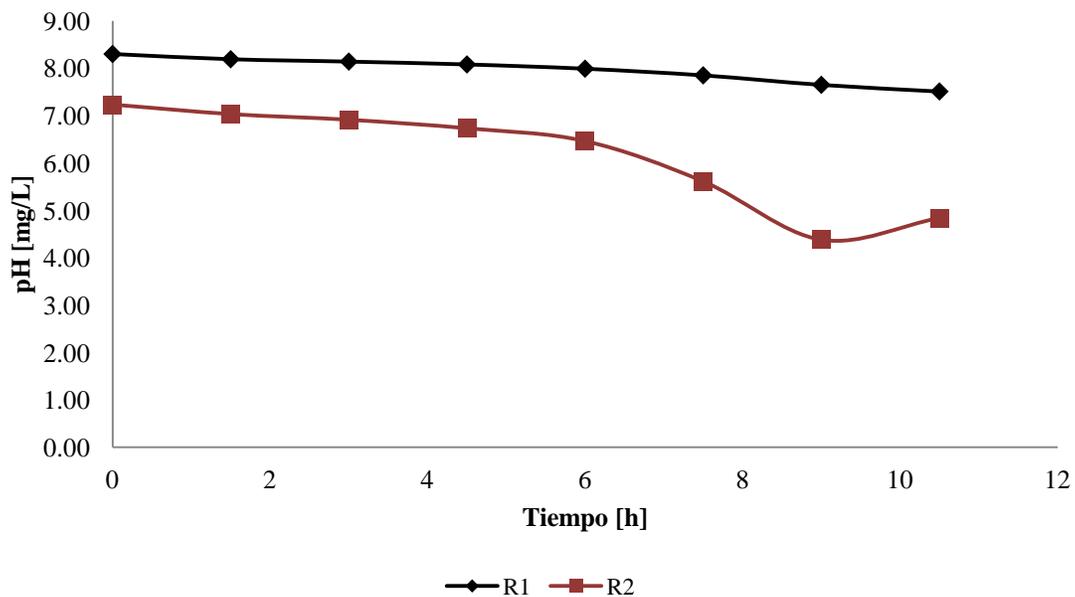
**Gráfico 4.19** Resultados obtenidos de COD con 60 mL de lodos y 500 mg DQO/L.

De acuerdo a los resultados reportados en el gráfico 4.20 y 4.23, la conversión del nitrógeno tiene impacto en la variación del pH debido a que cuando la presencia de nitrógeno amoniacal comienza a ser cuantificable el pH disminuye, aunque

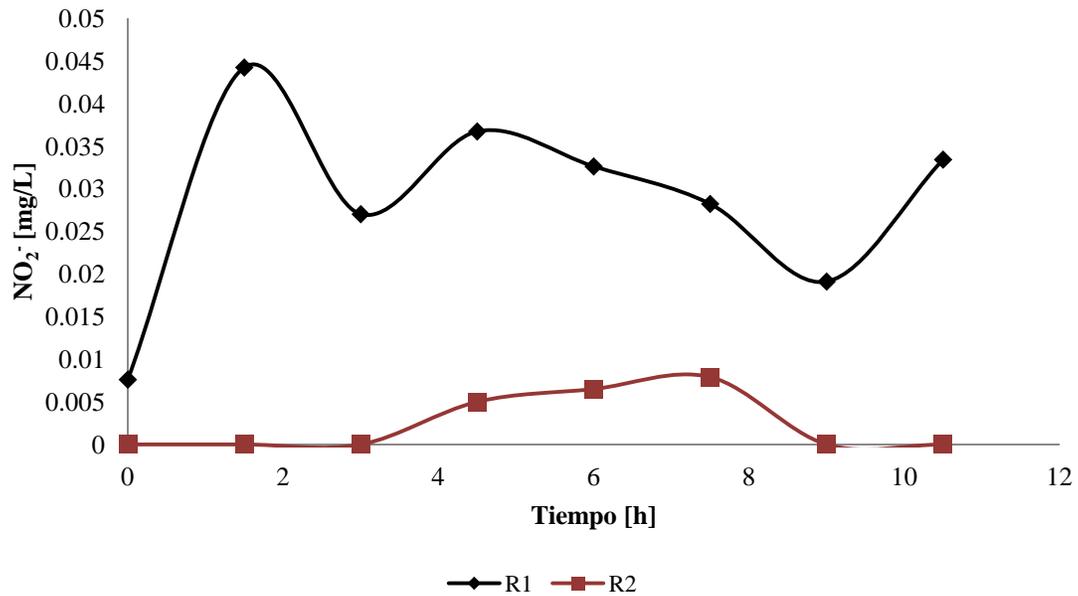


para esta condición cinética no se evidencio de manera contundente dicho decremento.

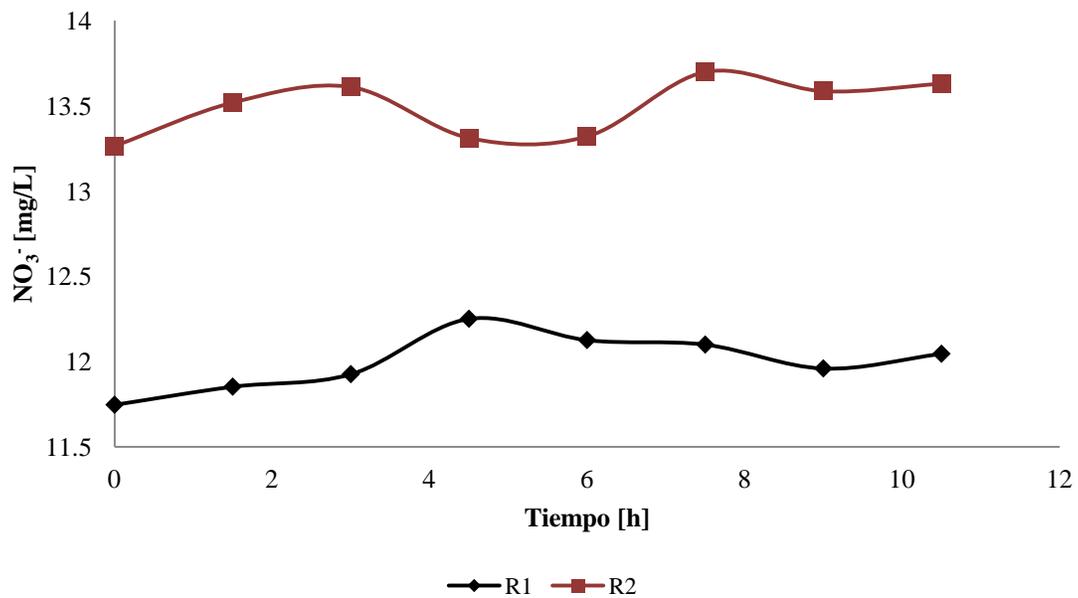
Por otro lado al incrementar la cantidad de lodo inoculado, la conversión a  $\text{NO}_2^-$  se lleva a cabo en conjunción con la asimilación de la materia orgánica en comparación con las primeras condiciones cinéticas llevadas a cabo, sin embargo, se observa que para R1 la conversión a nitritos es mayor en comparación con el sistema R2 (figura 4.21), lo que implica que el sistema R1 lleva a cabo la nitrificación a una rapidez mayor, aunque por otro lado no se presenta una variación importante de  $\text{NO}_3^-$  para ambos sistemas de acuerdo a los resultados reportados en el gráfico 4.22, lo cual conlleva a pensar que el proceso de nitrificación no se completa del todo ya que no se evidencia de manera contundente el paso de  $\text{NO}_2^-$  a  $\text{NO}_3^-$  de acuerdo a los datos reportados.



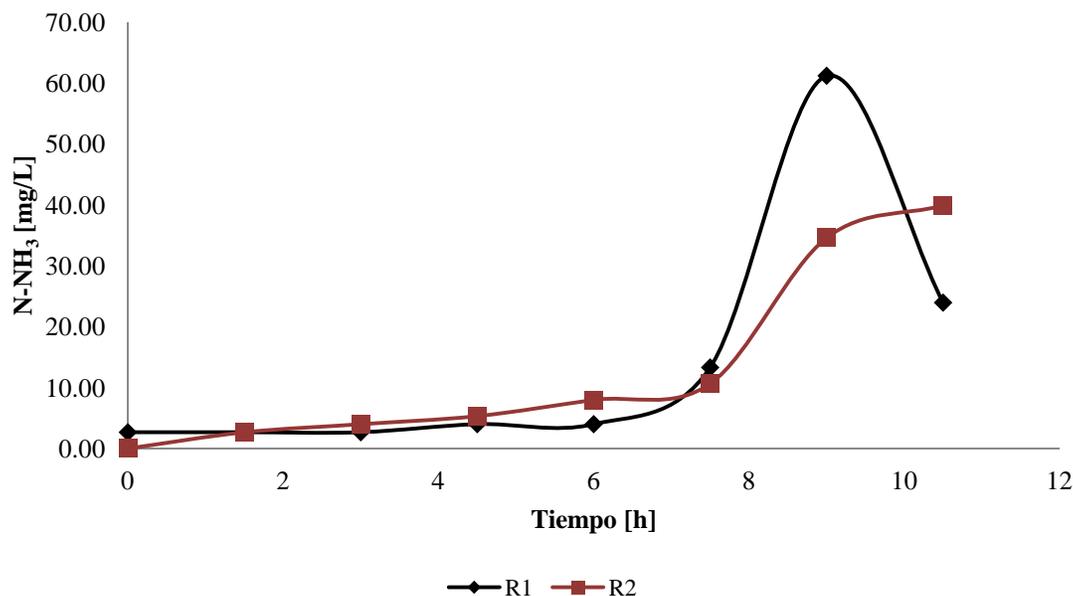
**Gráfico 4.20** Resultados obtenidos de pH con 60 mL de lodos y 500 mg DQO/L.



**Gráfico 4.21** Resultados obtenidos de  $\text{NO}_2^-$  con 60 mL de lodos y 500 mg DQO/L.



**Gráfico 4.22** Resultados obtenidos de  $\text{NO}_3^-$  con 60 mL de lodos y 500 mg DQO/L.

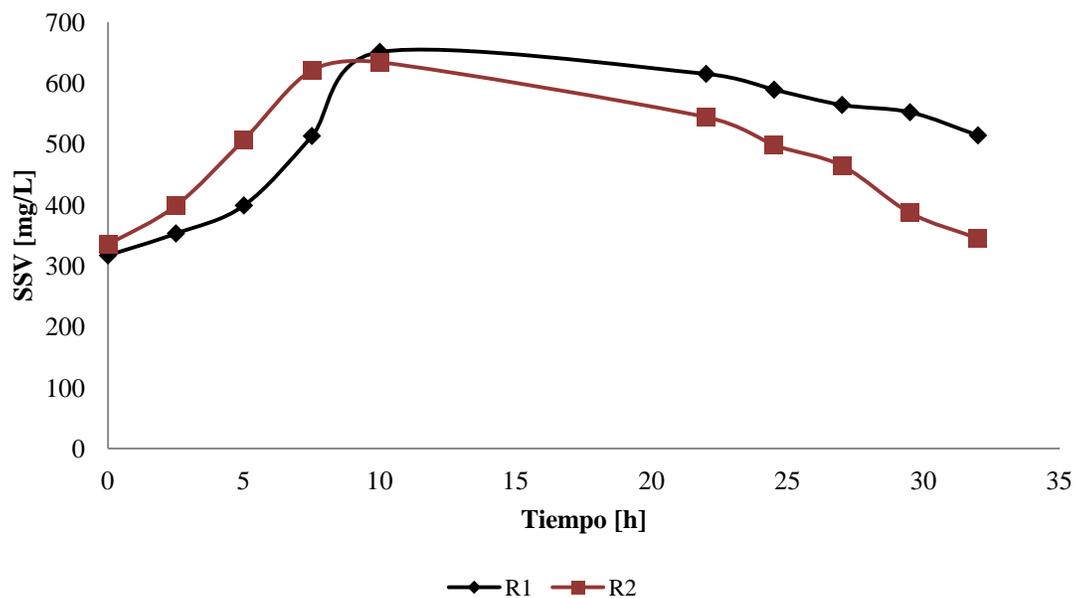


**Gráfico 4.23** Resultados obtenidos de N-NH<sub>3</sub> con 60 mL de lodos y 500 mg DQO/L.

❖ Cinéticas con 60 mL de lodo inoculado y 1500 mg DQO<sub>0</sub>/L.

