



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO



INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
ÁREA ACADÉMICA DE QUÍMICA

PROPUESTA PARA REDUCIR LA CONTAMINACIÓN DE EFLUENTES CON BAJA RELACIÓN CARBONO: NITRÓGENO

TESIS
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN QUÍMICA EN ALIMENTOS

PRESENTA:

Isauro Vázquez Teopa

DIRECTORES

**Dra. Gabriela A. Vázquez Rodríguez
M. en Q. Juan Ramírez Godínez**

Mineral de la Reforma, Hgo., septiembre de 2014



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
ÁREA ACADÉMICA DE QUÍMICA

**M. en A. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO,
DIRECTOR DE CONTROL ESCOLAR
DE LA U.A.E.H.,
Presente:**

Por este conducto le comunico que el jurado asignado a el pasante de la Licenciatura de Química en Alimentos **Vázquez Teopa Isauro**, quien presenta el trabajo de investigación "**Propuesta para reducir la contaminación de efluentes con baja relación carbono:nitrógeno**", después de revisar el trabajo en reunión de Sinodales, estos han decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del Jurado:

Presidente	Dra. Gabriela A. Vázquez Rodríguez	
Primer vocal	M. en Q. Juan Ramírez Godínez	
Segundo vocal	Dra. Rosa Icela Beltrán Hernández	
Tercer vocal	Dra. Elizabeth Contreras López	
Secretario	Dra. Claudia Coronel Olivares	
Primer suplente	Dra. Araceli Castañeda Ovando	
Segundo suplente	Dr. Carlos Lucho Constantino	

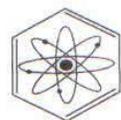
Sin otro particular, reitero a usted la seguridad de mi atenta consideración.

ATENTAMENTE
"Amor, Orden y Progreso"
Pachuca Hidalgo, 10 de julio de 2014.

Dr. Gian Arturo Álvarez Romero
Coordinador Adjunto de la Licenciatura de
Química en Alimentos



Area Académica de Química,
Carretera Pachuca-Tulancingo Km. 4.5,
Ciudad del Conocimiento, Colonia Carboneras,
Mineral de la Reforma, Hidalgo, México, C.P. 42184
Tel. +52 771 7172000 exts 2200, 2201, Fax 6502
galaav@uaeh.edu.mx



A la Dra. Gabriela que me apoyó desde el momento en que llegué al laboratorio, por su paciencia, su dedicación y excelente disposición para que todo saliera de la mejor manera y por el tiempo dedicado a la realización de este proyecto, muchas gracias.

A Juan que me brindó su amistad y abrió camino para que llegara al laboratorio y aprendiera demasiadas cosas nuevas.

Agradezco a mis sinodales, Dra. Araceli, Dra. Claudia, Dra. Icela. Dra. Elizabeth y Dr. Carlos, quienes ayudaron a la mejor comprensión de este trabajo.

A mis amigos Gaby, Marisol, Julieta, Joel y Aldahír que hicieron que las situaciones difíciles se pasaran rápido, por tantos momentos divertidos que hemos compartido, gracias amigotes. A Roberto y Chucho quienes conocí poco después, con quienes me entiendo muy bien y la pasamos riendo. A excelentes amigos a quienes aprecio, Isela, Katy, Brian, Irving y Karina.

Dedicatorias

A Lina, mi lindura, a quien debo todo lo que soy, por preocuparse por mi bienestar en todo momento, por ser la guía que Dios me dio para superar todas las adversidades y tomar las mejores decisiones, por estar siempre dispuesta a hacer todo posible e imposible por verme feliz y así ha sido, gracias, te amo mamá.

A Dulce, Mario, y Paco Jr. porque desde que nacieron dieron alegrías a mi vida, por que soportan mi forma de ser, pero ya saben cuánto los quiero. A Paco por apoyarme en todo momento y por tu buen ejemplo.

Para mi hermosa familia de la cual siempre recibo mucho cariño, además siempre tienen palabras lindas de aliento y halagos que no siempre merezco. A mi abuela Guadalupe y mi abuelo Isauro. A mis lindas tías, Tere, Nora, Guadalupe, Ma. De Jesús, Ángeles y Olivia, a mis tíos, Toño, Omar, Noé y Pablo, y las increíbles familias que formaron cada uno de ustedes. A mis primos, en especial a los que están en un mejor lugar, a todos los que están por aquí, que me encanta verlos, convivir y platicar con ustedes.

Para el mejor amigo, Joaquín, simplemente eres mi inseparable hermano.

A mi abue Clorynda.

Índice general

Índice de tablas	iii
Índice de figuras	iv
1. Introducción	1
2. Marco teórico	2
2.1 El nitrógeno en el medio acuático	2
2.2 Efectos de la contaminación del agua por compuestos nitrogenados	3
2.3 Remoción biológica de nitrógeno	3
2.3.1 Bacteriología de la nitrificación	5
2.3.2 Bacteriología de la desnitrificación	6
2.4 Aislamiento de bacterias implicadas en la remoción de nitrógeno.....	6
2.4.1 Aislamiento de bacterias nitrificantes	6
2.4.2 Aislamiento de bacterias desnitrificantes.....	8
2.5 Tratamiento biológico de efluentes con baja relación C:N.....	8
2.5.1 Uso de fuentes naturales de carbono.....	9
3. Planteamiento del problema y justificación	11
3.1 Planteamiento del problema.....	11
3.2 Justificación	11
4. Objetivos	12
4.1 General.....	12
4.2 Específicos	12
5. Materiales y métodos.....	13
5.1 Aislamiento de bacterias	13
5.1.1 Muestreo de agua de la presa “El durazno”	13
5.1.2 Cultivo de bacterias.....	13
5.1.3 Descripción morfológica de las colonias aisladas.....	16
5.1.4 Tinción de Gram.....	16
5.2 Verificación de la actividad de las bacterias aisladas	17
5.2.1 Seguimiento del crecimiento bacteriano	17
5.3 Selección de un material natural como fuente de carbono	17
5.3.1 Descripción de los materiales.....	17
5.3.2 Pruebas de lixiviación.....	17
5.4 Técnicas analíticas	18
5.4.1 pH	18
5.4.2 DQO.....	18
5.4.3 COT	18

5.4.4 UV ₂₅₄	18
5.4.5 DBO ₅	18
5.4.6 Nitrógeno total Kjeldahl (NTK).....	19
5.4.7 N-NH ₄ ⁺	20
5.4.8 N-NO ₂ ⁻	20
5.4.9 N-NO ₃ ⁻	20
5.4.10 PO ₄ ³⁻	20
6. Resultados y discusión	21
6.1 Aislamiento de bacterias transformadoras de compuestos nitrogenados.....	21
6.1.1 Tinción de Gram.....	22
6.2 Verificación de la actividad de las colonias aisladas.....	24
6.2.1 Bacterias nitritantes.....	24
6.2.2 Bacterias nitratantes.....	27
6.2.3 Bacterias desnitrificantes.....	28
6.3 Selección de un material natural como fuente de carbono.....	29
6.3.1 pH.....	29
6.3.2 DQO.....	30
6.3.3 COT.....	31
6.3.4 UV ₂₅₄	33
6.3.5 DBO ₅	35
6.3.6 N-Kjeldahl.....	36
6.3.7 N-NO ₃ ⁻	37
6.3.8 PO ₄ ³⁻	38
7. Conclusiones y perspectivas	40
8. Referencias bibliográficas	41

Índice de tablas

Tabla 5.1 Medio de cultivo para bacterias nitritantes	14
Tabla 5.2 Medio de cultivo para bacterias nitratantes	15
Tabla 5.3 Medio de cultivo para bacterias desnitrificantes	15

Índice de figuras

Figura 2.1 Ciclo del nitrógeno	5
Figura 5.1 Presa "El durazno"	13
Figura 5.2 Medios selectivos líquidos en incubación	14
Figura 5.3 Descripción de las características de colonias bacterianas	16
Figura 6.1 Colonias obtenidas en medio nitritante.....	21
Figura 6.2 Colonias obtenidas en medio nitratante.....	21
Figura 6.3 Colonias obtenidas en medio desnitrificante	21
Figura 6.4 Bacterias aisladas en medio nitritante después de la tinción de Gram	23
Figura 6.5 Bacterias aisladas en medio nitratante después de la tinción de Gram	23
Figura 6.6 Bacterias aisladas en medio desnitrificante después de la tinción de Gram ..	23
Figura 6.7 Crecimiento del cultivo nitritante	25
Figura 6.8 Consumo de $N-NH_4^+$ del cultivo nitritante	26
Figura 6.9 Crecimiento del cultivo nitratante	27
Figura 6.10 Consumo de DQO del cultivo desnitrificante	28
Figura 6.11 Valores de pH medidos en el lixiviado de cebada.....	30
Figura 6.12 DQO en lixiviados de aserrín, cáscaras de cacahuete y cebada	31
Figura 6.13 DQO lixiviada por gramo de aserrín, cáscaras de cacahuete y cebada.....	32
Figura 6.14 COT en lixiviados de aserrín, cáscaras de cacahuete y cebada.....	33
Figura 6.15 UV_{254} en lixiviados de aserrín, cáscaras de cacahuete y cebada.....	34
Figura 6.16 Materia orgánica lixiviada por los tres materiales naturales de estudio.....	36
Figura 6.17 NTK en lixiviados de aserrín, cáscaras de cacahuete y cebada	37
Figura 6.18 $N-NO_3^-$ en lixiviados de aserrín, cáscaras de cacahuete y cebada	38
Figura 6.19 PO_4^{3-} en lixiviados de aserrín, cáscaras de cacahuete y cebada.....	39

1. Introducción

La eutrofización es un problema de contaminación del agua debido al enriquecimiento excesivo de nutrientes (nitrógeno y fósforo), que provoca el aumento de la producción de biomasa y afecta así la calidad del agua y los ecosistemas. La escorrentía agrícola y urbana, la ganadería, la acuicultura, la industria (en particular la de alimentos y papel) y las aguas residuales que no reciben tratamiento son las principales fuentes de contaminación por compuestos nitrogenados.