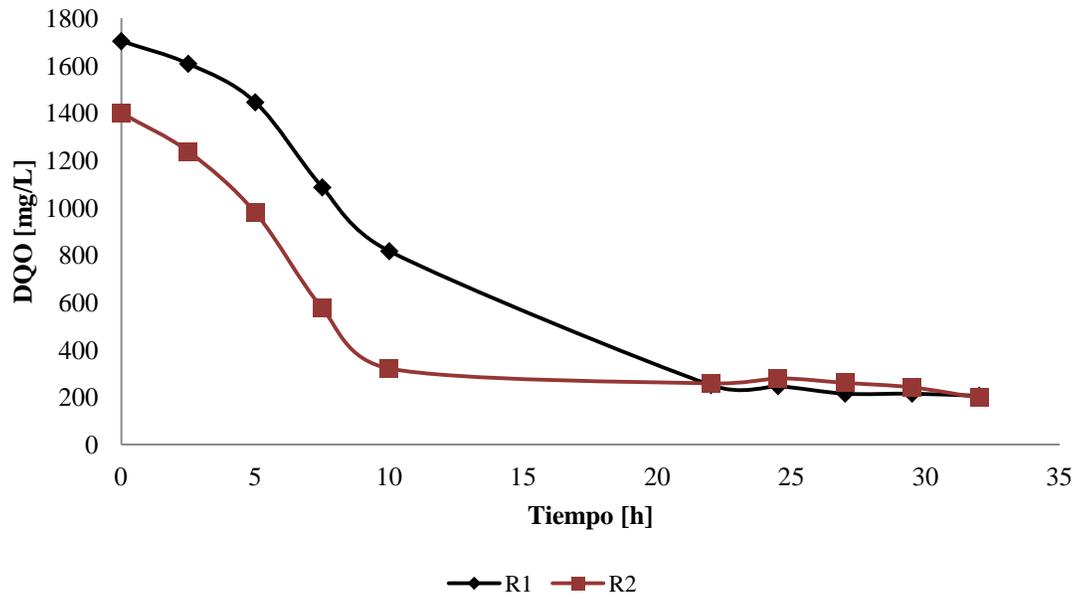
Finalmente para la última evaluación cinética se incremento el tiempo de residencia establecido con la finalidad de corroborar que antes de concluir las 24 hrs de reacción se lleva a cabo para ambos sistemas la remoción de la materia orgánica referida como DQO y COD, ya que para las condiciones cinéticas 1 y 2 anteriormente mencionadas, el incremento en la cantidad del inóculo reporto que la asimilación se lleva a cabo entre las 10 hrs y las 22 hrs de reacción.

Como se puede observar en el gráfico 4.24 de nuevo se puede apreciar la fase de muerte en la curva de crecimiento, aunque en esta ocasión se evidencia dicha fase en comparación con los resultados obtenidos en el gráfico 4.10, de este modo para ambos sistemas la fase estacionaria se sitúa entre las 10 y 24 hrs de reacción en donde se tendrá la máxima tasa de utilización de sustrato.

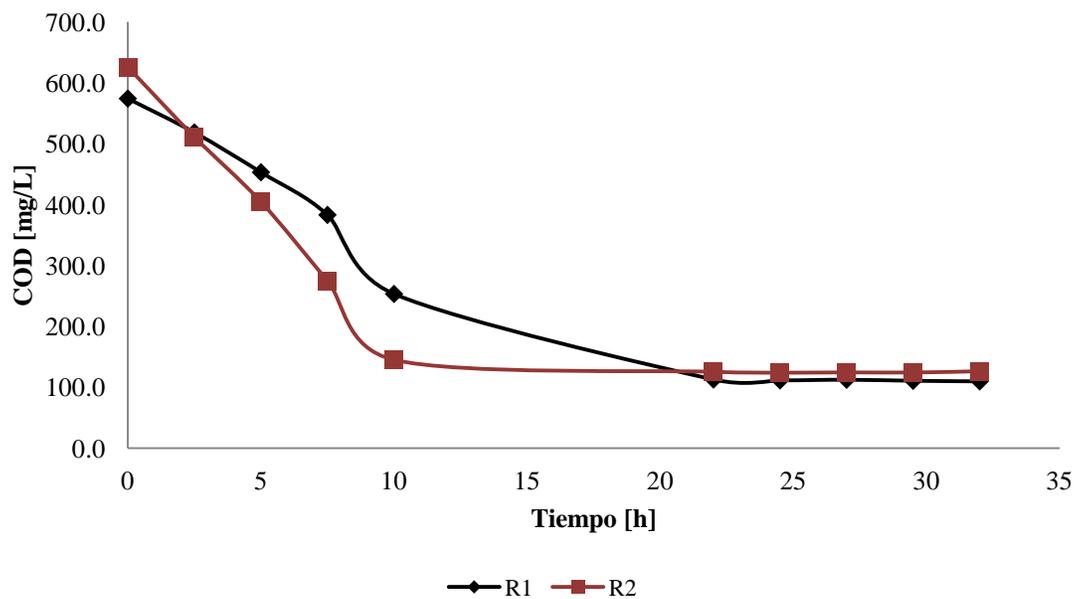


**Gráfico 4.24** Resultados obtenidos de SSV con 60 mL de lodos y 1500 mg DQO/L.

El comportamiento de los parámetros de DQO y COD se reportan en los gráficos 4.25 y 4.26, en los cuales se observa que al transcurrir las 32 hrs de reacción el comportamiento se mantiene constante después de transcurrir 10 hrs de reacción, coincidiendo con el comportamiento de la curva de crecimiento (gráfico 4.24), obteniendo remociones de 87.91% de DQO y 80.87% de COD para R1, mientras que para R2 las remociones fueron de 85.85% y 79.80%.



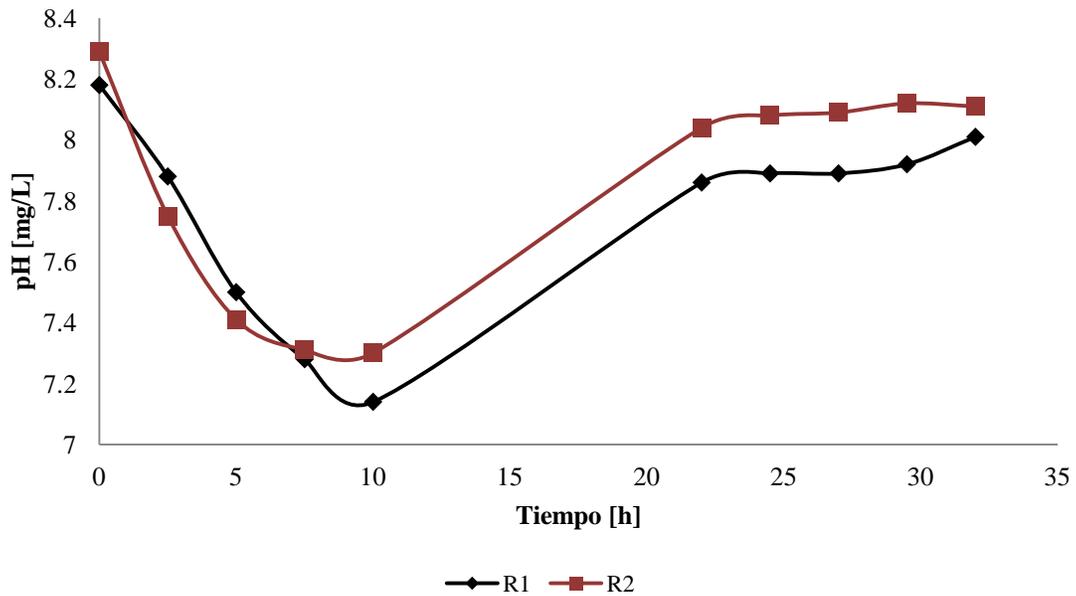
**Gráfico 4.25** Resultados obtenidos de DQO con 60 mL de lodos y 1500 mg DQO/L.



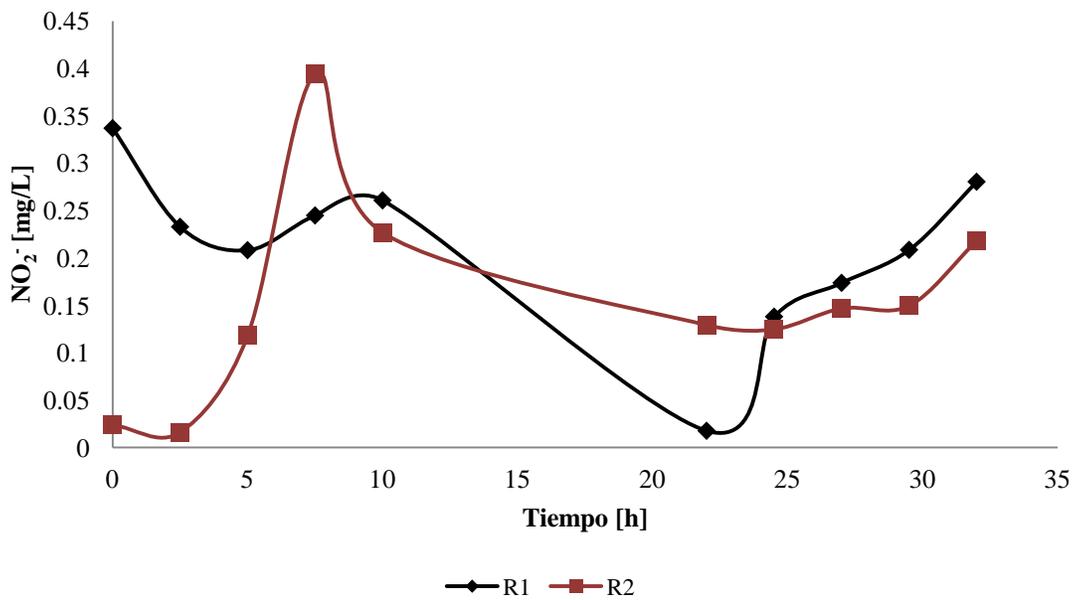
**Gráfico 4.26** Resultados obtenidos de COD con 60 mL de lodos y 1500 mg DQO/L.



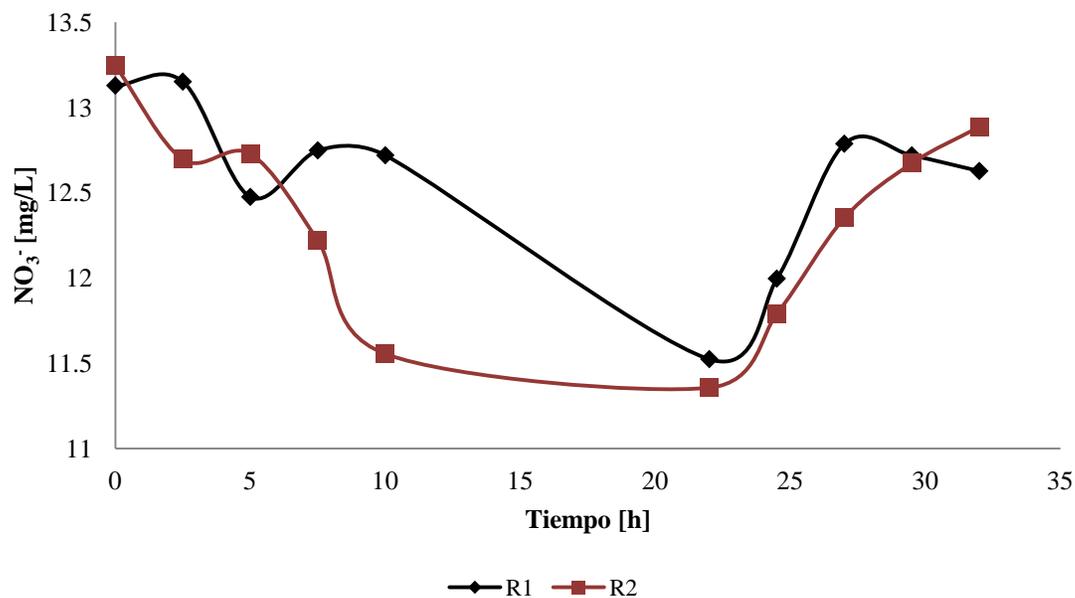
Para la evaluación del comportamiento del nitrógeno se obtuvieron los resultados mostrados en los gráficos 4.28, 4.29 y 4.30, en los cuales se puede observar que la conversión de  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$  en ambos sistemas se evidenció en mayor medida comparado con los resultados obtenidos en las primeras condiciones cinéticas llevadas a cabo, de esta forma se observa una tendencia análoga para ambos sistemas en donde la concentración de nitrito comienza a aumentar durante la etapa de asimilación mientras que la concentración de nitrato disminuye, de esta forma se corrobora que el proceso de nitrificación puede llevarse a cabo en ambos sistemas, sin embargo, se tiene que contemplar que al transcurrir 24 hrs de reacción se vuelve a incrementar la concentración de ambas especies, lo que implica la necesidad de incluir un ciclo anóxico para poder efectuar una desnitrificación. Por otro lado, al observar el comportamiento reportado en el gráfico 4.27 para el pH y comparándolo con los resultados obtenidos para la evolución del nitrógeno amoniacal, se confirma que la variación del pH se atribuye al equilibrio que se establece entre el amonio y amoniaco al momento de que las bacterias asimilan la amina gastada, ya que este comportamiento coincide a su vez con el observado para la degradación de la materia orgánica.