Existen diferentes alternativas para mitigar este problema, entre las que se destacan los procesos biológicos. La remoción total de nitrógeno por esta vía se basa en el acoplamiento de la nitrificación y la desnitrificación microbianas. La nitrificación consiste en la oxidación aerobia del amonio a nitrito y luego a nitrato; cada una de las etapas de esta reacción es catalizada por un grupo distinto de bacterias autótrofas (*i. e.*, que utilizan fuentes inorgánicas de carbono). En la desnitrificación, el nitrato se reduce a N_2 en condiciones anóxicas gracias a la acción de bacterias heterótrofas (*i.e.*, que utilizan compuestos orgánicos como fuente de carbono).

La nitrificación y la desnitrificación son la base tanto del ciclo biogeoquímico de este elemento a nivel planetario como de los bioprocesos de eliminación del nitrógeno del agua. En ambos casos, el factor crítico es la actividad de los grupos bacterianos implicados. En el caso particular de la desnitrificación, otro factor crucial es la relación carbono:nitrógeno (C:N) de las aguas residuales, ya que la falta de carbono orgánico compromete la actividad de las bacterias heterótrofas. Este problema se presenta en diferentes tipos de agua, tales como los efluentes acuícolas o la de acuíferos impactados por actividades agrícolas.

En este trabajo se buscó contribuir al desarrollo de procesos biológicos de remoción total de nitrógeno de aguas residuales con un desbalance en la relación C:N. Con tal fin, nos propusimos aislar bacterias nitrificantes y desnitrificantes a partir de muestras de agua natural. Así mismo, nos planteamos como objetivo estudiar la factibilidad del uso de tres materiales vegetales de bajo costo como fuentes exógenas de carbono, que permitieran el tratamiento de efluentes con relaciones C:N desproporcionadamente bajas.

2. Marco teórico

2.1 El nitrógeno en el medio acuático

El nitrógeno es un nutriente esencial para la síntesis de proteínas, ácidos nucleicos, fosfatos de adenosina, nucleótidos de piridina y una gran variedad de biomoléculas (Hagopian y Riley, 1998).

En el agua la química del nitrógeno es compleja, debido a que este elemento puede tener diferentes estados de oxidación a raíz de la acción de organismos vivos. Sin embargo en los sistemas acuáticos solo predominan unas cuantas especies, a saber nitrógeno orgánico, N-NH_4^+ , N-NO_2^- y N-NO_3^- .

El nitrógeno orgánico se refiere principalmente al nitrógeno contenido en compuestos de desecho provenientes de organismos vivos y muertos, tales como proteínas, polipéptidos, aminoácidos y urea, en donde el nitrógeno tiene un estado de oxidación de -3.

El N-NH_4^+ puede originarse por la amonificación del nitrógeno orgánico o bien por el equilibrio ácido-base del NH_3 (Ecuación 2.1), que es un producto químico de amplio uso industrial. En ambos compuestos (*i. e.*, NH_4^+ y NH_3), el estado de oxidación del nitrógeno también es -3.



El N-NO_2^- existe en el agua en un estado de oxidación intermedio (+3) y en un intervalo de potencial redox (pE) relativamente estrecho (Manahan, 2007). Una fuente de nitritos es la oxidación del NH_4^+ por parte de bacterias nitrificantes autótrofas (§ 2.3). Así mismo, suele añadirse ion nitrito a algunas aguas de procesos industriales como inhibidor de la corrosión. Sin embargo, esta forma del nitrógeno rara vez se encuentra en concentraciones mayores que 1 mg/L, incluso en los efluentes de las plantas de tratamiento de efluentes. Su concentración en aguas superficiales y profundas es bastante menor que 0.1 mg/L (Sawyer *et al.*, 2001).

Por último, cuando se encuentra en forma de nitratos, el estado de oxidación del nitrógeno es máximo e igual a +5. La especie N-NO_3^- se asocia por lo general a la aplicación de fertilizantes. Los nitratos suministrados en exceso a las necesidades de la vida vegetal son transportados por el agua que se filtra a través del suelo, debido a que éste no tiene la capacidad para retenerlos. Por esta razón, la contaminación del agua de escorrentía agrícola y del agua subterránea debida a esta especie es bastante común.

2.2 Efectos de la contaminación del agua por compuestos nitrogenados

Los efectos de los contaminantes nitrogenados son diversos. El nitrógeno orgánico, el amonio y los nitritos son especies que consumen el oxígeno disuelto y que deterioran la calidad del agua al generar grandes zonas hipóxicas (“muertas”) como las que existen en el Golfo de México y en la Bahía Chesapeake (Schmidt y Clark, 2013).

En el caso específico del N-NH_4^+ , su toxicidad se atribuye a la concentración de la especie no ionizada con la que está en equilibrio (NH_3 ; Ecuación 2.1). Esto se debe a su habilidad para moverse a través de las membranas celulares (Ramírez *et al.*, 2013). Dado que la exposición crónica a bajas concentraciones de NH_3 reduce el crecimiento de peces y aumenta su susceptibilidad a enfermedades, es necesario limitar la presencia de este contaminante en el medio acuático natural.

Por otra parte, en 1940 se descubrió que el agua potable con alto contenido de nitratos causa metahemoglobinemia en niños. A partir de investigaciones en Iowa, Minnesota y Ohio, en donde el problema había sido más agudo, se concluyó que se debe limitar la concentración de N-NO_3^- en el agua de suministro (Sawyer *et al.*, 2001). El mecanismo de toxicidad de esta especie es la transformación irreversible de la hemoglobina a metahemoglobina, ya que esta última es incapaz de unirse al oxígeno y transportarlo por el sistema circulatorio (Ramírez *et al.*, 2013).

No obstante, el problema más grave asociado a los compuestos nitrogenados es la eutrofización. El término eutrofización, derivado de la palabra griega que significa “bien nutrido”, describe una condición de los lagos o embalses que conlleva el crecimiento excesivo de algas. Aunque una cierta productividad de éstas es necesaria para sostener la cadena alimenticia en un ecosistema acuático, el crecimiento en exceso bajo condiciones eutróficas puede eventualmente llevar a un deterioro severo del reservorio o cuerpo de agua (Manahan, 2007). Por esta razón la ONU (2014) considera que la eutrofización es el problema de contaminación del agua más extendido en el mundo.

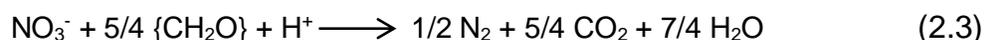
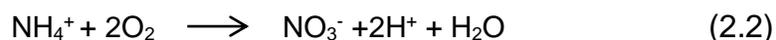
2.3 Remoción biológica de nitrógeno

Para la eliminación de compuestos nitrogenados del agua pueden usarse tanto métodos fisicoquímicos como microbiológicos. A diferencia de los primeros, que se basan esencialmente en técnicas de separación, los procesos biológicos resuelven el problema de raíz y son por lo tanto los más aplicados.

Los métodos biológicos pueden ser asimilativos o desasimilativos. En un tratamiento asimilativo, los contaminantes se incorporan a la biomasa algal o vegetal y

contribuyen a mantener un miniecosistema. Si el proceso se opera adecuadamente, este ecosistema en miniatura reduce el impacto global del proceso de tratamiento del agua (Ramírez *et al.*, 2013).

Los tratamientos desasimilativos se basan en una serie de reacciones redox que transforman los contaminantes en compuestos inorgánicos inocuos por acción bacteriana (Martins *et al.*, 2010). Estos métodos permiten la eliminación completa del N, ya que sus productos finales son CO₂ y N₂ (Cervantes *et al.*, 2000). Esto ocurre por el acoplamiento de la nitrificación (Ecuación 2.2) y la desnitrificación (Ecuación 2.3).



La nitrificación (Ecuación 2.2) se lleva a cabo bajo condiciones aerobias y en dos etapas: i) oxidación de amonio a nitrito (Ecuación 2.4) y ii) oxidación de nitrito a nitrato (Ecuación 2.5). No se tiene conocimiento de ningún microorganismo que por sí solo oxide directamente el amonio a nitrato (Cervantes *et al.*, 2000).



Por lo general, el proceso desnitrificante (Ecuación 2.3) ocurre en medios anóxicos, e implica la oxidación de compuestos orgánicos que fungen como fuentes de carbono y de energía, y la reducción de los nitratos a nitrógeno molecular en su calidad de aceptores de electrones. Esta reducción ocurre en varias etapas, y necesita la acción de varias enzimas. Así, la primera etapa de la desnitrificación (*i. e.*, la reducción del nitrato a nitrito) se lleva a cabo gracias a la nitrato reductasa. Luego, la nitrito reductasa y la óxido nítrico reductasa convierten sucesivamente el NO₂⁻ a NO y a N₂O. Por último, la transformación del N₂O a N₂ es catalizada por la óxido nitroso reductasa. Esta enzima se inhibe fuertemente por la presencia de oxígeno; si esto ocurre, el producto final de la desnitrificación será el N₂O, que es un gas de potente efecto invernadero. En consecuencia, la eficacia y la sustentabilidad del proceso desnitrificante dependen de que se evite la presencia de oxígeno en el sistema de tratamiento.

Las bacterias nitrificantes y desnitrificantes son esenciales en el ciclo biogeoquímico del nitrógeno, que se muestra en la Figura 2.1.