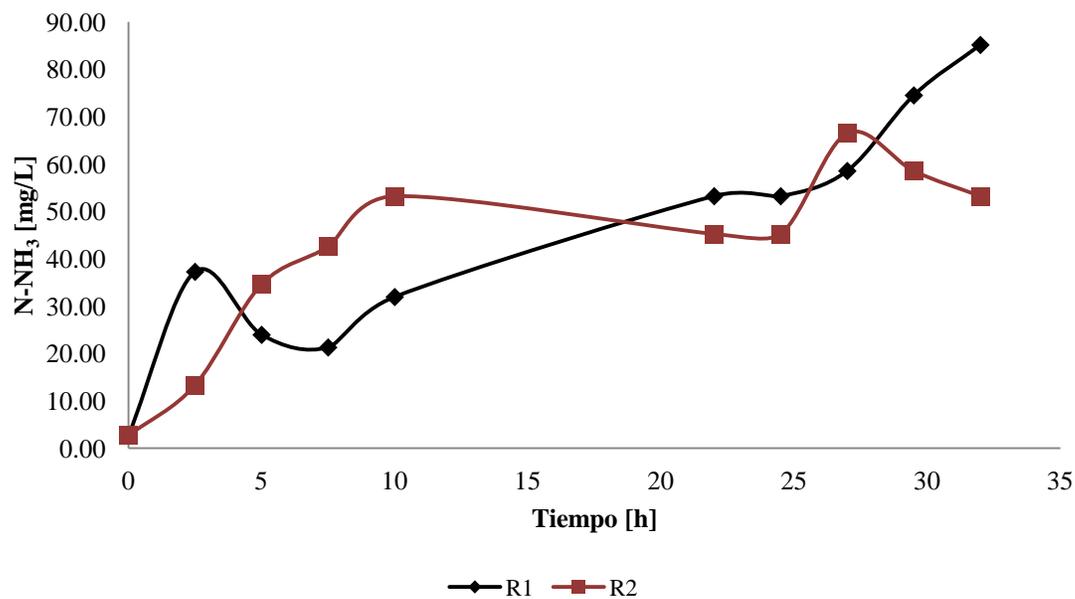
**Gráfico 4.27** Resultados obtenidos de pH con 60 mL de lodos y 1500 mg DQO/L.



**Gráfico 4.28** Resultados obtenidos de  $\text{NO}_2^-$  con 60 mL de lodos y 1500 mg DQO/L.



**Gráfico 4.29** Resultados obtenidos de  $\text{NO}_3^-$  con 60 mL de lodos y 1500 mg DQO/L.



**Gráfico 4.30** Resultados obtenidos de  $\text{N-NH}_3$  con 60 mL de lodos y 1500 mg DQO/L.



A partir de los resultados obtenidos para cada una de las cinéticas llevadas a cabo se obtuvieron los coeficientes de crecimiento para cada una de las condiciones establecidas de acuerdo a la ecuación 2.37 considerando al sustrato en términos de la DQO y COD para apreciar como varía dicho coeficiente de acuerdo al término al cual se refiere.

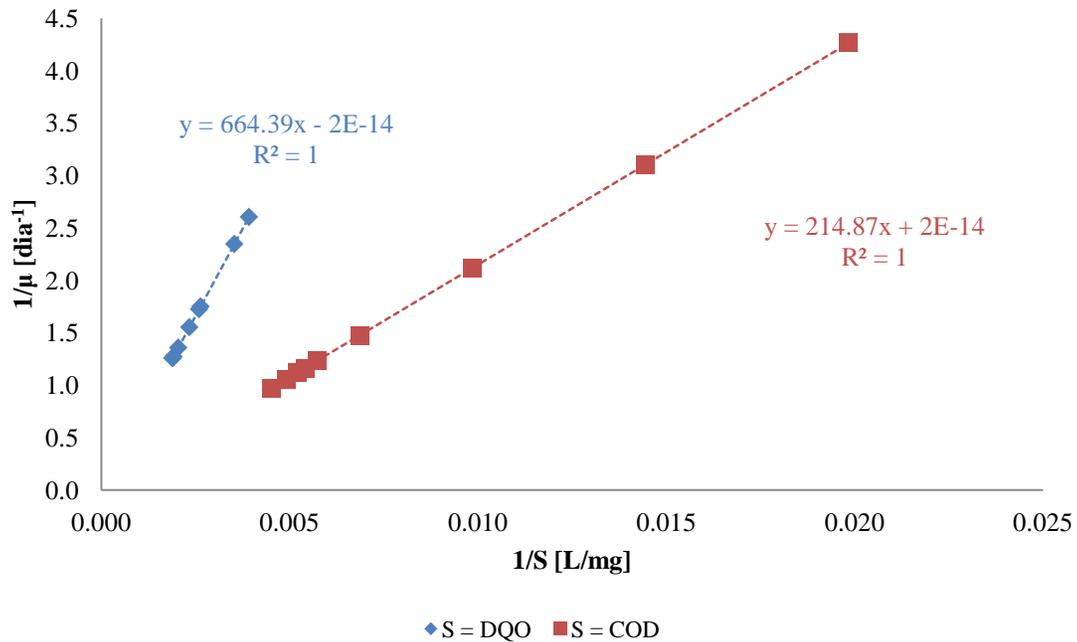
**Tabla 4.7** Coeficientes de crecimiento obtenidos en términos de DQO y COD.

Condiciones cinéticas	Sistema	$Y_{DQO}$	$Y_{COD}$
1 Inoculo: 30 mL Carga inicial: 500 mg DQO/L	R1	0.4895	0.7855
	R2	0.3630	0.8771
2 Inoculo: 60 mL Carga inicial: 500 mg DQO/L	R1	0.3261	0.6620
	R2	0.3474	0.7880
3 Inoculo: 60 mL Carga inicial: 1500 mg DQO/L	R1	0.3768	0.7236
	R2	0.2774	0.6220

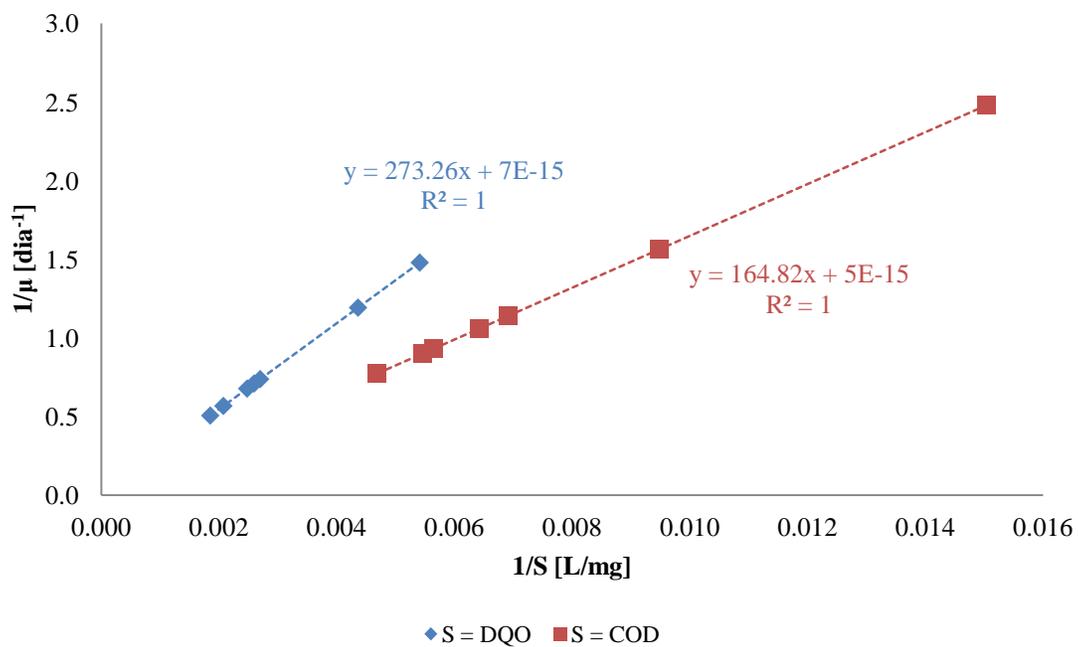
A partir de los coeficientes de crecimiento reportados en la tabla 4.7 y empleando la ecuación 2.40 mediante la linealización de la ecuación de Monod, se pudieron obtener los valores de las coeficientes cinéticos, suponiendo que el comportamiento del sustrato se asemeja a una ecuación cinética de primer orden tomando en consideración el comportamiento lineal observado en los gráficos 4.11, 4.12, 4.18, 4.19, 4.25 y 4.26 evaluándolos en base a la ecuación 4.1.

$$-\frac{dS}{dt} = kS \dots\dots\dots 4.1$$

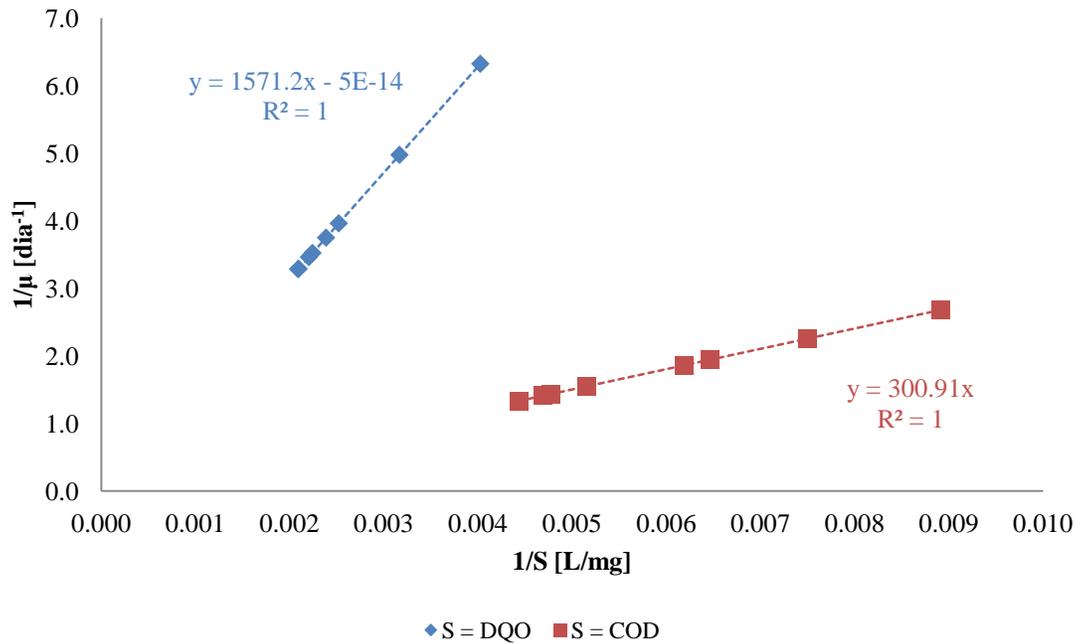
De este modo al evaluar la ecuación de Monod linealizada para cada uno de los resultados cinéticos obtenidos a las condiciones establecidas, se obtienen los siguientes gráficos:



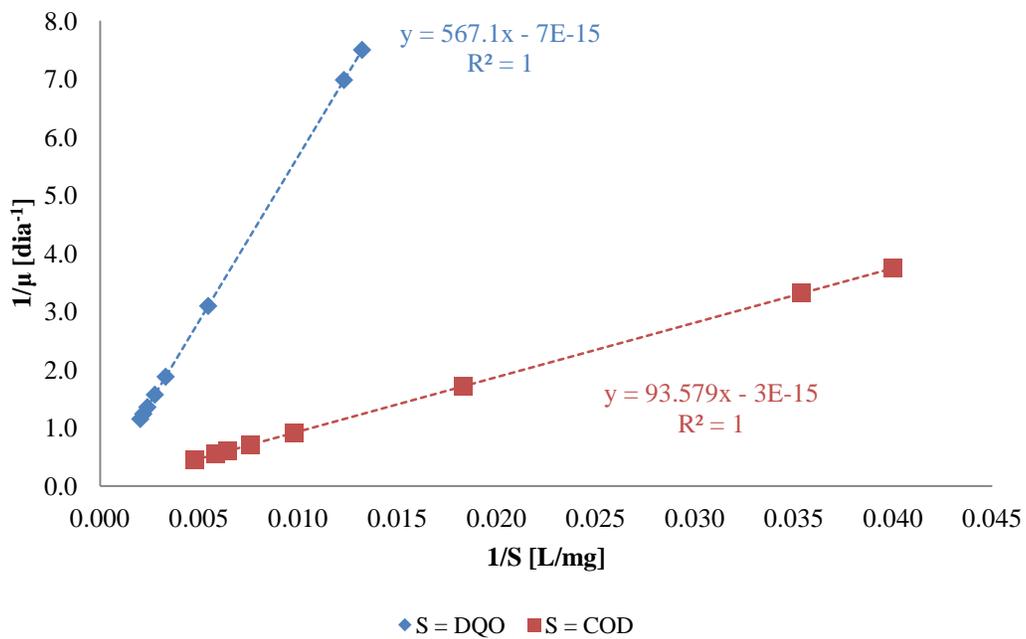
**Gráfico 4.31** Linealización para la obtención de los coeficientes cinéticos para R1 a la condición 1.



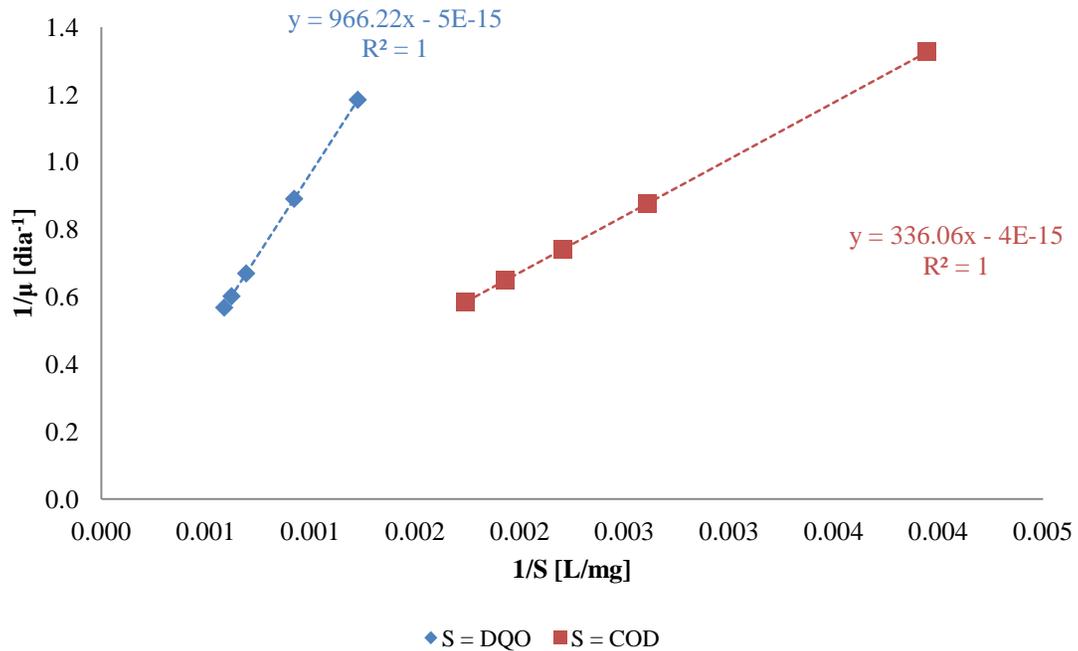
**Gráfico 4.32** Linealización para la obtención de los coeficientes cinéticos para R2 a la condición 1.



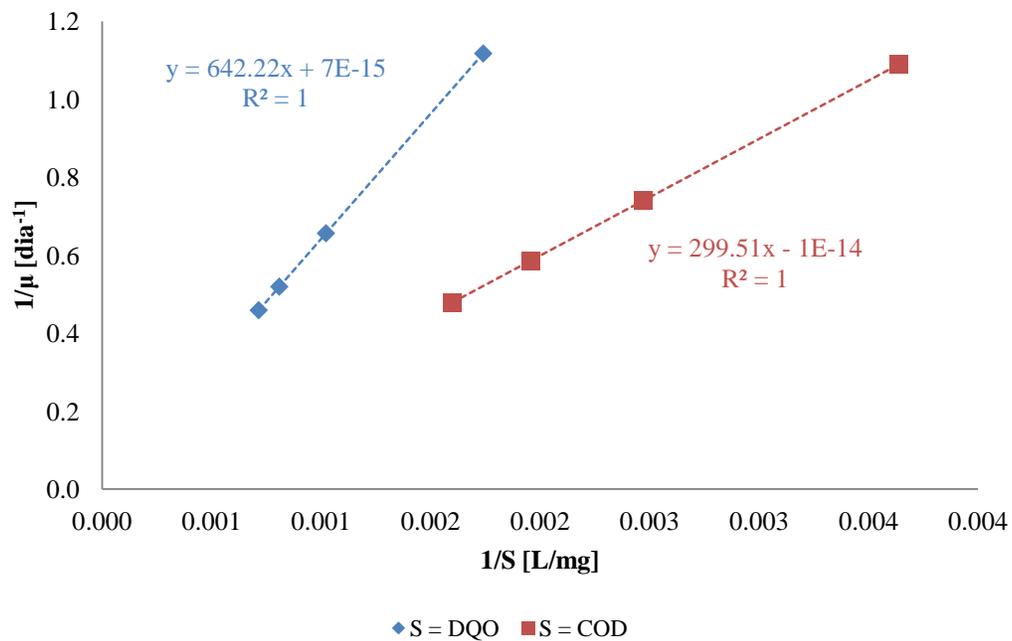
**Gráfico 4.33** Linealización para la obtención de los coeficientes cinéticos para R1 a la condición 2.



**Gráfico 4.34** Linealización para la obtención de los coeficientes cinéticos para R2 a la condición 2.



**Gráfico 4.35** Linealización para la obtención de los coeficientes cinéticos para R1 a la condición 3.



**Gráfico 4.36** Linealización para la obtención de los coeficientes cinéticos para R2 a la condición 3.



De esta forma a partir de la pendiente y la ordenada al origen obtenida para cada una de las condiciones que se reportan en los gráficos 4.31, 4.32, 4.33, 4.34, 4.35 y 4.36, se obtienen los coeficientes cinéticos reportados en la tabla 4.8.

**Tabla 4.8** Coeficientes cinéticos obtenidos para cada sistema a las condiciones planteadas.

Condición cinética	Sistema	$K_{DQO}$ [mg/L]	$K_{COD}$ [mg/L]
1	R1	664.39	214.87
	R2	273.26	164.82
2	R1	1571.2	300.91
	R2	567.1	93.579
3	R1	966.22	336.06
	R2	642.22	299.51

Como se aprecia en la tabla 4.8 el valor de  $K_S$  en términos de DQO y COD es muy elevado mientras que la rapidez específica de crecimiento tiende a indeterminarse por el comportamiento lineal al evaluar los datos con la ecuación de Monod, de este modo se puede deducir que debido a la problemática de la obtención de los puntos intermedios entre las 10 hrs y las 22 hrs evidencia que muy probablemente no se obtuvo el valor fidedigno de la máxima cantidad de sustrato que las bacterias asimilan, sin embargo, al observar los valores obtenidos para los coeficientes de crecimiento en términos de la DQO y COD son parecidos entre sí aun cuando se variaron las condiciones, de esta forma se puede inferir que aparentemente no hay efectos inhibitorios a las condiciones establecidas, ya que el sustrato es perfectamente asimilable, aunque no se descarta la posibilidad de suscitarse algún tipo de inhibición, ya que no se pudieron evaluar los coeficientes cinéticos de manera adecuada.



#### 4.4.2 Selección y mantenimiento del consorcio seleccionado.

Comparando los resultados obtenidos durante el periodo de aclimatación con los de las cinéticas llevadas a cabo, se puede apreciar que en realidad el sistema R2 se adaptó mejor a la amina debido a que las remociones durante las cinéticas llevadas a cabo en comparación con R1 fueron mayores de acuerdo a la tabla 4.9, lo cual discrepa de lo observado durante la aclimatación ya que las remociones promedio para R1 fueron de un 78.63% mientras que para R2 fueron de un 68.50%, de esta forma dicha variación se puede atribuir a los productos de descomposición que pudiesen dar respuesta al efectuar la prueba de DQO ya que estos son susceptibles a oxidarse.

**Tabla 4.9** Remociones obtenidas para cada una de las cinéticas.

Condición cinética	Sistema	%Remoción <sub>DQO</sub>	%Remoción <sub>COD</sub>
1	R1	49.63	68.20
	R2	68.74	70.09
2	R1	48.07	50.24
	R2	84.65	88.04
3	R1	87.91	80.87
	R2	85.85	79.80

Así entonces el consorcio que mejor se adaptó a la amina gastada proveniente de la refinería “Ing. Antonio M. Amor” fue R2, con lo cual se podría mantener dicho sistema a las condiciones establecidas en la tabla 4.6 ya que estas lograron mantener al reactor estable de acuerdo a las observaciones llevadas a cabo durante la aclimatación de la biomasa.



---

## CAPÍTULO 5.

### 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

#### 5.1 Conclusiones.

##### ➤ Caracterización de la biomasa.

Se determinó que debido a los cambios presentes en el metabolismo por parte de las bacterias para la asimilación de nuevos sustratos, se pueden originar modificaciones en las expresiones fenotípicas, mismas que sumadas a los cambios en la síntesis de enzimas para su adaptación propician que el empleo de los métodos convencionales de identificación basados en pruebas bioquímicas resulten ser inadecuados, lo cual conlleva a la necesidad de corroborar los resultados obtenidos empleando métodos basados en las expresiones genéticas de ADN.

Sin embargo, para las pruebas llevadas a cabo al inicio de la aclimatación que podrían considerarse como las más aproximadas a una identificación adecuada, se contemplaría la presencia de especies pertenecientes a los géneros *Alcaligenes*, *Moellerella*, *Brevundimonas*, *Ochrobactrum* y *Oligella* para el consorcio R1, mientras que para el consorcio R2 se contemplarían especies correspondientes a los géneros *Neisseria*, *Acinetobacter* y *Alcaligenes*, sin descartar la probable presencia de especies pertenecientes al género de las *Pseudomonas* debido a que de acuerdo al fabricante, el medio Cetrimida que se empleo para el aislamiento de bacterias es un medio selectivo para la identificación de *Pseudomonas aeruginosa*, y debido a que se observó crecimiento de colonias en este medio para ambos consorcios, se puede contemplar la posibilidad de contener especies pertenecientes al género.



### ➤ **Aclimatación.**

De acuerdo a los resultados obtenidos durante la evaluación de la aclimatación de ambos sistemas, se corrobora que el efecto de la bioaumentación implementado para la estabilización del sistema resulta ser una alternativa muy conveniente para acelerar el proceso de adaptación de la biomasa, tomando en consideración que preferentemente se deberá partir de bacterias aisladas, aunque las mejores condiciones de adaptación encontradas indican que el proceso de aclimatación a partir de dosis de sustrato de baja concentración a mayor concentración, resultan ser la mejor opción como ruta de adaptación cuando se considera un sustrato complejo como lo es la amina gastada.

Las mejores condiciones de adaptación para el mantenimiento de reactores biológicos adaptados a la asimilación de aminas gastadas constan de un volumen reaccionante de 2.5 L adicionando soluciones nutritivas A, B y C de 10, 3 y 3 mL respectivamente, con una carga orgánica de entre 700 y 900 mg DQO/L e inoculando 30 mL de lodo sedimentable y considerando tiempos de residencia de 3 a 4 días manteniendo aislados los sistemas para inhibir el crecimiento de algas. Cabe mencionar que las condiciones encontradas corresponderán a la adaptación de biomasa a la remoción de aminas gastadas desechadas por efecto de desintegración térmica.

### ➤ **Cinéticas de degradación.**

La amina gastada proveniente de la refinería “Ing. Antonio M. Amor” de Salamanca Guanajuato se logra degradar en un tiempo de residencia menor de 24 hrs contemplando concentraciones que van desde los 500 mg DQO/L hasta los 1500 mg DQO/L una vez adaptados ambos consorcios seleccionados.

Para poder seleccionar el consorcio mejor adaptado para la degradación de la amina gastada se establecieron tres condiciones cinéticas en donde se vario la cantidad de inóculo y sustrato, de este modo para la primer condición establecida



se adicionaron 30 mL de sólidos sedimentables y una carga aproximada de 500 mg DQO/L, para la segunda condición se adicionaron 60 mL de sólidos y 500 mg DQO/L, y finalmente la tercer condición establecida constó de 60 mL de sólidos y una carga aproximada de 1500 mg DQO/L, cabe señalar que se seleccionó como carga orgánica aproximada la DQO debido a que para este parámetro se reportó una elevada concentración al efectuar la caracterización de la amina gastada, sin embargo, para el análisis cinético también se evaluó la respuesta a la degradación del carbono orgánico disuelto con el objeto de comparar la remoción que se podría contemplar como estrictamente orgánica.

Los coeficientes de crecimiento obtenidos para las cinéticas llevadas a cabo varían muy poco para cada uno de los consorcios al modificar las condiciones cinéticas debido a que la asimilación del sustrato en términos de DQO y COD es admisible a las condiciones planteadas, sin embargo, para corroborar que hay ausencia de inhibición es necesario evaluar los coeficientes cinéticos contemplando la cinética de crecimiento adaptada a la ecuación de Monod, ya que el tiempo de residencia al cual se presenta la máxima capacidad de utilización de sustrato no se evidencio por medio de este trabajo debido a que esta se ubicaba entre las 10 hrs y las 22 hrs de reacción lo cual complicaba el llevar a cabo el muestreo dentro de ese intervalo, aunque cabe mencionar que se logró observar que el tiempo de residencia establecido de 24 hrs fue adecuado ya que a este tiempo de acuerdo a las curvas de crecimiento obtenidas se presenta la fase de muerte para ambos consorcios.

A partir de las cinéticas llevadas a cabo, se determinó que el consorcio mejor adaptado fue R2 ya que las remociones obtenidas en comparación con el consorcio R1 fueron mayores contemplando los mismos tiempos de residencia, ya que las remociones reportadas para R2 fueron de 68.74%, 84.65% y 85.85% en términos de la DQO mientras que para el COD se obtuvieron remociones de 70.09%, 88.04% y 79.80% para las condiciones cinéticas 1, 2 y 3 respectivamente,



mientras que para R1 las remociones obtenidas fueron de 49.63%, 48.07% y 87.91% de DQO y para el COD fueron de 68.20%, 50.24% y 80.87%.

Debido a que la amina gastada posee una carga considerablemente elevada de nitrógeno, se pudo observar que los consorcios seleccionados son capaces de llevar a cabo el proceso de nitrificación ya que la presencia de  $\text{NO}_2^-$  se presenta al momento de que el nitrógeno en forma orgánica se descompone para formar nitrógeno amoniacal, mismo que de acuerdo al ciclo de nitrificación puede oxidarse a nitritos por la acción de bacterias, por otro lado también cabría la posibilidad de contemplar un ciclo de nitrificación y desnitrificación si se estableciera un periodo anóxico, ya que de acuerdo a las identificaciones llevadas a cabo en el consorcio seleccionado existe la probabilidad de encontrar especies pertenecientes a géneros que de acuerdo a la literatura contienen especies capaces de llevar a cabo la desnitrificación, sin embargo se debería corroborar junto con la identificación de especies nitrificantes por métodos a nivel genético.