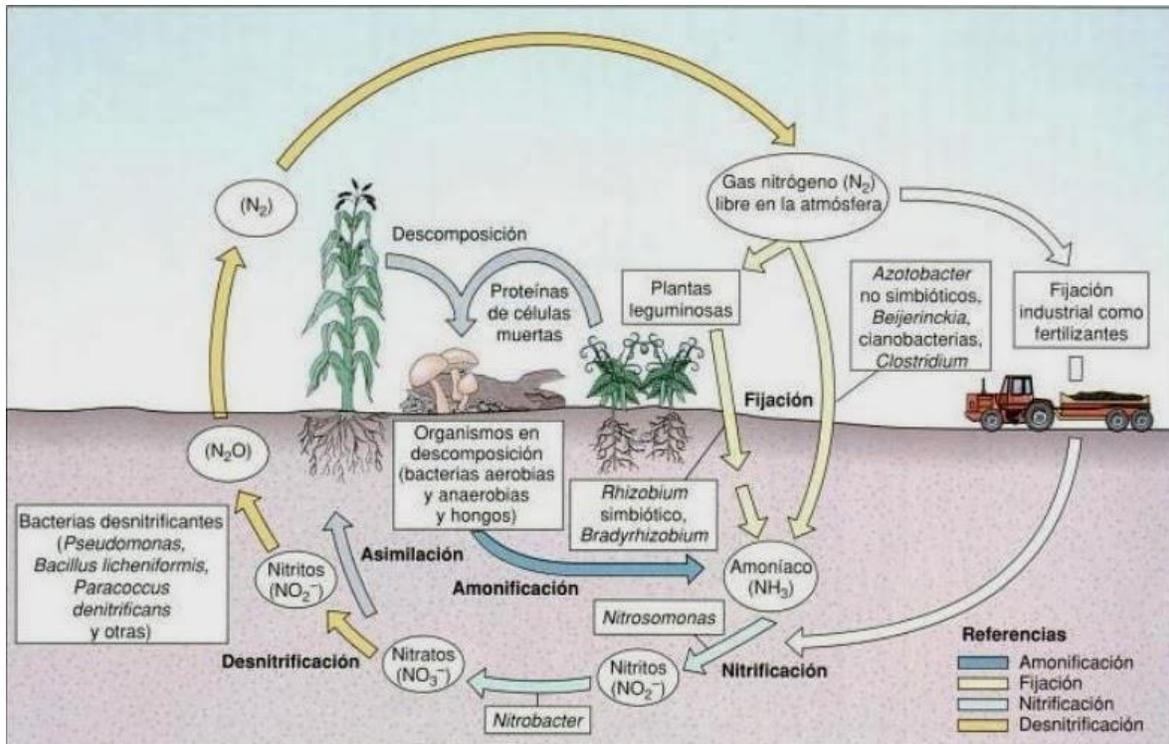


Figura 2.1 Ciclo del nitrógeno (tomado de Tortora *et al.*, 2007).

2.3.1 Bacteriología de la nitrificación

La nitrificación ocurre gracias a un grupo de géneros bacterianos (llamados *nitritantes*) capaces de oxidar el amonio a nitrito porque lo utilizan como fuente de energía. Posteriormente, los géneros de bacterias *nitratantes* utilizan como fuente de energía al nitrito y lo oxidan a nitrato. Ambos grupos son quimioautótrofos, es decir, se caracterizan por su habilidad para utilizar compuestos inorgánicos como fuente de carbono (CO_2 y HCO_3^-).

Las bacterias nitrificantes poseen mecanismos de supervivencia que les permiten encontrarse distribuidos universalmente en ecosistemas terrestres y acuáticos. Se han aislado incluso de escombros de la construcción (Hagopian y Riley, 1998).

Las principales bacterias implicadas en la primera fase de la nitrificación pertenecen a los géneros *Nitrosomonas*, *Nitrosospira*, *Nitrosolobus* y *Nitrosovibrio*. En la segunda fase participan *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospira* y *Nitrospina*.

Nitrosomonas europaea es la más citada y ampliamente estudiada de las bacterias nitritantes; tiene un tamaño promedio de $0.8 \times 1-2 \mu m$ y es ubicua en suelos. Otras especies de *Nitrosomonas* tienen dos flagelos y se encuentran en agua y sedimentos marinos (Hagopian y Riley, 1998).

Todos los miembros de la familia *Nitrobacteraceae* son Gram-negativos y no esporulados; pueden ser esféricos, bacilares o espirales.

2.3.2 Bacteriología de la desnitrificación

Las bacterias implicadas en la desnitrificación son bioquímica y taxonómicamente muy diversas. La mayoría son heterótrofas (*i. e.*, utilizan compuestos orgánicos como fuente de carbono), y algunas de éstas utilizan compuestos de un solo carbono. Otras son autótrofas y crecen en presencia de H_2 y CO_2 o compuestos reducidos de azufre (Knowles, 1982).

Las bacterias con capacidad de desnitrificación pertenecen a una amplia variedad de grupos que abarcan distintas características fisiológicas. Los organismos desnitrificantes son frecuentes en las clases alfa y beta de las proteobacterias, aunque no existe un patrón reconocible de distribución (Zumft, 1997).

La desnitrificación se considera un proceso de acción comunitario, ya que no todos los microorganismos implicados realizan la reducción del NO_3^- , sino que se completa con la acción enzimática de diversas bacterias (Wallenstein *et al.*, 2006). En la mayoría de los hábitats existe un potencial de desnitrificación, pero se cuenta con poca información acerca de los organismos que llevan a cabo dicho proceso. Los géneros más mencionados en la bibliografía son *Pseudomonas* y *Alcaligenes* (Knowles, 1982).

En sedimentos de agua dulce existen densidades de bacterias desnitrificantes que indican un considerable potencial de desnitrificación; aunque no se les tiene bien identificadas, con frecuencia son *Pseudomonas*. Las bacterias reductoras de NO_3^- también se representan por los géneros *Aeromonas* y *Acinetobacter*, así como por miembros de las enterobacterias (Knowles, 1982).

2.4 Aislamiento de bacterias implicadas en la remoción de nitrógeno

2.4.1 Aislamiento de bacterias nitrificantes

La dificultad para cultivar y aislar cepas puras de bacterias nitrificantes a partir de muestras de origen natural, como suelos o agua, está ampliamente reportada en la bibliografía (Stephen *et al.*, 1996). Esto se debe a que el rendimiento energético de la oxidación del amonio es bajo, lo que se traduce en rendimientos de producción de biomasa, velocidades específicas de crecimiento (μ) y velocidades de oxidación de N reducidos. Además, las colonias de *Nitrosomonas* no suelen ser mayores a

100 μm de diámetro (Lewis and Pramer, 1958), debido a lo cual el crecimiento de colonias visibles en medio sólido y la eliminación de bacterias heterótrofas residuales requieren meses (Stephen *et al.*, 1996). Estas dificultades han limitado la investigación y la puesta en marcha procesos de remoción total de nitrógeno del agua. A continuación se resumen algunas investigaciones que se enfrentaron a estas limitantes.

Por ejemplo, en el estudio de Shan y Obbard (2003), las bacterias nitrificantes se aislaron a partir de agua de mar enriquecida con una solución de 200 mg N-NH₄⁺/L a la que se agregaron esferas porosas de arcilla para retener a las bacterias. Los resultados mostraron que después de diez días de la inoculación se produjo una notable disminución en la concentración de nitrógeno amoniacal. La actividad de las bacterias se verificó en ensayos por lote, en los que lograron disminuir la concentración de 2.75 a 0.5 mg N-NH₄⁺/L.

En la investigación de Josserand y Cleyet-Marel (1979), se tomó una muestra de suelo de entre uno y dos gramos que había sido enriquecida previamente con bacterias nitrificantes. Se incubó a 28°C con medio específico para *Nitrobacter* sp. suministrado con 1 g/L de NaNO₂, y posteriormente se tomaron muestras de forma periódica para seguir la desaparición del nitrato usando el reactivo de Griess-Ilosvay. Cuando el nitrato se agotaba, 1 mL de inóculo se transfería a 10 mL de medio fresco; esta operación se realizó hasta eliminar la mayor cantidad de bacterias heterótrofas.

En el trabajo realizado por Brierley y Wood (2001), se tomaron dos muestras, una que mostraba potencial de nitrificación y otra sin potencial de nitrificación. Las muestras, de aproximadamente 5 g de suelo, se colocaron en matraces de 50 mL que contenían 20 mL del medio mínimo estéril y 0-1% de β -alanina (como fuente de carbono y nitrógeno) y el pH se ajustó a 4.5. Los frascos se incubaron a 25°C y con agitación. Cada dos días se realizaba la prueba para la oxidación de nitrógeno usando el reactivo de Griess-Ilosvay; al dar positiva se tomaba 1 mL del cultivo y se transfería a medio fresco, lo que se realizó de manera periódica. Transcurridas 6 semanas de incubación, los cultivos se sembraron en placas de agar de β -alanina y libre de antibióticos para confirmar su pureza. Otra parte de los cultivos se centrifugó y se analizó colorimétricamente para determinar el amonio total y el nitrógeno oxidado (Brierley y Wood, 2001).

2.4.2 Aislamiento de bacterias desnitrificantes

El aislamiento de este tipo de bacterias no es tan complicado como el de las bacterias nitrificantes. Sin embargo, dos factores críticos para cultivar bacterias

desnitrificantes son la selección de la fuente de carbono y el mantenimiento de condiciones anóxicas (*i. e.*, la ausencia de oxígeno atmosférico).

El aislamiento de bacterias realizado por Green *et al.* (2010) se realizó a partir de muestras de aguas subterráneas expuestas a radionúclidos y nitratos. El muestreo se realizó en condiciones anóxicas. El enriquecimiento se realizó con un medio sintético enriquecido con una mezcla de vitaminas y saturado con N₂ y CO₂ (80:20). Se utilizaron cuatro diferentes concentraciones de nitrato (0.5, 1.0, 10 y 25 mM) y cuatro fuentes distintas de carbono (acetato, 10 mM; lactato, 10 mM; una mezcla de acetato, propionato, y butirato a 10 mM; y finalmente etanol 20 mM). Las suspensiones se incubaron a 30°C y se realizaron transferencias a medio fresco cada 10 días; después de cuatro transferencias se cultivó en medio sólido. El análisis de secuencia de genes reveló que las colonias aisladas eran de cuatro géneros de bacterias desnitrificantes (Green *et al.*, 2010).

En el aislamiento de bacterias desnitrificantes aerobias realizado por Wang *et al.* (2013), se partió de un medio mineral adicionado con succinato de sodio como fuente de carbono. El inóculo consistió en una muestra proveniente de un estanque de peces. Se inocularon 500 mL de muestra en 100 mL del medio mineral y se cambió a medio fresco cada 4 días. Los frascos se mantuvieron a 30°C y 160 rpm (esto se repitió 5 veces). Después, la suspensión bacteriana obtenida se inoculó en agar BTB sólido y se mantuvo a 30°C por dos días.