## **5.2 Recomendaciones a futuros trabajos.**

En base a los resultados obtenidos para cada una de las partes que constituyen el trabajo llevado a cabo se proponen las siguientes recomendaciones:

- ◆ En el caso de no disponer de pruebas de identificación basadas en el ADN, para poder implementar el método de identificación por medio de pruebas bioquímicas se sugiere partir del diseño de un medio de cultivo a las condiciones problema que se tienen, ya que al cambiar el sustrato provisto se pueden presentar tanto falsos positivos como falsos negativos en cada una de las pruebas.
- ◆ Para poder determinar los coeficientes cinéticos característicos del sistema se recomienda centrarse en la zona más próxima a la máxima asimilación de sustrato contemplando que esta se presenta entre las 10



---

hrs y las 22 hrs de reacción, de manera que se establezcan los tiempos de toma de muestra de tal forma que se obtenga el mayor número de datos entre estos intervalos.

- ◆ Si se desean establecer ciclos de nitrificación y desnitrificación se debe contemplar que el tiempo de residencia deberá ser mayor, tomando en cuenta que la fuente de carbono o sustrato es consumida casi en un 80% en un tiempo de residencia de 24 hrs, de manera que es probable que se requiera de una fuente de carbono de fácil asimilación contemplando que esta no deberá inhibir la reacción.



## 6. ANEXOS.

### 6.1 Técnica para la determinación de la demanda química de oxígeno, NMX-AA-030-SCFI-2001.

#### ❖ Reactivos.

**Disolución estándar de biftalato (1 mL = 1.176 mg de DQO).** Deshacer grumos y secar 1 g de biftalato en una estufa a 120 °C. Pesar aproximadamente y con precisión 0.851 g de biftalato, disolver en agua y aforar a 1 L. Esta solución es estable por un periodo de 3 meses si se conserva en refrigeración y si no se observa crecimiento biológico.

**Disolución de sulfato de plata en ácido sulfúrico.** Pesar aproximadamente y con precisión 10.12 g de sulfato de plata y disolver en 1 L de ácido sulfúrico concentrado. El sulfato de plata requiere un tiempo aproximado de dos días para su completa disolución, además, esta solución deberá conservarse en un frasco oscuro para evitar descomposición.

**Disolución de digestión A (alta concentración).** Pesar aproximadamente y con precisión 10.216 g de dicromato de potasio previamente secado a 103°C por 2 h y añadirlo a 500 mL de agua, adicionar 167 mL de ácido sulfúrico concentrado y aproximadamente 33.3 g de sulfato de mercurio. Disolver y enfriar a temperatura ambiente. Aforar a 1 L con agua.

**Disolución de digestión B (baja concentración).** Pesar aproximadamente y con precisión 1.021 g de dicromato de potasio previamente secado a 103°C por 2 h y añadirlo a 500 mL de agua, adicionar 167 mL de ácido sulfúrico concentrado y aproximadamente 33.3 g de sulfato de mercurio. Disolver y enfriar a temperatura ambiente. Aforar a 1 L con agua.



**Nota:** Para aguas que contengan una DQO baja (5 mg/L a 75 mg/L), utilizar la disolución de digestión B, en caso de que las concentraciones esperadas sean mayores a este, utilizar la disolución de digestión B.

❖ **Curva de calibración.**

Se preparan a partir de la disolución estándar de biftalato las siguientes disoluciones tomando las alícuotas indicadas y aforando a 50 mL:

**Tabla 6.1** Patrones para la elaboración de la curva de calibración de DQO.

mL de disolución estándar	Conc. de DQO [mg/L]
0	0
5	100
10	200
20	400
30	600
40	800
50	1000

❖ **Procedimiento.**

Se precalienta el horno a utilizar hasta alcanzar una temperatura de 165°C.

Se coloca en tubos de reacción 2 mL de muestra, esta deberá estar previamente homogeneizada.

Añadir 1 mL de solución de digestión A o B, de acuerdo a la concentración esperada de la muestra.

Posteriormente añadir cuidadosamente 3 mL de la disolución de plata y ácido sulfúrico. Al adicionar esta solución, el tubo se calienta, por ello se deberán tomar las precauciones pertinentes.

Homogenizar los tubos perfectamente, para obtener un buen mezclado. En caso de ser necesario emplear un equipo vortex que asegure una mezcla perfecta.



Introducir los tubos de reacción (empleando una gradilla metálica) al horno a una temperatura de 165°C durante un periodo de 2 h.

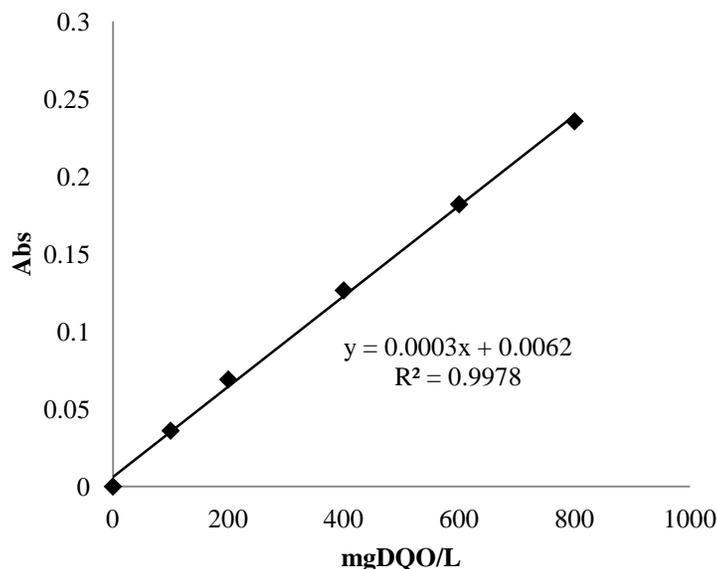
Retirar los tubos del horno al transcurrir el periodo de tiempo establecido y dejarlos enfriar a temperatura ambiente, esto permitirá que se sedimenten los sólidos que se precipitan.

Medir la absorbancia en un espectrofotómetro previamente calibrado a una longitud de onda de 620 nm. En caso de observar precipitación en el momento de las lecturas, centrifugar las muestras antes de ser leídas en el espectrofotómetro.

Llevar un blanco durante la determinación, siguiendo el mismo procedimiento establecido para la muestra.

Determinar la concentración de la muestra empleando la curva de calibración elaborada con la disolución de biftalato de potasio.

❖ **Curva de calibración empleada.**



**Gráfico 6.1** Curva de calibración empleada para la determinación de DQO.



---

## 6.2 Técnica para la determinación del carbono orgánico total, método APHA-AWWA-WPCF (5310).

### ❖ Reactivos.

**Disolución estándar de biftalato (1000 mg COT/L).** Pesar aproximadamente y con precisión 2.125 g de biftalato de potasio, disolver en agua desionizada y aforar a 1 L.

**Disolución de HCl 1N.** Tomar 8 mL de ácido clorhídrico y diluir a 100 mL de agua destilada.

### ❖ Curva de calibración.

A partir de la disolución estándar se efectúan las diluciones adecuadas para obtener 5 puntos correspondientes a concentraciones de 0, 200, 400, 600, 800 y 1000 mg/L.

### ❖ Procedimiento.

La determinación se lleva a cabo en un medidor TOC-V CSN, con lo cual se preparan las muestras en viales de 20 mL.

El carbono orgánico total de la muestra se obtiene indicando en el equipo que se lleve a cabo la diferencia entre el carbono inorgánico presente y el carbono orgánico, para ello se acidulará de manera automática la muestra para convertir el carbono inorgánico en CO<sub>2</sub>, el cuál es detectado a través de un espectro infrarrojo y mediante la diferencia entre el carbono total y el inorgánico se obtienen los valores del COT que el equipo reporta de manera directa.



### 6.3 Técnica para la determinación de sólidos suspendidos totales y sólidos suspendidos volátiles, NMX-AA-034-SCFI-2001.

#### ❖ **Material.**

Papeles filtro de poro de 5 micras.

Matraz kitasato de 250 mL con embudo Büchner.

Pipeta de 10 mL.

#### ❖ **Procedimiento.**

Se precalienta una estufa a una temperatura de 105°C, posteriormente se introducen los papeles filtros a emplear y se dejan secar por un periodo de 1 h, transcurrido el tiempo se retiran los papeles y se depositan en un desecador para dejar enfriar a temperatura ambiente. Se registra el peso del papel filtro hasta que este sea constante ( $P_1$ ).

Se toma un volumen determinado de muestra ( $V_{\text{muestra}}$ ) y se filtra empleando un papel filtro previamente pesado ( $P_1$ ). Al residuo obtenido del filtrado se le da el mismo tratamiento que  $P_1$ , y se registra el peso obtenido como  $P_2$ .

Una vez obtenido  $P_2$ , se introduce la muestra a una mufla a temperatura de 550°C por un periodo de 15 a 20 min. Una vez transcurrido el tiempo, se saca el papel filtro y se lleva a un desecador para ser enfriado a temperatura ambiente, una vez enfriado, se registra el peso del papel como  $P_3$ .

Para obtener la cantidad de sólidos suspendidos totales (SST) y volátiles (SSV) se emplea la siguiente ecuación reportando los resultados en mg/L:

$$SST = \frac{P_2 - P_1}{V_{\text{muestra}}} \quad SSV = \frac{P_2 - P_3}{V_{\text{muestra}}}$$



## 6.4 Técnica para la determinación de nitratos, método APHA-AWWA-WPCF (4500-N).

### ❖ Reactivos.

**Disolución de HCl 1N.** Tomar 8 mL de ácido clorhídrico y diluir a 100 mL de agua destilada.

**Disolución patrón de nitratos.** Secar 1 g de nitrato de potasio en una estufa a 105°C por 24 horas. Disolver 0.0722g de nitrato de potasio y aforar a 100 mL de agua destilada (100 mgNO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L). Si se desea conservar la disolución, adicionar 2 mL de cloroformo por litro. Esta solución es estable por un periodo de 6 meses.

### ❖ Curva de calibración.

Tomar 10 mL de la disolución patrón y aforar hasta 50 mL con agua destilada. Esta solución tendrá una concentración de 20 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L, hacer diluciones en matraces aforados de 50 mL para preparar los siguientes puntos.

**Tabla 6.2** Patrones para la elaboración de la curva de calibración de nitratos.

Volumen de disolución madre [mL]	Concentración de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> [mg/L]
0	0
7	2.8
14	5.6
21	8.4
28	11.2

### ❖ Procedimiento.

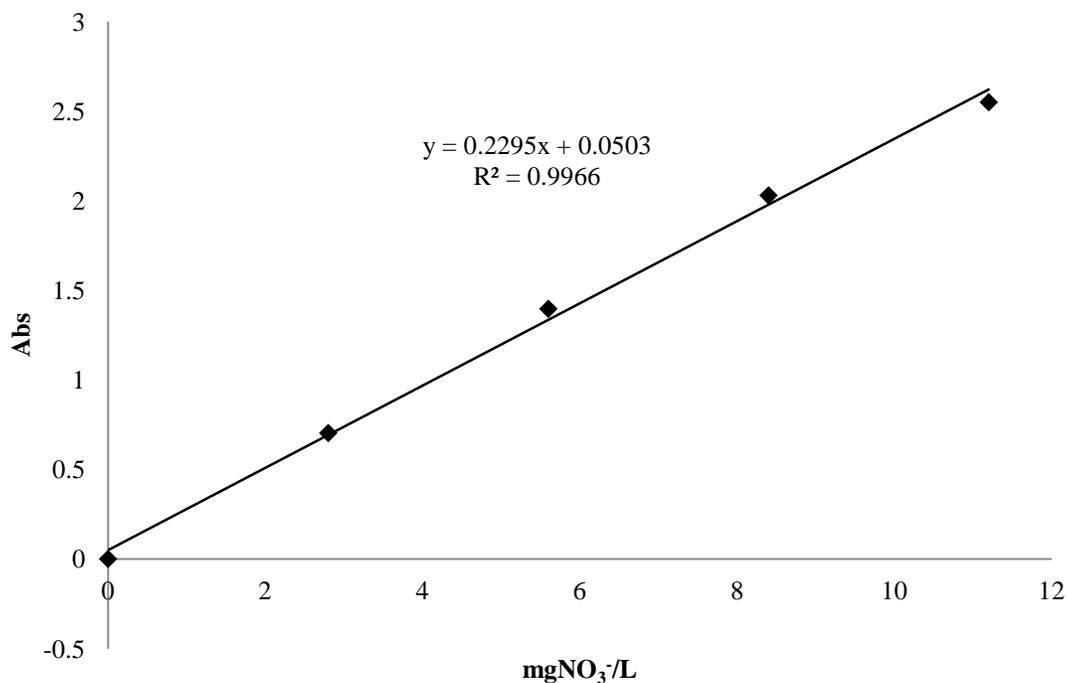
Se toman 15 mL de la muestra y se adiciona 1 mL de la disolución de HCl 1N. Mezclar y si la muestra presenta sólidos filtrarla.



Esperar 1 min y posteriormente leer con ayuda de un espectrofotómetro a una longitud de onda de 220 nm para determinar la concentración de  $\text{NO}_3^-$ , y a 275 nm para medir la absorbancia debida a la presencia de materia orgánica.