2.5 Tratamiento biológico de efluentes con baja relación C:N

La eliminación de residuos nitrogenados se basa en procesos biológicos bien conocidos, a saber, la ruta amonificación → nitrificación autótrófica → desnitrificación heterótrófica.

En la desnitrificación, la relación carbono-nitrógeno (C:N) es un parámetro de diseño muy importante. Aunque con frecuencia se recomienda una relación de 10:1 (medida como DQO/NTK), algunos autores sugieren relaciones mucho mayores, de 20:1 ó 30:1 (Fontenot *et al.*, 2007). Es crucial seleccionar una relación C:N adecuada, ya que los valores demasiado elevados pueden poner en desventaja a los microorganismos nitrificantes que también deben estar presentes (Islam *et al.*, 2009). En contraste, las bajas relaciones C:N limitan la desnitrificación y pueden causar acumulación de NO₂⁻ en un proceso de remoción total de nitrógeno (Trois *et al.*, 2010).

Algunas fuentes de contaminación generan efluentes con contenidos desproporcionadamente altos de nitrógeno. Por ejemplo, las aguas de la industria

optoeléctrica están particularmente enriquecidas con nitrógeno orgánico, ya que en el proceso de fabricación comúnmente se utiliza etanolamina e hidróxido de tetrametilo (Chen *et al.*, 2003). Así mismo, los sistemas de acuicultura intensiva, la industria petroquímica, farmacéutica, de fertilizantes y de alimentos pueden generar efluentes enriquecidos en NH_4^+ (Carrera *et al.*, 2003). Los procesos de fabricación de acero inoxidable generan aguas residuales con concentraciones de nitratos en un rango de 500-1000 mg $\text{N-NO}_3^-/\text{L}$ (Fernández-Nava *et al.*, 2010), mientras que en aguas subterráneas afectadas por actividad agrícola es usual encontrar 1-2 mg de $\text{N-NO}_3^-/\text{L}$ (Rivett *et al.*, 2008). En los casos anteriores apenas se encuentra materia orgánica.

Cualquier desbalance de C:N requiere la adición de fuentes de carbono exógenas. Una amplia variedad de compuestos se utilizan para este propósito, tales como azúcares, ácidos orgánicos, alcoholes y aceites (Greenan *et al.*, 2006), aunque el metanol es el más empleado (Fernández-Nava *et al.*, 2010). Recientemente se ha dado más importancia a materiales sólidos como tallos de maíz, subproductos de madera como astillas y aserrín (Warneke *et al.*, 2010), paja de trigo (Soares y Abeliovich, 1998), celulosa microbiana (Godini *et al.*, 2011) y polímeros comerciales a base de almidón (Zhang *et al.*, 2012), entre otros materiales.

Para seleccionar una fuente de carbono se consideran muchos aspectos, como su costo, velocidad de desnitrificación y la potencial liberación de compuestos tóxicos. El costo de las fuentes donadoras de carbono y la administración de lodos son clave, ya que representan más de 50% del costo total del tratamiento de aguas residuales (Fernández-Nava *et al.*, 2010). Otro aspecto importante a tener en cuenta es la posibilidad de la contaminación cruzada, que es el aumento en la concentración de un contaminante como resultado de una acción que busca eliminar otro contaminante (Healy *et al.*, 2012).

2.5.1 Uso de fuentes naturales de carbono

En el estudio de Jones *et al.* (2007), se evaluaron astillas de madera y paja de trigo como fuentes de carbono para la desnitrificación de agua residual acuícola. El trabajo se realizó a escala de laboratorio en biorreactores de flujo ascendente que se alimentaron con tres concentraciones distintas de NO_3^- (50, 120 y 200 mg/L). Los resultados mostraron que tanto las astillas como la paja se pueden comparar con medios plásticos comerciales, ya que permitieron la eliminación del 99% de nitratos en el flujo con la mayor concentración de estos iones (200 mg/L). Los cambios que se observaron fueron un aumento en el pH y una reducción del pE del agua, así como una disminución de la masa de los materiales sólidos.

Así mismo, en la investigación de Schulz *et al.* (2003) se trataron efluentes de la industria acuícola en humedales. Estos efluentes se filtraron con arena de un diámetro promedio de 1- 2 mm que se plantaron con brotes de caña. Los caudales del efluente que se hicieron pasar por el humedal fueron de 1, 3 y 5 L/min. Después de este tratamiento, las concentraciones de SST y DQO se redujeron 31.7 y 24.54%, respectivamente. Las tasas de remoción de nitrógeno total Kjeldhal (NTK) variaron de 49% a 68.5% y de 20.6% a 41.8% y se correlacionaron negativamente con los tiempos de retención hidráulica. La mejor depuración del efluente se observó a un tiempo de retención hidráulica de 7.5 h.

3. Planteamiento del problema y justificación

3.1 Planteamiento del problema

La eutrofización es la principal causa del deterioro en la calidad del agua en todo el mundo (Diaz *et al.*, 2012). Esto es resultado del enriquecimiento excesivo del agua con nutrientes como el nitrógeno. Las principales actividades que ocasionan este problema son la fertilización agrícola y la ganadería, que producen escorrentías ricas en nutrientes. Por otra parte, las aguas residuales municipales e industriales que no reciben el tratamiento adecuado, el desagüe pluvial y las fugas de los sistemas sépticos también contribuyen. Varios de los tipos de agua mencionados presentan un desbalance en la relación C:N.

Una solución consiste en someter estos efluentes a un tratamiento biológico que remueva la totalidad del nitrógeno. Por lo tanto, en este proyecto nos propusimos contribuir al desarrollo de un proceso de remoción total de nitrógeno mediante: i) el aislamiento de las bacterias implicadas en su biotransformación y ii) la selección de un material natural de bajo costo que sirva como fuente de carbono exógeno.

3.2 Justificación

En los monitoreos de calidad del agua superficial realizados por la Comisión Nacional del Agua, se hace un seguimiento parcial del problema de contaminación por nutrientes, ya que sólo se considera la concentración de nitratos. Así, en el último Informe de la Situación del Medio Ambiente en México, Semarnat (2012) reportó que en 27% de los sitios monitoreados se detectaron concentraciones comprendidas entre 0.2 y 0.3 mg NO₃⁻/L. En las regiones Golfo Norte y Golfo Centro la situación es más grave, puesto que el 59 y el 89% de los sitios analizados excedieron este rango. Dado que la OMS establece un máximo de 0.2 NO₃⁻/L en agua que se consumirá a largo plazo para evitar metahemoglobinemia (Semarnat, 2012), es necesario contar con procesos de remoción total del nitrógeno que permitan mejorar la calidad de los cuerpos de agua nacionales

4. Objetivos

4.1 General

Contribuir a la remoción total de nitrógeno de efluentes con baja relación C:N mediante la obtención de poblaciones microbianas capaces de realizar las biotransformaciones correspondientes (nitrificación y desnitrificación) y la selección de un material natural como fuente exógena de materia orgánica.

4.2 Específicos

- ❖ Obtener poblaciones microbianas nitrificantes y desnitrificantes a partir de enriquecimientos sucesivos de agua superficial.
- ❖ Verificar la actividad de las poblaciones aisladas en cultivos por lote.
- ❖ Caracterizar los extractos acuosos de tres materiales de origen natural (*i.e.*, aserrín, cáscaras de cacahuete y cebada) para seleccionar la fuente más adecuada de materia orgánica para un proceso desnitrificante.

5. Materiales y métodos

5.1 Aislamiento de bacterias

5.1.1 Muestreo de agua de la presa “El durazno”

El muestreo se realizó en la presa “El durazno” (San Agustín Tlaxiaca, Hgo.), el día 24 de enero de 2014. El agua se recolectó en distintos puntos del cuerpo acuático (Figura 5.1). Se tomaron tres muestras en condiciones asépticas en recipientes estériles (Schott) con capacidad de 1 L, que luego se mezclaron.



Figura 5.1 Presa "El durazno"

5.1.2 Cultivo de bacterias

La obtención de poblaciones microbianas nitrificantes, nitrificantes y desnitrificantes se llevó a cabo por el mismo método y a partir de un medio específico para cada tipo de microorganismo.

Se colocaron 500 μ L de las muestras de agua superficial por extensión en placa en cajas Petri que contenían medio sólido selectivo para el aislamiento. Se incubaron a 27°C durante 7 días, y se realizaron dos resiembra posteriores a partir de las unidades formadoras de colonias (UFC) aisladas en la primera siembra.

Las UFC obtenidas en la última resiembra se inocularon en tubos inclinados que contenían agar selectivo. Se seleccionó una de las colonias crecidas en estos tubos,

y se inoculó en 50 mL de medio líquido. Los microorganismos que crecieron se centrifugaron a 1500 rpm. Veinte mL de material celular se mezclaron con 80 mL de glicerol y se mantuvieron a 4°C. En la Figura 5.2 (izquierda) se observan los medios líquidos una vez que fueron inoculados con las colonias aisladas.



Figura 5.2 Medios selectivos líquidos (izq.) en incubación.

En las Tablas 5.1, 5.2 y 5.3 se muestran las composiciones de los medios de cultivo para bacterias nitritantes, nitratantes y desnitrificantes, respectivamente. Los medios de cultivo se sometieron a esterilización a 121°C por 15 min. Para solidificarlos, se les agregó agar bacteriológico (16 g/L).

Tabla 5.1 Medio de cultivo para bacterias nitritantes.

Reactivo	Cantidad (g)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.50
K_2HPO_4	1.0
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.03
NaCl	0.03
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.30
CaCO_3	7.50
Se disuelven por separado y al final se afora a 1 L.	

Fuente: Félix *et al.* (1996).

Tabla 5.2 Medio de cultivo para bacterias nitratantes.

Reactivo	Cantidad (g)
KNO ₂	0.006
K ₂ HPO ₄	1.00
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.03
CaCO ₃	1.00
CaCl ₂	0.3
NaCl	0.3
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1
Se disuelven por separado y al final se afora a 1 L.	