Para determinar la concentración presente en la muestra se debe restar el doble de la absorbancia leída a 275 nm a la obtenida a 220 nm; esta corrección debe hacerse solo a la muestra y no a la curva obtenida a partir de la disolución madre. Llevar un blanco bajo el mismo procedimiento.

❖ **Curva de calibración empleada.**



**Gráfico 6.2** Curva de calibración empleada para la determinación de  $\text{NO}_3^-$ .



## 6.5 Técnica para la determinación de nitritos, NMX-AA-099-SCFI-2006.

### ❖ Reactivos.

#### **Disolución de Sulfanilamida 4-aminobencensulfonamida ( $\text{NH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{NH}_2$ ).**

Disolver 2.5 g de sulfanilamida en una mezcla de 25 mL de HCl y 150 mL de agua; aforar con agua destilada a 250 mL. La disolución es estable por varios meses y debe conservarse en un frasco ámbar en refrigeración a una temperatura de 4°C.

#### **Disolución de Diclorhidrato de N-(1-naftil) etilendiamina ( $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{NH-CH}_2\text{NH}_2\cdot 2\text{HCl}$ ). [NEDA].**

Disolver 250 mg de NEDA y aforar con agua destilada a 250 mL; la solución debe ser preservada en un frasco ámbar y en refrigeración a 4°C. Renovar la disolución en caso de presentar una coloración café intensa. Precaución: este reactivo es tóxico y debe evitarse su contacto con la piel.

**Disolución de Oxalato de sodio 0.05N ( $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ ).** Secar 2 g de oxalato a 105 °C por una hora, pesar 1.675 g y disolver en agua aforando a 500 mL.

**Disolución de Permanganato de potasio 0.05N ( $\text{KMnO}_4$ ).** Disolver 0.8 g de permanganato en agua y aforar a 500 mL, almacenar la disolución en un frasco ámbar.

**Disolución madre de nitritos ( $\text{NaNO}_2$ ) [Aprox 270 mg/L].** Secar 1 g de nitrito de sodio a 105°C por dos horas, pesar 0.616 g y disolverlos en agua hasta aforo de 500 mL.

### ❖ Estandarización.

#### **Valoración de la disolución patrón.**

A 25 mL de la disolución de oxalato de sodio agregar 10 mL de ácido sulfúrico concentrado y calentar a 80°C.



Titular la disolución con permanganato 0.05N, hasta obtener un color rosa tenue estable por 30 segundos.

La concentración real de la solución de permanganato se obtendrá con la siguiente ecuación:

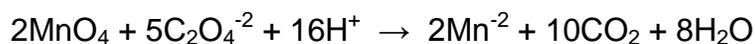
$$N_1 = \frac{V_2 * N_2}{V_1}$$

$V_2$  = mL gastados de permanganato en la titulación

$V_1$  = mL gastados de oxalato empleados para la titulación.

$N_2$  = Concentración de la disolución de oxalato  $\left[ \frac{eq}{L} \right]$

La reacción oxido reducción que se lleva a cabo es:



### Valoración de la disolución madre de nitritos.

A 50 mL de la disolución de permanganato agregar 5 mL de ácido sulfúrico concentrado y 50 mL de la disolución madre de nitritos (descargar bajo la superficie de la disolución en el matraz), agitar y calentar la disolución hasta 80°C.

Titular con la disolución de oxalato hasta obtener una decoloración, retitular el exceso de oxalato con la disolución de permanganato hasta la obtención de un rosa tenue estable por 30 segundos.

Calcular la concentración de la disolución madre en mg/L empleando la siguiente ecuación:

$$C_0 = \frac{[V_1 * N_1 - V_2 * N_2] * 7 * 1000}{V_3}$$



$C_0$  = concentración de la disolución madre  $\left[ \frac{mg}{L} \right]$

$V_1$  = mL gastados en la retitulación + los 50 mL iniciales de permanganato.

$V_2$  = mL gastados en la titulación con oxalato de sodio.

$N_1$  = Concentración obtenida para el permanganato [N].

$N_2$  = Concentración del oxalato de sodio [0.05N].

$V_3$  = Volumen de la disolución madre de nitritos [50 mL].

7 = Peso equivalente del nitrógeno.

1000 = Factor de conversión.

A partir de la concentración obtenida con la valoración, se toma una dilución de 5 mL de solución madre en 100 mL de agua, para obtener una solución intermedia misma que servirá para elaborar los puntos de la curva de calibración. En matraces de 50 mL se toma el volumen necesario para preparar al menos 5 puntos, de concentraciones que vayan desde los 0.05 mg/L hasta 1.00 mg/L.

#### ❖ Procedimiento.

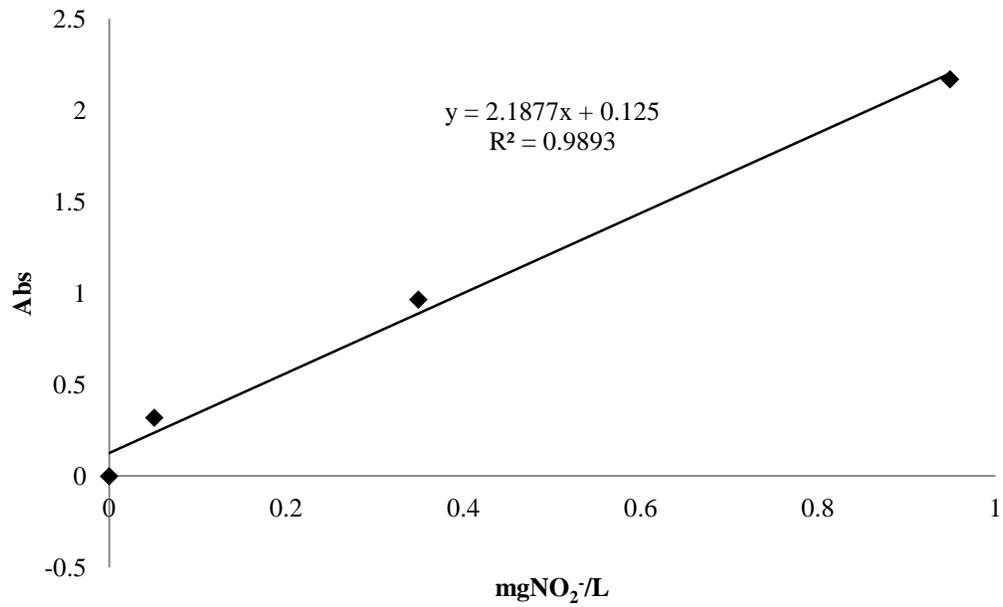
Se toman 15 mL de la muestra y se adiciona 1 mL de la disolución de sulfanilamida, se mezcla la disolución perfectamente y se permite un tiempo de reacción de 8 minutos.

Posteriormente se adiciona 1 mL de la disolución de NEDA agitando vigorosamente, el pH de la disolución deberá estar entre 1.9 y 2.5, se puede ajustar el pH empleando la solución diluida de hidróxido de amonio. Se deja reposar por un periodo de 10 min pero no más de 1 hora. La presencia de nitritos desarrolla una coloración purpura.

Elaborar la curva de calibración en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 543 nm. Llevar un blanco bajo las mismas condiciones.



❖ **Curva de calibración empleada.**



**Gráfico 6.3** Curva de calibración empleada para la determinación de  $\text{NO}_2^-$ .



---

## 6.6 Técnica para la determinación de nitrógeno total Kjeldahl, NMX-AA-026-SCFI-2001.

### ❖ Reactivos.

**Disolución indicadora de ácido bórico.** Secar aproximadamente 30 g de ácido bórico en un secador que contenga silica gel como desecante por un periodo de 24 h, pesar 20 g de ácido bórico seco y disolver en 500 mL de agua destilada, diluir y aforar a 1 L. Guardar la disolución en un envase de polietileno libre de boratos.

**Disolución de hidróxido de sodio 6N.** Pesar 240 g de hidróxido de sodio y llevar a 1 L de agua hasta aforo.

**Indicador rojo de metilo.** Pesar 200 mg de rojo de metilo y aforar a 100 mL con alcohol etílico.

**Indicador azul de metileno.** Pesar 100 mg de azul de metileno y aforar a 50 mL con alcohol etílico.

**Disolución valoradora de ácido sulfúrico 0.02N.** Se prepara a partir de una disolución 0.1N de ácido sulfúrico (diluir 1.5 mL de  $H_2SO_4$  concentrado en 500 mL), tomando 200 mL de esta disolución y diluyendo a 1 L.

### ❖ Procedimiento.

Se lleva a digestión 10 mL de muestra colocada en los tubos digestores en el equipo Büchi K-435, adicionando 10 g de sulfato de potasio mismo que será empleado como catalizador, o en su defecto se puede sustituir este catalizador empleando pastillas catalizadoras mismas que proporciona el fabricante.



Se adicionan 20 mL de ácido sulfúrico a cada tubo de digestión que vaya a emplearse, se recomienda llevar un blanco bajo las mismas condiciones como control del método.

Se enciende el lavador de gases del equipo, asegurándose de que el condensador del mismo tenga flujo.

Asegurándose de que no se puedan presentar fugas, se enciende el equipo de digestión para alcanzar una temperatura de 370 °C, el periodo de digestión se delimitará de acuerdo a las observaciones que se tengan durante la digestión, presentando dos etapas indicativas, la primera consistente en la liberación de vapores blancos por parte de las muestras, y en la etapa final, se presenciará una coloración verde clara ó pajiza, con la cual se tomará como una digestión completa.

El tiempo aproximado de digestión es de 1 h, sin embargo si se muestra la presenta las indicaciones antes mencionadas en cada uno de los tubos de digestión ó si se presentara en el blanco, se tomaran 15 min más de digestión tomando como tubo de control al que contiene el blanco.

Una vez concluida la digestión, se dejan enfriar los tubos a temperatura ambiente.

Posteriormente los tubos son llevados a la etapa de destilación misma que se describe más adelante.

### **Nitrógeno amoniacal.**

Para la determinación del nitrógeno amoniacal se toman 10 mL de muestra y se llevan directamente al destilador.



## Destilación.

En matraces de 250 mL colocan 60 mL de ácido bórico y se adicionan 400  $\mu$ L del indicador azul de metileno y 600  $\mu$ L de rojo de metilo, mezclando perfectamente y obteniendo una disolución indicadora de color morado.

Se enciende el equipo de destilación Büchi K-350 y se deja en funcionamiento durante unos minutos para permitir que se caliente el agua desionizada que emplea el equipo para inyectar vapor de calentamiento.

Se corre un blanco con agua destilada para limpiar el equipo.

Terminada la corrida de limpieza, se introduce un tubo con la muestra problema, y se ajusta el pH de la misma hasta que este sea mayor a 9.5 adicionando aproximadamente 90 mL de la solución de NaOH 6N.

Se coloca en el tubo receptor del equipo la solución indicadora de ácido bórico y se inicia la destilación fijando un tiempo de 4 min, de modo que la presencia de nitrógeno dará como resultado un vire de color morado a verde esmeralda.

Valorar la disolución indicadora empleando  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.02N, donde se observara el vire de la solución indicadora al color original.

Para determinar la concentración de nitrógeno amoniacal presente, así como el nitrógeno total, se emplean las siguientes ecuaciones:

$$N_{NTK/NH_3} = \frac{A - B * N * 14 * 1000}{V}$$



$N_{NTK/NH_3}$  = Concentración de nitrógeno total Kjeldahl u amoniacal, según el procedimiento  $\left[ \frac{mg}{L} \right]$

$A$  = Volumen de ácido sulfúrico gastado en la titulación de la muestra [mL]

$B$  = Volumen de ácido sulfúrico gastado en la titulación del blanco [mL]

$N$  = Normalidad del ácido sulfúrico empleado en la titulación

$V$  = Volumen de la muestra [mL]

14 = Peso equivalente del nitrógeno

$$N_{ORG} = N_{NTK} - N_{NH_3}$$

$N_{NTK}$  = Concentración del nitrógeno total Kjeldahl  $\left[ \frac{mg}{L} \right]$

$N_{ORG}$  = Concentración de nitrógeno orgánico  $\left[ \frac{mg}{L} \right]$

$N_{NH_3}$  = Concentración de nitrógeno amoniacal  $\left[ \frac{mg}{L} \right]$



## 6.7 Técnica para la determinación de sulfuros, ASTM UOP 209-00.

### ❖ Reactivos.

**2-propanol ó alcohol isopropílico.** El reactivo deberá estar libre de oxígeno, para ello se burbujea durante 1 h con nitrógeno de pureza del 99.9 %, y se almacenará bajo nitrógeno. Se recomienda que se efectúe esta operación directamente en el recipiente recién abierto del alcohol isopropílico.

**Nitrato de plata 0.01 N.** Pesar con exactitud 1.6987 g de nitrato de plata previamente secado a 105 °C por 1 h y disolverlos en 100 mL de alcohol isopropílico, posteriormente aforar la disolución a 1 L con agua desionizada.

**Sulfuro de sodio 1 %.** Disolver 1.0 g  $\pm$  1.0 mg de sulfuro de sodio en 100 mL de agua destilada.

**Hidróxido de sodio 1 M.** Pesar 40 g de NaOH y aforar a 1 L con agua destilada.

**Solvente de titulación.** En volúmenes iguales, mezclar el alcohol isopropílico purgado con nitrógeno y la disolución 1 M de hidróxido de sodio, a esta mezcla adicionar hidróxido de amonio concentrado en equivalencia del 1 % de la disolución, y almacenarla bajo el inerte (N<sub>2</sub>).

### ❖ Procedimiento.

Pesar con precisión una porción adecuada de la muestra en un vaso de precipitados de 250 mL, para ello se toma en cuenta la tabla que se muestra a continuación en función de la cantidad de analito esperada.

**Tabla 6.3** Porción de muestra estimada para determinar la cantidad de sulfuros presentes en la muestra.

Cantidad esperada de NaSR y Na <sub>2</sub> S, % masa	Cantidad de muestra sugerida, g
< 0.02	10



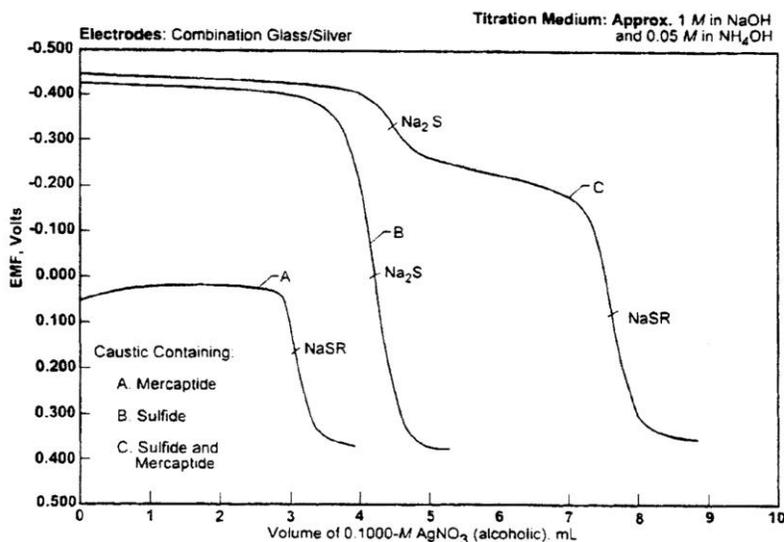
0.02 – 0.05	5
0.5 – 0.10	1
0.10 – 0.50	0.3
> 0.50	0.1

Adicionar a la muestra 100 mL del solvente de titulación y sumergir el electrodo de iones selectivos  $\text{Ag}^+/\text{S}^{2-}$ .

Una vez sumergido el electrodo esperar a que se estabilice y observar el valor obtenido en mV, para la determinación de sulfuros este deberá registrar un valor menor a -600 mV.

Valorar la disolución con nitrato de plata 0.01 N, empleando volúmenes adecuados.

La figura 6.1 muestra un ejemplo de los puntos finales observados en la titulación, donde es posible apreciar dos puntos de inflexión si la muestra contiene sulfuros y mercapturos, en el caso de solo apreciar un punto de inflexión se puede identificar el analito del que se trata en función del valor en mV obtenido para el punto final.



**Figura 6.1** Determinación del punto final de la valoración de sulfuros.



---

### **6.8 Técnica para la determinación de sólidos sedimentables, NMX-AA-004-SCFI-2000.**

#### **❖ Material.**

Cono de sedimentación tipo Imhoff de vidrio o plástico.

Soporte universal con anillo metálico.

Agitador de vidrio con una longitud de 30 cm.

Cronómetro.

#### **❖ Procedimiento.**

Mezclar perfectamente la muestra y verter 1 L de la misma en el cono, de tal manera que se lleve a su marca establecida en el recipiente. Dejar reposar la muestra contenida en el cono por un periodo de 45 min, posteriormente agitar suavemente las paredes del cono con el agitador de vidrio y dejar reposar por otros 15 min.

Registrar el volumen de sólidos sedimentables en mL/L; si el material sedimentable contiene bolsas de aire o líquido, evaluar el volumen ocupado por las mismas y restarlo al volumen de sólidos registrado.

### **6.9 Técnica para la determinación de oxígeno disuelto, NMX-AA-012-SCFI-2001.**

#### **❖ Procedimiento.**

La determinación de la cantidad de oxígeno disuelto se obtiene de manera directa empleando un medidor acoplado a una sonda. El equipo empleado para las



---

determinaciones experimentales llevadas a cabo es un medidor de oxígeno Hanna modelo HI 9143-HI 9145.

#### **6.10 Técnica para la determinación de turbidez, NMX-AA-038-SCFI-2001.**

##### **❖ Procedimiento.**

La turbiedad se determinó de manera directa empleando un turbidímetro Hanna HI 98703 obteniendo valores directos de turbiedad en unidades nefelométricas (NTU).

#### **6.11 Técnica para la determinación de pH, ASTM-D-1293-99 (2005).**

##### **❖ Procedimiento.**

Para la determinación del pH se empleó un electrodo de calomel acoplado a un pH-metro Conductronic PC 18 con resolución de  $\pm 0.01$  pH y compensador de temperatura automático, de esta forma las mediciones de pH se efectuaron de manera directa estandarizando previamente con disoluciones buffer comerciales de pH 4, 7 y 8.



## 6.12 Técnica para la determinación de la tinción de Gram (Ramírez R., et. al., 2006).

### ❖ **Reactivos.**

#### **Cristal violeta con oxalato de amonio.**

Solución A. Pesar 2 g de cristal violeta y disolver en 20 mL de etanol (95%).

Solución B. Pesar 0.8 g de oxalato de amonio y disolver en 80 mL de agua.

Solubilizar totalmente la solución de oxalato de amonio, para ello se puede dejar reposar durante 24 h ó se puede calentar débilmente hasta lograr una solubilización total. Posteriormente se mezclan las soluciones A y B, y se filtran los sólidos que se puedan tener.

**Lugol (solución de iodo iodurado).** Pesar 1.0 g de iodo metálico y 2.0 g de ioduro de potasio, en un mortero mezclar finamente y se añadir una pequeña cantidad de agua para poder lavar el material, posteriormente se aforar con 300 mL de agua destilada y agitar vigorosamente.

**Alcohol-acetona.** Mezclar 800 mL de etanol (95%) con 200 mL de acetona.

**Safranina.** Disolver 0.25 g de safranina en 10 mL de alcohol (etanol al 95%) y aforar la solución a 100 mL con agua destilada, posteriormente filtrar los sólidos remanentes empleando papel filtro.

### ❖ **Procedimiento.**

Se efectúa una fijación de los microorganismos de estudio llevando a cabo un frote en un portaobjetos previamente marcado para su identificación, para ello se coloca una gota de agua destilada y por medio de una asa previamente esterilizada con la llama del mechero se toma una pequeña porción de la muestra y se frota



---

suavemente en el área donde se colocó la gota en el portaobjetos. Posteriormente se pasa el portaobjeto sobre la llama del mechero para fijar la muestra, esto se efectúa rápidamente para así también poder evaporar el agua.

Cubrir la preparación fija con el cristal violeta de Gram y dejarlo actuar durante un minuto. Transcurrido el tiempo, lavar el exceso de colorante con agua destilada.

Cubrir la preparación con lugol y dejar actuar durante un minuto, posteriormente lavar el exceso con agua destilada.

Decolorar la preparación empleando la mezcla de alcohol-cetona, una vez que se deje de escurrir todo el colorante que se permita remover lavar la preparación con agua destilada.

Cubrir con safranina la preparación dejándola actuar durante un minuto, posteriormente escurrir el exceso con agua destilada y dejar secar al aire.

Finalmente observar la preparación al microscopio a una amplitud de 100X y en base a las observaciones se puntuará la prueba como gram positivo si la coloración de las bacterias es morada azulada, y gram negativo si se observa una coloración rosada.



---

### **6.13 Técnica empleada para el aislamiento físico de bacterias (Ramírez R., et. al., 2006).**

#### **❖ Material.**

Asa para la siembra de microorganismos.

Cajas petri con medios de cultivo sólidos preparados de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

Campana de extracción de flujo laminar ó en su defecto un mechero bunsen.

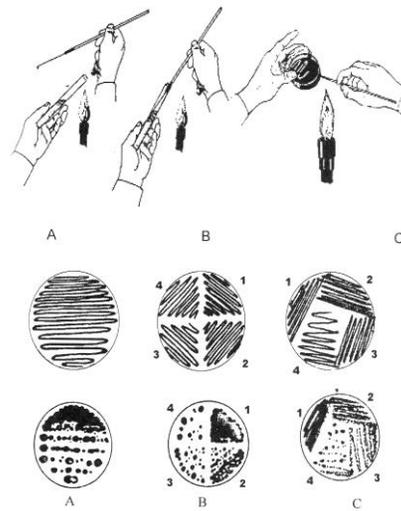
#### **❖ Procedimiento.**

Tomar una porción de muestra que contenga una determinada cantidad de lodo biológico.

Esterilizar el asa de siembra dejando la punta durante unos instantes en contacto con la flama del mechero hasta que se torne rojiza.

Enfriar el asa en el medio de cultivo sólido y tomar una muestra de lodo sumergiendo y agitando el asa dentro de la biomasa.

Efectuar un estriado dentro del medio de cultivo de acuerdo a la siguiente figura:



**Figura 6.2** Método de siembra de cultivos para el aislamiento de bacterias.

Esterilizar nuevamente el asa y repetir el procedimiento en al menos 5 cajas petri.

Incubar durante un periodo de 48 hr los medios de cultivo inoculados a 35°C.

Retirar los medios de cultivo de la incubadora y en base a las observaciones del crecimiento de las colonias presentes tomar una asada de aquellas en las que se observen características bien definidas y distinguibles, inoculando nuevos medios procedentes del cultivo madre original.

Repetir la siembra consecutivamente hasta que se aprecien crecimientos característicos constantes.



## 6.14 Procedimiento para llevar a cabo las pruebas bioquímicas.

### ❖ Prueba preliminar de oxidasa.

La determinación a la respuesta de producción de enzimas oxidasa se presenta en metabolismos aerobios, siendo esta enzima capaz de catalizar la eliminación de hidrógeno de un sustrato empleando para ello oxígeno como aceptor de electrones.

El método implementado para la determinación de la producción de oxidasa es el de la respuesta al reactivo de Kovacs, el cual consta de una disolución acuosa al 1% de tetrametil-*p*-fenilendiamina y que mediante su acción frente a colonias aisladas puede interpretarse de manera sencilla la producción de enzimas oxidasa ya que se produce una coloración lavanda o púrpura indicando que la prueba es positiva, y en caso de no presentarse coloración al aplicar dicho reactivo sobre las bacterias se consideraran como negativas a la producción de enzimas oxidasa.

Para llevar a cabo la determinación de la producción de enzimas oxidasa se emplea el reactivo BactiDrop Oxidase, el cual es una formulación derivada del reactivo de Kovacs. De esta forma empleando papeles filtro se coloca una porción de muestra de bacterias aisladas empleando un asa microbiológica previamente esterilizada y una gota del reactivo, de tal forma que se puntea la prueba como positiva ó negativa de acuerdo a lo anteriormente mencionado.

### ❖ Pruebas bioquímicas empleando el kit Remel Rapid.

El sistema de identificación comercial proporcionado por el fabricante (Remel) está basado en una serie de pruebas bioquímicas comunes en donde la interacción que se lleva a cabo entre los microorganismos y los reactivos dan como resultado un cambio en la coloración ya que los reactivos son sustratos cromogénicos que de manera cualitativa indican la presencia de sistemas enzimáticos característicos de los organismos en cuestión.



Partiendo de un cultivo aislado y efectuando pruebas de tinción de gram y oxidasa, se seleccionaron los sistemas adecuados siendo la principal condicionante el resultado de la prueba de oxidasa, de tal forma que si esta era positiva se emplearía el sistema RapID NF plus y en caso de ser negativa se emplearía el sistema RapID ONE, cuyo principio y componentes se muestran en las siguientes tablas:

Principios y componentes del sistema RapID™ ONE						
N° de pocillo	Código de la prueba	Ingredientes de los reactivos	Cantidad	Principio	Bibliografía	
1	URE	Urea	0,25%	La hidrólisis de la urea da lugar a productos alcalinos que aumentan el pH y cambian el indicador.	1, 3	
2	ADH	Arginina	1,0%	La hidrólisis del sustrato aminoácido da lugar a productos alcalinos que aumentan el pH y cambian el indicador.	1-3	
3	ODC	Ornitina	1,0%			
4	LDC	Lisina	1,0%			
5	TET	Tiol alifático	0,2%	La utilización del compuesto de tiol da lugar a productos ácidos que bajan el pH e inducen el cambio del indicador.	4	
6	LIP	Éster de ácido graso	1,0%	La hidrólisis del ácido graso da lugar a productos ácidos que bajan el pH e inducen el cambio del indicador.	3, 4	
7	KSF	Aldehído de azúcar	1,0%	La utilización del hidrato de carbono como sustrato da lugar a productos ácidos que bajan el pH e inducen el cambio del indicador.	3, 4	
8	SBL	Sorbitol	1,0%			
9	GUR	p-nitrofenil-β-D-glucuronida	0,1%			
10	ONPG	o-nitrofenil-β-D-galactósido	0,1%	La hidrólisis enzimática del glucósido incoloro aril-sustituido o fosfoéster libera o- o p-nitrofenil amarillo.	1, 3, 4-7	
11	βGLU	p-nitrofenil-β-D-glucósido	0,1%			
12	βXYL	p-nitrofenil-β-D-xilósido	0,1%			
13	NAG	p-nitrofenil-n-acetil-β-D-glucosaminida	0,1%			
14	MAI	Malonato	0,5%	La utilización del malonato da lugar a productos alcalinos que aumentan el pH e inducen el cambio del indicador.	1, 3	
15	PRO	Prolina-β-naftilamida	0,1%	La hidrólisis enzimática del sustrato de arilamida libera β-naftilamina que se detecta con el reactivo RapID™ ONE.	2, 7	
16	GGT	γ-glutamil-β-naftilamida	0,1%			
17	PYR	Pirrolidoniol-β-naftilamida	0,1%			
18	ADON	Adonitol	1,0%	La utilización del hidrato de carbono como sustrato da lugar a productos ácidos que bajan el pH e inducen el cambio del indicador.	1, 3	
18	IND	Triptófano	0,4%	La utilización de triptófano da lugar a la formación de indol, que se detecta con el reactivo RapID™ Spot Indole.	1-3	