Fuente: Félix *et al.* (1996).

Tabla 5.3 Medio de cultivo para bacterias desnitrificantes.

Solución A	
Reactivo	Cantidad
KNO ₃	1.00 g
Asparagina	1.00 g
Solución alcohólica de azul de bromotimol 1% (p/v)	5 mL
Agua destilada	500 mL
Solución B	
Reactivo	Cantidad
Citrato de sodio	8.50 g
KH ₂ PO ₄	1.00 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.00 g
CaCl ₂ ·6H ₂ O	0.20 g
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.05 g
Agua destilada	500 mL
Se preparan por separado las soluciones A y B posteriormente se mezclan.	

Fuente: Félix *et al.* (1996).

5.1.3 Descripción morfológica de las colonias aisladas

La aparición de crecimiento en medio sólido permite la observación de características distintivas de las colonias, tales como color, densidad, consistencia, textura, forma, borde y tamaño. Sin embargo, la identificación final no se puede hacer solamente por la morfología (Morello *et al.*, 2002). Estas variaciones se ilustran en la Figura 5.3.

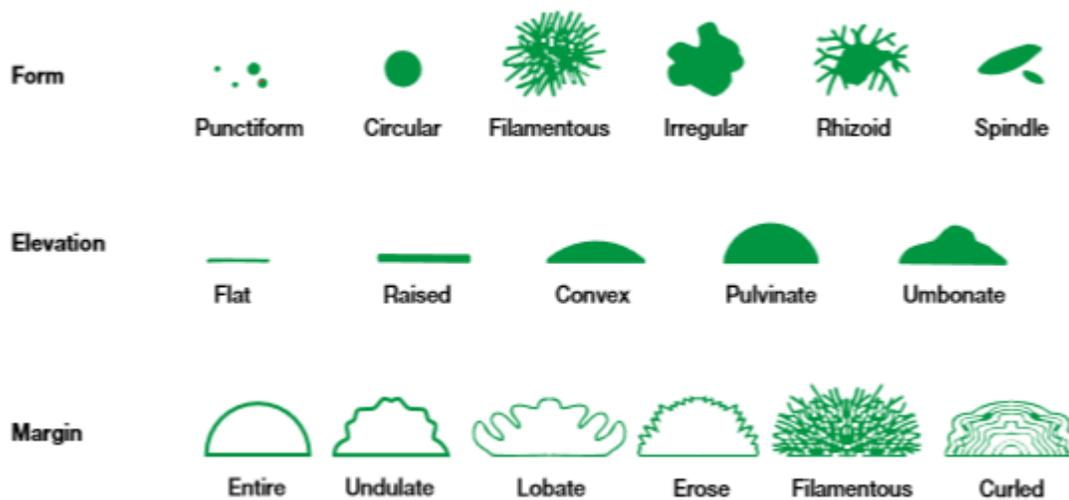


Figura 5.3 Descripción de las características de colonias bacterianas.
Fuente: Harley (2002).

5.1.4 Tinción de Gram

La tinción de Gram fue desarrollada por el bacteriólogo danés Hans Christian Gram en 1884 y es una de las técnicas que permite clasificar las bacterias en dos grandes grupos: Gram positivas y Gram negativas. Esta técnica se lleva a cabo de la siguiente manera:

- Se toma una azada de una colonia de la UFC de interés, se fija con calor y se cubre con colorante violeta (cristal violeta). Como el colorante imparte color a todas las células, se le denomina colorante primario.
- Después de un breve lapso se escurre el exceso de colorante y se lava con agua y se cubre con yodo.
- A continuación se lava con alcohol (solución alcohol-cetona) y posteriormente con agua.
- Finalmente, se tiñe con un colorante secundario como safranina; luego se lava con agua y se observa al microscopio.

El colorante violeta y el yodo se combinan en el citoplasma de las bacterias y lo colorean de violeta oscuro o púrpura. Las bacterias que conservan este color después de haberles agregado el alcohol se clasifican como Gram (+); las bacterias que pierden el color violeta con la decoloración se denominan Gram (-) (Tortora *et al.*, 2007).

5.2 Verificación de la actividad de las bacterias aisladas

Se tomó una asada de una colonia (aislada por medio de resiembras en medio selectivo sólido) y se inoculó en 250 mL en medio selectivo líquido, que se incubó a 27°C.

Se realizaron muestreos de cada medio a distintos intervalos de tiempo hasta trascurridas 72 h. En cada muestreo se tomaron 4 mL para realizar las determinaciones. Se utilizaron 3 mL para determinar N-NH₄⁺ y N-NO₂⁻ en el caso de las bacterias nitritantes, N-NO₂⁻ y N-NO₃⁻ para las nitratantes, así como N-NO₃⁻ y DQO para las desnitrificantes. Las técnicas empleadas para estos análisis se describen en la sección 5.4.

5.2.1 Seguimiento del crecimiento bacteriano

La densidad celular en los medios de cultivo inoculados se midió a través de la absorbancia a 600 nm (A_{600}).

5.3 Selección de un material natural como fuente de carbono

5.3.1 Descripción de los materiales

Se usaron granos de cebada (*Hordeum vulgare*) procedente de la localidad de Apan, Hgo., con un tamaño promedio de 0.6 ± 0.05 cm, y con contenidos de 50.56 y 6.36% de carbono e hidrógeno, respectivamente (Ramírez, 2014).

La cáscara de cacahuete tenía un tamaño de 3.2 ± 0.47 cm, y provenía de Temascalapa, Estado de México. Se le determinó 48.01 y 5.31% de carbono e hidrógeno, respectivamente (Ramírez, 2014).

Al aserrín de pino (*Pinus sylvestris*) se le determinó un contenido de 44.49% de carbono y 47% de hidrógeno (Ramírez, 2014).

5.3.2 Pruebas de lixiviación

En recipientes separados, se pusieron en contacto durante 3 meses 500 g de aserrín con 5 L de agua, 150 g de cáscara de cacahuete y 2.5 L de agua y 500 g de granos de cebada con 5 L de agua. Los extractos acuosos se muestrearon semanalmente y se analizaron en términos de DQO, COT (*i. e.*, carbono orgánico total), UV₂₅₄, NTK, N-NO₃⁻ y PO₄³⁻. Además, cada mes se tomó una muestra para la determinación de DBO₅.

5.4 Técnicas analíticas

5.4.1 pH

La medición del pH se realizó con un potenciómetro Hanna Instruments pH210.

5.4.2 DQO

La DQO se determinó según el método estándar de la APHA (2012; método 5220D). En tubos de 16x100 mm, se adicionaron 2.5 mL de muestra; posteriormente, se agregaron 1.5 mL de solución digestora (10.216 g de $K_2Cr_2O_7$, y 33.3 g de $HgSO_4$ disueltos en 167 ml de H_2SO_4 y aforada la mezcla a 1 L) y 3.5 ml de solución de sulfato de plata (10.142 g de Ag_2SO_4 en 1 L de H_2SO_4 concentrado). Los tubos se colocaron en un bloque de digestión (COD Reactor, HACH) a 150°C durante 2 horas. Una vez que las muestras estaban a temperatura ambiente, se determinó su absorbancia a 600 nm. Los valores de DQO se determinaron a partir de una curva de calibración de biftalato de potasio (< 425 mg/L, equivalente a 500 mg de O_2/mL).

5.4.3 COT

Se determinó mediante la técnica 5310 de la APHA (2012) en un equipo de análisis de carbono orgánico total (TOC-V Analyzer, Shimadzu®).

5.4.4 UV_{254}

La UV_{254} es típica de grupos aromáticos presentes en la materia orgánica del agua natural. En particular se le considera una medida correlacionada con la materia orgánica persistente, *i. e.*, con sustancias húmicas (Matilainen *et al.*, 2011).

Las muestras se colocaron en celdas de cuarzo de 10 mm de trayecto óptico, y se determinó su absorbancia a 254 nm por triplicado en un espectrofotómetro Lambda 40 UV-Vis (Perkin Elmer, EE. UU.).

5.4.5 DBO_5

Se utilizó el sistema OxiTop (WTW Measurements Systems, Alemania), que registra la DBO de modo automático durante 5 días. Dicho sistema utiliza botellas cerradas en las que la despresurización provocada por el consumo de oxígeno relacionado a la biodegradación de la materia orgánica es registrada por sensores electrónicos piezoresistivos. En función de su carga orgánica, se coloca un volumen determinado de agua residual en la botella (22.7-432 mL). Los valores de DBO (0-4000 mg/L) se

obtienen al multiplicar las lecturas diarias por un factor que depende del volumen del ensayo (WTW, 2006).

5.4.6 Nitrógeno total Kjeldahl (NTK)

Se determinó mediante el método normalizado 4500-B (APHA, 2012). En tubos digestores se colocaron 5 mL de muestra; posteriormente se agregaron 5 mL de mezcla digestiva (se adicionaron 13.4 g de K_2SO_4 y 7.3 g de $CuSO_4$ a 800 mL de agua destilada, luego se añadieron cuidadosamente 134 mL de H_2SO_4 concentrado y se aforó a 1 litro con agua destilada) y se colocaron en el digestor Kjeldahl. Transcurridos aproximadamente 10 minutos de digestión, se añadieron 6 mL de etanol al 30% y se regresó la muestra al digestor por aproximadamente cuatro horas más a 370 °C. Se observó la reducción del volumen y el cambio de color a verde pálido como indicador del término de la digestión.

Después las muestras se destilaron (Gerhardt® Vapodest 20, Alemania), para transformar el NH_4^+ en NH_3 . El destilador se programó para que adicionara aproximadamente 5 mL de NaOH al 50% al contenido del tubo donde se encontraba la muestra digerida, con un tiempo de destilación de 6 minutos al 60% de potencia de vapor. El destilado se recolectó en un matraz Erlenmeyer que contenía 50 mL de solución indicadora (que se preparó con 5 g de ácido bórico disueltos en agua destilada, 35 mL del indicador A, preparado con 100 mg de fenolftaleína aforados a 100 mL con alcohol etílico y 10 mL del indicador B, preparado con 33 mg de verde de bromocresol más 66 mg de rojo de metilo aforados a 100 mL con alcohol etílico). La mezcla se ajustó a un color café rojizo con ácido o álcali según se requiriera y se aforó a 1 L con agua destilada.

Por último, el contenido del matraz de recolección se tituló con HCl 0.01 N hasta el vire de verde esmeralda a café rojizo.

Para obtener la concentración de NTK en la muestra, se usó la Ecuación 5.1:

$$NTK = \frac{(P-B) \times meq \times N \times 1000}{V} \quad (5.1)$$

Donde:

P = Volumen gastado en la titulación de la muestra (mL)

B = Volumen gastado en la titulación del blanco (mL)

N = Normalidad del HCl

meq = Miliequivalentes de nitrógeno (14 mg/meq)

V = mL de la muestra

5.4.7 N-NH₄⁺

Se realizó por el método de fenato 4500-NH₃D (APHA, 2012). A 50 mL de muestra se agregaron 0.05 mL de MnSO₄ (500 µL), 0.5 mL de ácido hipocloroso (5%) y 0.6 mL de reactivo de fenato (2.5 g de NaOH y 10 g de fenol disueltos en 100 mL). La mezcla se dejó reposar durante 10 min y su absorbancia se leyó a 600 nm. Se calculó la concentración mediante una curva de calibración con soluciones estándar de N-NH₄⁺ con concentraciones que van de 0.1 a 5 mg/L.

5.4.8 N-NO₂⁻

La técnica analítica utilizada se fundamenta en el método colorimétrico APHA 4500-NO₂, basado en una modificación de la reacción de Griess-Ilosvay. Para llevar a cabo esta reacción se utilizan dos reactivos orgánicos: sulfanilamida y clorhidrato de naftilamina (APHA, 2012). A 50 mL de muestra se adicionaron 2 mL de reactivo de color (100 mL de ácido fosfórico al 85%, 10 g de sulfanidamida y 1 g de diclorohidrato de N-(1 naftil)-etilendiamina, todo disuelto en 800 mL de agua). La mezcla se dejó reposar durante 2 horas, y se leyó su absorbancia a 543nm.

5.4.9 N-NO₃⁻

El método colorimétrico utilizado se basa en la formación de un compuesto de color amarillo (sal de diazonio) luego de la reacción de los nitratos con ácido fenildisulfónico en solución alcalina (Mubarak *et al.*, 1977). Primero, se secaron 10 mL de muestra por evaporación a 105°C. Se agregaron 2 mL de ácido fenildisulfónico (preparado por disolución de 25 g de fenol en 150 mL de H₂SO₄) y se diluyeron con 20 mL de agua. Luego, se adicionaron 7 mL KOH (12N), se aforó a 50 mL y se leyó la absorbancia a 410 nm.

5.4.10 PO₄³⁻

Se elaboró una curva patrón pesando 0.0574 g de KH₂PO₄ sólido puro (previamente secado a 100 °C) en 100 mL de agua destilada; las concentraciones se encontraban en el rango 0.1 – 5 mg/L (PO₄³⁻). Posteriormente se colocó 0.5 mL de muestra en matraces de 50 mL y se adicionaron las siguientes soluciones en este orden: 1 mL de H₂SO₄ concentrado, 5 mL de tartrato doble de sodio y potasio (0.0017M), 5 mL de molibdato de amonio (0.0161M) y 1 mL de ácido ascórbico (0.003M) y se aforó a 50 mL. A 5 mL de la solución se le adicionaron 10 mL de agua y 0.4 g de persulfato amónico sólido y se llevó a ebullición por 10 minutos. Se dejó enfriar y se leyó la absorbancia de la solución a 690 nm (método 4500-P F; APHA, 2012).

6. Resultados y discusión

6.1 Aislamiento de bacterias transformadoras de compuestos nitrogenados

A partir de las muestras de agua obtenidas de la presa “El durazno” (§ 5.1.1), se obtuvieron tres grupos de bacterias en los diferentes medios selectivos sólidos. En las Figuras 6.1, 6.2 y 6.3 se muestran imágenes de las colonias aisladas en los medios nitritante, nitratante y desnitrificante, respectivamente.



Figura 6.1 Colonias obtenidas en medio nitritante.



Figura 6.2 Colonias obtenidas en medio nitratante.

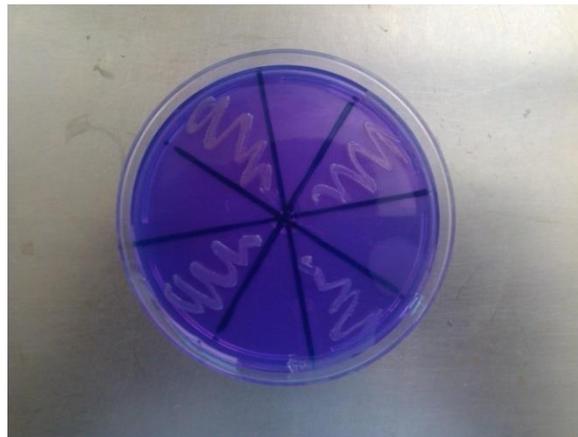


Figura 6.3 Colonias obtenidas en medio desnitrificante.

Cada grupo de bacterias se resembró tres veces cada siete días en medios frescos. Después de cada resiembra, los tiempos necesarios para que se detectaran colonias definidas de bacterias nitritantes y nitratantes fueron similares (alrededor de siete días); las colonias de bacterias desnitrificantes eran detectables después de una incubación de sólo cuatro días.

Las características morfológicas recopiladas para las colonias aisladas permitieron corroborar la obtención de cultivos axénicos ya que, a lo largo de las tres resiembras, las colonias no presentaron cambio en su fenotipo ni ningún tipo evidente de contaminación. Así, las colonias nitritantes y nitratantes presentaron forma circular, borde entero, elevación convexa, textura butirosa y color blanco en cada resiembra. La morfología de las colonias desnitrificantes tampoco se modificó durante las resiembras; presentaron las mismas características que las bacterias nitritantes y nitratantes, a excepción del color, que fue amarillento.

6.1.1 Tinción de Gram

Las bacterias aisladas en medio selectivo nitritante son Gram (-), como se aprecia en la Figura 6.4. Esto es similar a lo obtenido por Poth (1986), quien aisló una cepa Gram (-) de *Nitrosomonas* a partir de sedimentos fluviales.

Por otra parte, las bacterias aisladas en medio nitratante resultaron ser Gram (+), como se muestra en la Figura 6.5. No obstante, según Spieck y Bock (2005), todos los microorganismos que oxidan nitratos son Gram (-). Es por lo tanto necesario rehacer la tinción y en su caso descartar que este resultado sea consecuencia de contaminación.

Se observó también que las bacterias desnitrificantes son Gram (+), según muestra la Figura 6.6. Esto es contrario a lo que mencionan Lukow y Diekmann (1997) quienes reportaron que las bacterias desnitrificantes empleadas en su estudio son Gram (-). De hecho, desde hace más de dos décadas, las investigaciones acerca de la microbiología de la desnitrificación reportan principalmente bacterias Gram (-) (Verbaendert *et al.*, 2011). Sin embargo, hay una larga lista de géneros bacterianos Gram (+) capaces de desnitrificar, entre los que se encuentran *Bacillus* (*e.g.*, *B. licheniformis*, *B. azotoformans* y *B. stearothermophilus*), *Brevibacillus*, *Geobacillus*, *Paenibacillus*, *Virgibacillus*, *Sporosarcina*, *Corynebacterium*, *Gemella*, *Jonesia*, *Frankia*, *Propionibacterium*, y *Tsukamurella* (Verbaendert *et al.*, 2011). Estas cepas se han aislado de sedimentos lacustres, plantas de tratamiento de aguas residuales, suelos podzólicos y diversos sistemas radiculares. Tal ubicuidad ambiental sugiere que efectivamente se aisló una cepa de los géneros antes mencionados.

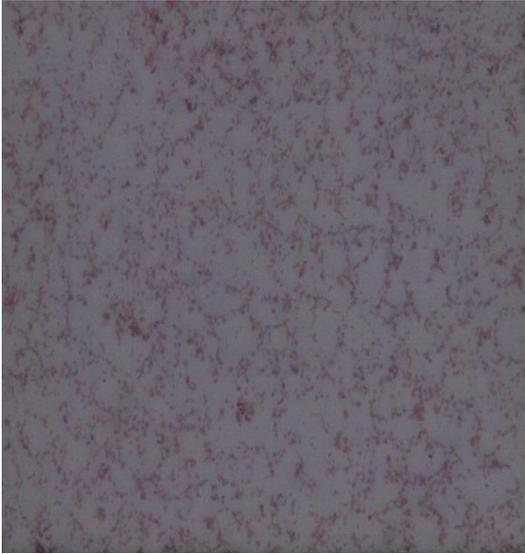


Figura 6.4 Bacterias aisladas en medio nitritante (aumento 100X) después de la tinción de Gram.

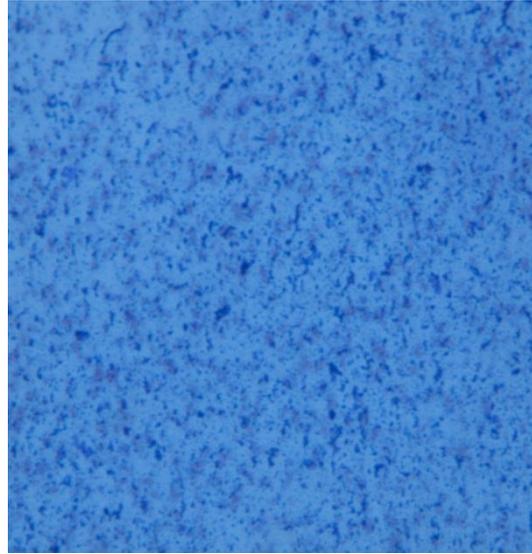


Figura 6.5 Bacterias aisladas en medio nitratante (aumento 100X) después de la tinción de Gram.