Principios y componentes del sistema RapID™ NF Plus						
N° de pocillo	Código de la prueba	Ingredientes de los reactivos	Cantidad	Principio	Bibliografía	
<b>Antes de la adición del reactivo:</b>						
1	ADH	Arginina	1,0%	La hidrólisis de la arginina libera productos alcalinos que aumentan el pH y cambian el indicador.	1-3	
2	TRD	Tiol alifático	0,2%	La utilización de este sustrato reduce el pH e induce el cambio del indicador.	3	
3	EST	Triglicérido	1,0%	La hidrólisis del lípido libera ácidos grasos que reducen el pH e inducen el cambio del indicador.	1-4	
4	PHS	p-nitrofenil-fosfoéster	0,1%	La hidrólisis enzimática del glucósido incoloro aril-sustituido o fosfoéster libera o- o p-nitrofenol amarillo.	2,3,5,6	
5	NAG	p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glucosaminida	0,1%			
6	αGLU	p-nitrofenil-α-D-glucósido	0,1%			
7	βGLU	p-nitrofenil-β-D-glucósido	0,1%			
8	ONPG	p-nitrofenil, β-D-galactósido	0,1%			
9	URE	Urea	0,25%	La hidrólisis de la urea da lugar a productos alcalinos que aumentan el pH y cambian el indicador.	1-3	
10	GLU	Glucosa	1,0%	La utilización de la glucosa reduce el pH e induce el cambio del indicador.	1-3	
<b>Después de añadir el reactivo:</b>						
4	PRO	Prolina-β-naftilamida	0,1%	La hidrólisis enzimática del sustrato de arilamida libera β-naftilamina que se detecta con el reactivo RapID™ NF Plus.	4, 6-10	
5	PYR	Pirrolidina-β-naftilamida	0,1%			
6	GGT	γ-glutamil β-naftilamida	0,1%			
7	TRY	Triptófano β-naftilamida	0,1%			
8	BANA	N-bencil-arginina-β-naftilamida	0,1%			
9	IND	Triptófano	0,4%	La utilización de triptófano da lugar a la formación de indol, que se detecta con el reactivo RapID™ Spot Indole.	1-3	
10	NO <sub>2</sub>	Nitrato sódico	1,0%	La utilización del ión nitrato da lugar a la formación de nitrito, que se detecta con el reactivo RapID™ Nitrate A.	1-3	

Figura 6.3 Principios y componentes de los sistemas RapID™.



---

Para efectuar la prueba se toma una porción de la muestra aislada en un medio nutritivo empleando para ello un asa microbiológica, posteriormente se suspende en un líquido de inoculación (composición de 6.0 g KCl/L y 0.5 g CaCl<sub>2</sub>/L) hasta obtener una turbidez visual equivalente al estándar de McFarland de 2 para el caso de emplear el sistema RAPID ONE y de 3 si se emplea el sistema RAPID NF plus.

Una vez obtenida la suspensión, se inocula el sistema de tal forma que todos los pocillos contengan una porción lo más homogéneamente posible, para posteriormente incubar durante 4 horas a una temperatura de entre 35 y 37°C.

Concluido el periodo de incubación, se puntea la prueba de acuerdo a las siguientes tablas:



**Interpretación de las pruebas del sistema RapID™ ONE\***

N° de pocillo	Código de la prueba	Reactivo	Reacción		Comentario
			Positivo	Negativo	
1	URE	Ninguno	Rojo o violeta	Amarillo o naranja	Sólo se debe puntuar como positivo el desarrollo de un color rojo o violeta bien definido.
2	ADH	Ninguno	Morado intenso o azul	Amarillo, gris, pajizo o amarillo-verde	Sólo se debe puntuar como positivo el desarrollo de un color morado intenso o azul bien definido. Los matices de amarillo, gris, pajizo, marrón o verde se deben puntuar como negativos.
3	ODC				
4	LDC				
5	TET	Ninguno	Amarillo	Rojo o naranja	Sólo se debe puntuar como positivo el desarrollo de un color amarillo bien definido en todo el pocillo. No se debe interpretar como positivo la existencia de capas de color amarillo. Se puede mezclar el contenido del pocillo con una varilla aplicadora para mejorar la lectura.
6	LIP				
7	KSF				
8	SBL				
9	GUR	Ninguno	Amarillo	Transparente o tostado	Sólo se debe puntuar como positivo el desarrollo de un color amarillo bien definido. Los tonos muy tenues de amarillo o los colores dudosos se puntuarán como negativos.
10	ONPG				
11	μGLU				
12	μXYL				
13	NAG				
14	MAL	Ninguno	Rojo	Amarillo o naranja	Sólo se debe puntuar como positivo el desarrollo de un color rojo bien definido. Los tonos de naranja se puntuarán como negativos.
15	PRO	Reactivo RapID™ ONE	Violeta, morado, rojo o rosa oscuro	Transparente, amarillo, naranja o rosa muy pálido	Sólo se puntuará como positivo cualquier desarrollo de un color violeta, morado, rojo bien definido o rosa oscuro. El naranja pálido o los tonos tenues de rosa se puntuarán como negativos.
16	GGT				
17	PYR				
18	ADON	Ninguno	Amarillo o naranja muy claro	Rojo o rojo-naranja oscuro	El desarrollo de cualquier tono de amarillo o amarillo-naranja en la totalidad del pocillo se debe puntuar como positivo.
19	IND	Reactivo RapID™ Spot Indole	Marrón, negro o morado	Naranja o rojo	El desarrollo de cualquier color marrón, negro o morado se debe puntuar como positivo.

\*NOTA: Los paneles se deben leer mirando a través de los pocillos de reacción sobre un fondo blanco.

**Interpretación de las pruebas del sistema RapID™ NF Plus\***

N° de pocillo	Código de la prueba	Reactivo	Reacción		Comentario
			Positivo	Negativo	
<b>Antes de la adición del reactivo:</b>					
1	ADH	Ninguno	Rojo	Amarillo o naranja claro	Sólo se debe puntuar como positivo el desarrollo de un color rojo bien definido.
2	TRD	Ninguno	Amarillo, dorado o amarillo-naranja	Rojo o naranja	Sólo se debe puntuar como positivo el desarrollo de un color amarillo, dorado o amarillo-naranja en la totalidad del pocillo. Puede formarse una capa amarillenta en la parte superior del pocillo. Agitar suavemente el panel para mezclar y puntuar de la forma indicada arriba.
3	EST	Ninguno	Amarillo, dorado amarillo-naranja o naranja claro	Rojo o naranja oscuro	Sólo se debe puntuar como positivo el desarrollo de un color amarillo, dorado, amarillo-naranja o naranja claro en la totalidad del pocillo. Puede formarse una capa roja en la parte superior del pocillo. Agitar suavemente el panel para mezclar y puntuar de la forma indicada arriba.
4	PHS	Ninguno	Amarillo	Transparente o tostado claro	El desarrollo de cualquier tono de amarillo en la totalidad del pocillo se debe puntuar como positivo.
5	NAG				
6	μGLU				
7	μGLU				
8	ONPG	Ninguno	Rojo	Amarillo, amarillo-naranja o naranja	Sólo se debe puntuar como positivo el desarrollo de un color rojo bien definido en todo el pocillo.
9	URE				
10	GLU	Ninguno	Amarillo	Azul, azul-verde, o verde	Sólo un color amarillo bien definido en la totalidad del pocillo se debe puntuar como positivo. Anote el color del pocillo en el espacio adecuado del formulario de resultados, como información de referencia si es necesario contar con características adicionales para la identificación.
<b>Después de añadir el reactivo:</b>					
4	PRO	Reactivo RapID™ NF Plus	Morado, violeta, rojo, naranja oscuro o rosa oscuro	Transparente, tostado, naranja claro o rosa pálido	Sólo se puntuará como positivo un desarrollo significativo del color. Los matices de color claro se puntuarán como negativos.
5	PYR				
6	GGT				
7	TRY				
8	BANA	Reactivo RapID™ Spot Indole	Marrón o negro	Naranja o rojo	El desarrollo de cualquier color marrón o negro se debe puntuar como positivo. Cualquier otro color se puntuará como negativo.
9	IND				
10	NO <sub>3</sub>	Reactivo RapID™ Nitrate A	Rojo o naranja	Transparente, tostado o amarillo	El desarrollo de cualquier color rojo o naranja se debe puntuar como positivo. Nota: NO SE REQUIERE el reactivo RapID™ Nitrate B.

\*NOTA: Los paneles se deben leer mirando a través de los pocillos de reacción sobre un fondo blanco.

**Figura 6.4** Interpretación de las pruebas del sistema RapID™.

De esta forma en base a los resultados obtenidos se puede obtener un micro código que mediante el empleo del software ERIC proporcionado por el fabricante permite la identificación.



---

## 7. REFERENCIAS.

- BARRON R., 1998. Desarrollo de un proceso a nivel de laboratorio para la recuperación de aromaticos de las corrientes de sosas gastadas de las refinerías. Tesis de maestría, Facultad de Química, UNAM.
- BITTON GABRIEL, 1994. Wastewater Microbiology. 1ª edición. Ed. Wiley-Liss. Capítulos 1, 2 y 3.
- GARCÍA S., 2008. Oxidación química de aminos gastadas provenientes de procesos de endulzamiento de gas en refinerías. Tesis de maestría, Facultad de Química, UNAM.
- GARY J., HANDWERK G., 2001. Petroleum Refining Technology and Economics. 4ª edición. Ed. Marcel Dekker, Inc.
- GERARDI H. MICHAEL, 2006. Wastewater Bacteria. 1ª edición. Ed. Wiley-Interscience.
- JOO H., HIRAI M., SHODA M., 2005. Characteristics of Ammonium Removal by Heterotrophic Nitrification-Aerobic Denitrification by *Alcaligenes faecalis* No. 4. Journal of Bioscience and Bioengineering, Vol. 100(2) 184 – 191.
- LENORE S. CLESCERI, ARNOLD E. GREENBERG, R. RHODES TRUSSELL, 1992. Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales (APHA-AWWA-WPCF). Ed. Díaz de Santos. Método 4500-N ( $\text{NH}_3$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{NO}_3$ ,  $\text{N}_{\text{ORG}}$ ) y 5310.



- LEVENSPIEL OCTAVE, 2004. Ingeniería de las reacciones químicas. 3ª edición. Ed. Limusa Wiley. Capítulos 3, 27, 28 y 29.
- MACFADDIN F. JEAN, 2004. Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica. 3ª edición. Ed. Médica Panamericana.
- MACÍAS R., 2007. Degradación biológica de aminas gastadas provenientes de los procesos de endulzamiento de gas en una refinería. Tesis de maestría, Facultad de Ingeniería, UNAM.
- MAIER M. RAINA, PEPPER L. IAN, GERBA P. CHARLES, 2000. Environmental Microbiology. 1ª edición. Ed. Academic Press. pp. 19 – 54, 213 – 224.
- MARISCAL G., 2010. Evaluación técnica de un soporte plástico en un reactor de lecho fijo para degradar compuestos fenólicos. Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM.
- METCALF & EDDY, 2003. Wastewater Engineering. Treatment and Reuse. 4ª edición. Ed. Mc. Graw Hill.
- MORENO I., 2006. Biodegradación óptima de compuestos fenólicos en un reactor discontinuo secuencial. Tesis de doctorado, Instituto de Ecología, UNAM.
- NAKAZAWA A., ALCANTAR F., 2007. Pruebas biológicas por lotes para la degradación de aminas gastadas provenientes de refinerías. Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM.



- 
- NISHIO T., YOSHIKURA T., MISHIMA H., INOUYE Z., ITOH H., 1998. Conditions for Nitrification and Denitrification by an Immobilized Heterotrophic Nitrifying Bacterium *Alcaligenes faecalis* OKK17. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, Vol. 86(4) pp. 351 – 356.
  - RAMÍREZ R., LUNA B., MEJÍA A., VELÁZQUEZ O., TSUZUKI G., VIERNA L., HERNÁNDEZ L., 2006. Manual de prácticas de microbiología general. Facultad de Química, UNAM.
  - SCRAGG ALAN, 2011. Biotecnología para Ingenieros. Sistemas biológicos en procesos tecnológicos. 1ª edición. Ed. Limusa.
  - SCRAGG ALAN, 1999. Biotecnología Ambiental. 1ª edición. Ed. Acriba. pp. 57 – 95.
  - SHEILAN H. MICHAEL, SPOONER H. BEN, 2007. Amine Treating and Sour Water Stripping. 1ª edición. Ed. Amine experts.
  - SINGLETON PAUL, 2004. Bacterias en Biología, Biotecnología y Medicina. 5ª edición. Ed. Acriba.