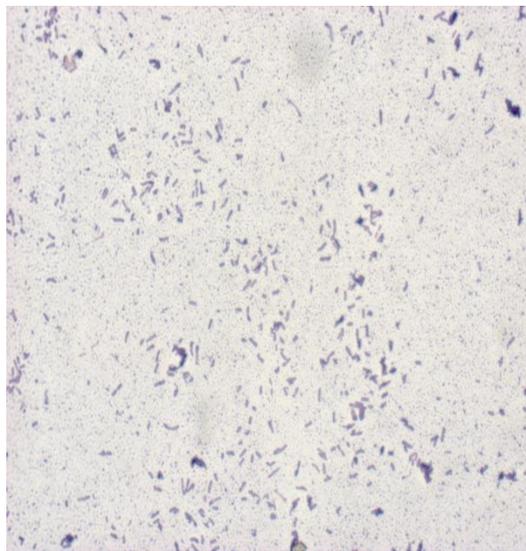


Figura 6.6 Bacterias aisladas en medio desnitrificante (aumento 100X) después de la tinción de Gram.

6.2 Verificación de la actividad de las colonias aisladas

Con la finalidad de comprobar que las bacterias aisladas realizaran la biotransformación de compuestos nitrogenados correspondiente (*i. e.*, nitrificación, nitratación o desnitrificación), se hicieron cultivos por lote separados.

Para ello, se utilizaron los medios líquidos ya referidos (§ 5.1.2), en los que se inocularon diversas colonias tomadas al azar. Estas se habían aislado en cajas de Petri después de la tercera resiembra, como se describe en la sección anterior. Los cultivos nitrificante y nitratante se monitorearon por medio de las concentraciones de sustrato (N-NH_4^+ y N-NO_2^- , respectivamente), de producto (N-NO_2^- y N-NO_3^- , respectivamente) y de biomasa (mediante la A_{600}). En el cultivo desnitrificante se midieron las concentraciones de DQO, N-NO_3^- y biomasa (también mediante la A_{600}). A continuación se presentan los resultados obtenidos.

6.2.1 Bacterias nitritantes

En la Figura 6.7 se muestra el aumento de la A_{600} monitoreada para este cultivo. La estimación de la concentración de UFC a partir de la A_{600} y de la escala de McFarland no fue posible, ya que las lecturas obtenidas resultaron menores a las encontradas para la curva de calibración (elaborada con un cultivo de *Escherichia coli* por otro integrante del equipo de trabajo). Así mismo, la turbidez de los carbonatos presentes en el medio selectivo pudo afectar la comparación con el cultivo de *E. coli*. No obstante, la Figura 6.7 muestra claramente la progresión de la absorbancia, que corresponde a una curva típica de crecimiento celular en un sistema cerrado. En la Figura 6.7 también se presenta el ajuste de los datos a un modelo sigmoideal.

A partir de los valores de A_{600} medidos durante la fase exponencial, se estimó la velocidad específica máxima de crecimiento (μ_{\max}) en 0.061 h^{-1} . Este valor es bajo y consistente con lo esperado para bacterias nitrificantes, ya que al ser organismos quimiolitotóxicos, utilizan carbono inorgánico para la síntesis de precursores clave en el proceso de producción de energía (Hagopian y Riley, 1998). Esto se traduce también en bajos rendimientos de producción de biomasa. Sin embargo, el valor que se obtuvo es superior a los que se reportan en la literatura; para *Nitrosococcus oceanus* y *Nitrosomonas marina* se han medido μ_{\max} de 0.014 y 0.018 h^{-1} , respectivamente, en cultivos discontinuos (Glover, 1985). En cultivos discontinuos de *Nitrosomonas europea* se ha determinado μ_{\max} en 0.017 h^{-1} (Keen y Prosser, 1987). Otros autores reportan μ_{\max} del orden de 0.02 h^{-1} para bacterias nitritantes en medios naturales (Hagopian y Riley, 1998). Posiblemente, la

sobreestimación de μ_{\max} se debe a que, dado que el volumen de cultivo era muy pequeño, no se estudió la cinética de crecimiento con distintas relaciones sustrato inicial (S_0):biomasa inicial (X_0) (Grady *et al.*, 1996).

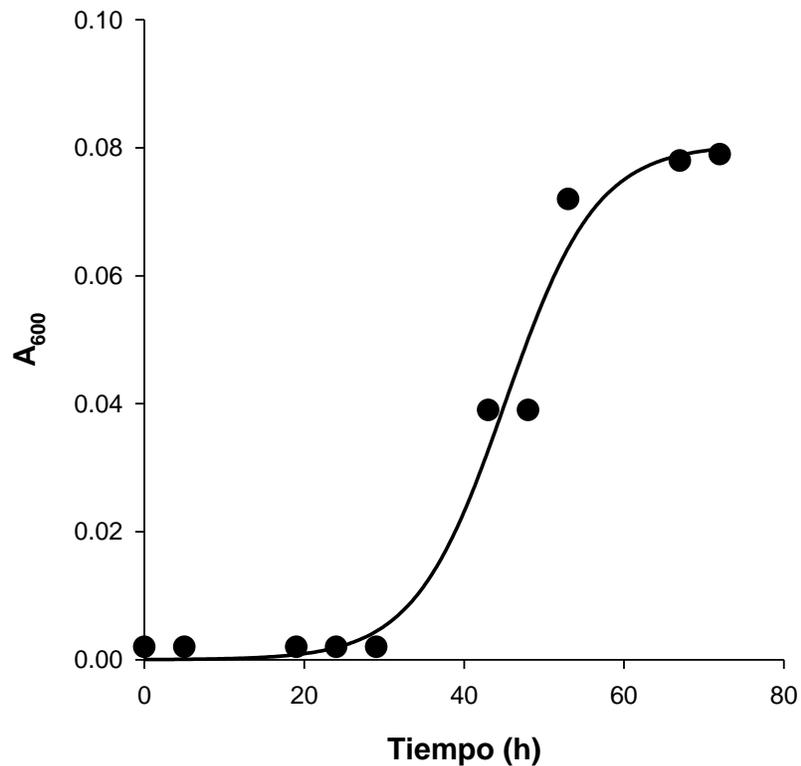


Figura 6.7 Crecimiento del cultivo nitritante. Los símbolos corresponden a los datos experimentales y la línea continua, al ajuste de un modelo sigmoideal.

Para verificar la actividad nitritante del cultivo, se monitorearon el consumo de $N-NH_4^+$ y la producción de $N-NO_2^-$. Sin embargo, la concentración de $N-NO_2^-$ no se pudo detectar mediante la técnica colorimétrica empleada (§ 5.4.8). Es posible que lo anterior se deba a que esta especie nitrogenada es susceptible a variaciones de factores tales como el pH y la temperatura (Vossen *et al.*, 2012).

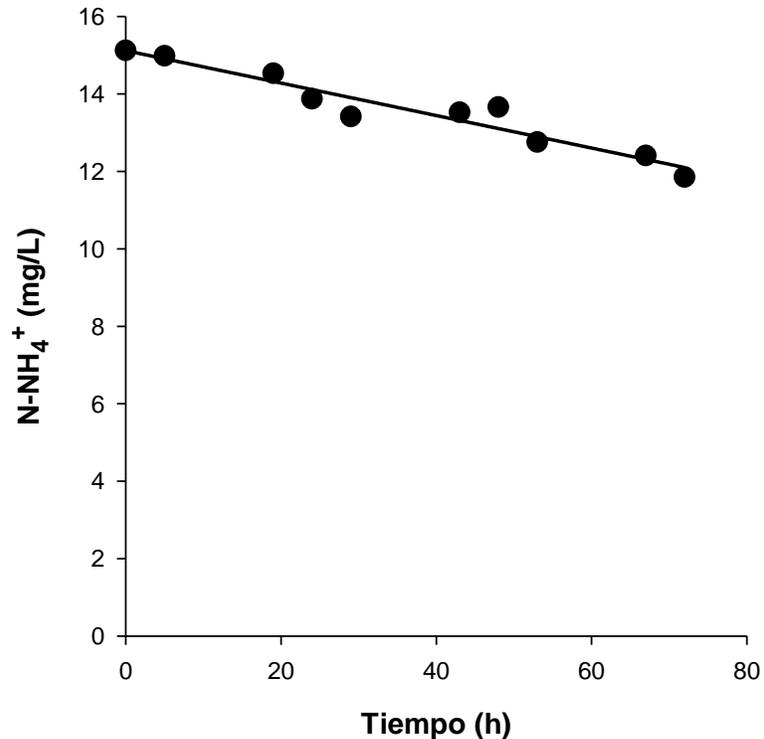


Figura 6.8 Consumo de N-NH₄⁺ del cultivo nitritante. Los símbolos corresponden a los datos experimentales y la línea continua, a un ajuste lineal.

En la Figura 6.8 se presenta el consumo de N-NH₄⁺ que se constató en función del tiempo. Los datos se presentan también con un ajuste lineal, que es característico de una cinética de orden cero. Con el ajuste se evaluó la velocidad de remoción del N-NH₄⁺ en 0.042 mgN/L·h. Para poder comparar con la bibliografía, es necesario tener una estimación de la densidad celular; por tal razón, se utilizó una correlación entre A_{600} y la concentración de sólidos totales en suspensión (SST) publicada previamente (Rothermel *et al.*, 2013). Según esta correlación, la A_{600} inicial del cultivo equivale a una concentración de SST de 4 mg/L. Así, la velocidad de remoción de nitrógeno amoniacal de las bacterias nitritantes aisladas en el presente estudio equivale a 10.5 mg N-NH₄⁺/gSST·h. Esta velocidad es superior a la presentada por Satoh *et al.* (2003) para lodos activados (0.34 mg N-NH₄⁺/gSST·h), pero inferior a la que pueden registrar lodos activados aclimatados (20.8 mg N-NH₄⁺/gSST·h) (Campos *et al.*, 1999).

En conclusión, el consumo de NH₄⁺ en un medio mineral mínimo como el que utilizamos es evidencia inequívoca de que las bacterias aisladas poseían actividad nitritante. Esta conclusión se refuerza por el aumento en la turbidez del medio, que a su vez indica que el consumo de nitrógeno amoniacal estuvo acompañado de crecimiento celular.

6.2.2 Bacterias nitratantes

En la Figura 6.9 se muestran las lecturas de A_{600} registradas para este cultivo, que también indicaron crecimiento celular. El aumento en la densidad celular sólo se observó después de una fase de latencia de aproximadamente 20 horas. Sin embargo, la progresión de la A_{600} no corresponde a lo esperado para un sistema cerrado, ya que en lugar de conseguir una curva sigmoideal, se obtuvo lo que parece ser una curva de crecimiento diáuxico o bifásico (Pirt, 1975). Este tipo de curvas es característico del consumo secuencial de más de un sustrato, lo cual no es plausible en el medio de cultivo utilizado (en el que la única fuente de energía disponible eran los nitritos; § 5.1.2).

Para verificar la actividad nitratante del cultivo, también se monitorearon el consumo de $N\text{-NO}_2^-$ y la producción de $N\text{-NO}_3^-$. No obstante, no pudimos detectar estos analitos en ninguna de las muestras tomadas. Como se mencionó en la sección anterior, los nitritos son una especie inestable en agua (Vossen *et al.*, 2012), y quizás la temperatura de incubación afectó su determinación. En cuanto a los nitratos, el pequeño volumen de muestra con el que se contaba impidió estimar adecuadamente su concentración durante el cultivo.

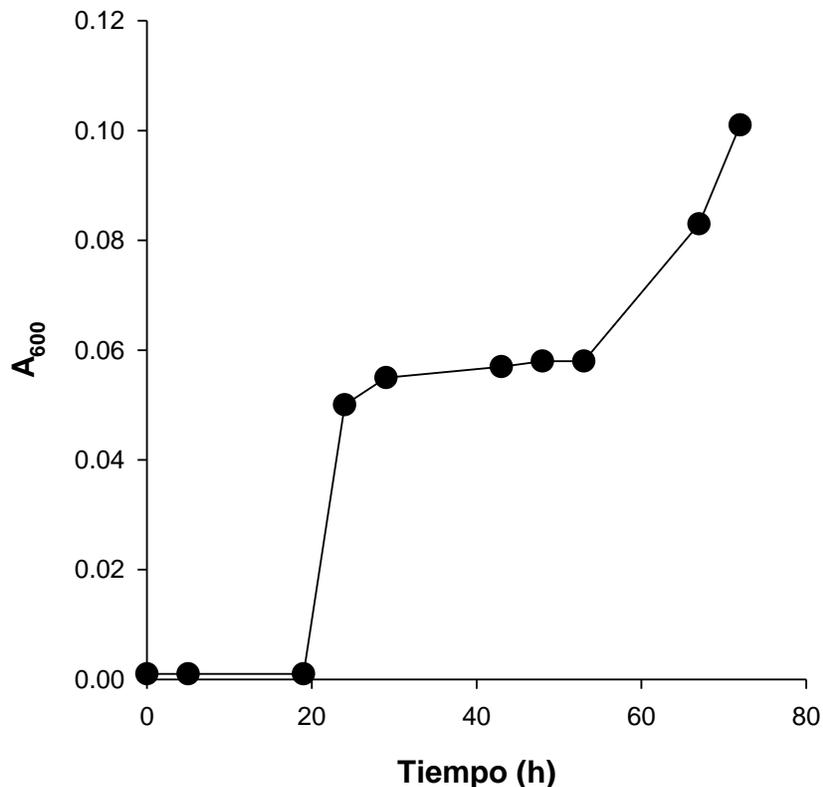


Figura 6.9 Crecimiento del cultivo nitratante.

6.2.3 Bacterias desnitrificantes

Para la verificación de la actividad de estas bacterias se siguió la A_{600} y la concentración de $N-NO_3^-$ en el medio de cultivo; sin embargo, no fue posible obtener mediciones reproducibles de estos analitos. En el caso de la A_{600} , esto se debió a la interferencia que representaba el color violeta del medio. También se midió la concentración de DQO, cuya progresión se muestra en la Figura 6.10.

En la Figura 6.10 se observa que el consumo de materia orgánica sigue una cinética de orden cero, para la cual se calculó una velocidad de consumo de DQO de 8.75 mgDQO/L·h. Este valor es significativamente menor a las cargas orgánicas que suelen aplicarse a reactores desnitrificantes, que van de 40 a 800 mgDQO/L·h (1–20 kgDQO/m³·h; Huiliñir *et al.*, 2008). No obstante, se considera que en estos reactores la concentración de biomasa es de varios gramos de SST por litro, y ya que en el presente trabajo se contaba con algunas ppm de biomasa, podemos concluir que se consiguió un cultivo con una actividad desnitrificante significativa.

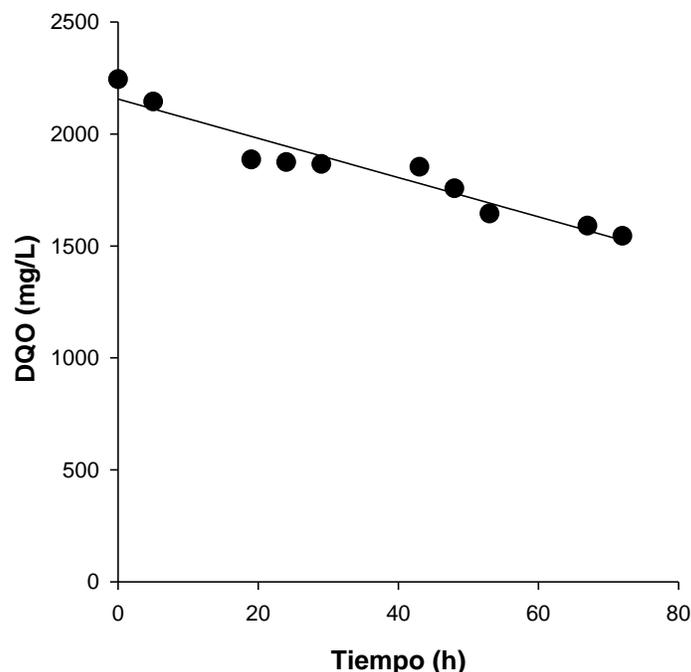


Figura 6.10 Consumo de DQO del cultivo desnitrificante. Los puntos corresponden a los datos experimentales y la línea continua, a un ajuste lineal.

En esta primera parte del estudio, a partir de los medios selectivos para cada una de las bacterias de interés, se realizaron siembras sucesivas que permitieran aislarlas. Se monitorearon las concentraciones de los compuestos nitrogenados implicados en cada proceso, y con la A_{600} se estimó el crecimiento microbiano. Estas técnicas permitieron conocer la actividad de las bacterias implicadas tanto en la nitrificación como en la desnitrificación.

Las pruebas realizadas en medios selectivos para bacterias nitritantes indicaron que los microorganismos pudieron oxidar amonio, ya que se constató una disminución en la concentración de este ion y un aumento en la A_{600} . Ambas pruebas indicaron la actividad de las bacterias en cuestión. En el medio selectivo para bacterias nitratantes no se observó de manera clara la transformación de nitritos debido a que la técnica utilizada no permitió monitorear ningún cambio en las concentraciones de $N-NO_2^-$. Sin embargo, se apreció crecimiento microbiano mediante la medición de la A_{600} , lo cual es evidencia de actividad nitratante. Por último, en el medio selectivo desnitrificante se observó una disminución significativa de DQO, lo cual indicó el consumo de fuentes de carbono y por ende actividad bacteriana desnitrificante; sin embargo, esto no se pudo corroborar con la A_{600} , ya que existía la interferencia de color del medio.

6.3 Selección de un material natural como fuente de carbono

Además de aislar y verificar la actividad de las bacterias transformadoras de compuestos nitrogenados, nos propusimos contribuir a la remoción total de nitrógeno de efluentes con una baja relación C:N, la cual necesita la adición de fuentes exógenas de carbono (§ 2.5).

Por acción física del agua, el material vegetal libera diversos compuestos orgánicos e inorgánicos solubles debido a la ruptura de las vacuolas de las células (Deago y Pizarro, 2013). Por lo anterior, este tipo de materiales sirve como donante de materia orgánica durante el tratamiento biológico de efluentes con un desbalance en la relación C:N. Una vez que se seleccionaron tres materiales naturales (*i. e.*, aserrín, cáscara de cacahuate y cebada) con base en su costo y disponibilidad, se realizaron pruebas de lixiviación (§ 5.3.2) para determinar cuál era el más indicado como donador de carbono. Durante casi tres meses se midieron semanalmente los siguientes parámetros: pH, DQO, COT, UV_{254} , NTK, $N-NO_3^-$ y PO_4^{3-} . La DBO_5 se midió mensualmente. Los resultados se presentan a continuación.

6.3.1 pH

Los valores de pH medidos en los lixiviados de aserrín (5–6.3) y cacahuate (5.8–7) no mostraron ninguna tendencia precisa a lo largo de la experimentación. En cambio, el pH del extracto de la cebada claramente mostró una disminución que puede atribuirse a la fermentación de la materia orgánica que se lixivió al medio acuoso (Figura 6.11), ya que en condiciones anaerobias este proceso conlleva la formación de ácidos grasos (acidogénesis) y de ácido acético (acetogénesis).

6.3.2 DQO

La Figura 6.12 muestra las concentraciones de materia orgánica (medida como DQO) liberada al medio acuoso por los tres materiales estudiados. Por una parte, se observó que la cebada aportó la concentración más alta de materia orgánica al medio, ya que alcanzó 30 gDQO/L después de 20 días. La lixiviación de materia orgánica a partir de este material mostró dos fases, lo que es consistente con lo reportado para otros materiales vegetales, tales como la caña de azúcar (Deago y Pizarro, 2013). Según estos autores, la degradación de los materiales orgánicos en pruebas de lixiviación inicia por una descomposición rápida de las macromoléculas en compuestos más simples; para el caso de la cebada las macromoléculas en cuestión son carbohidratos (60–80%), proteínas (13–16%) y lípidos (1–2%) (Asare *et al.*, 2011). Posteriormente, la lixiviación de materia orgánica se hace más lenta, hasta que la concentración alcanza un valor estable.

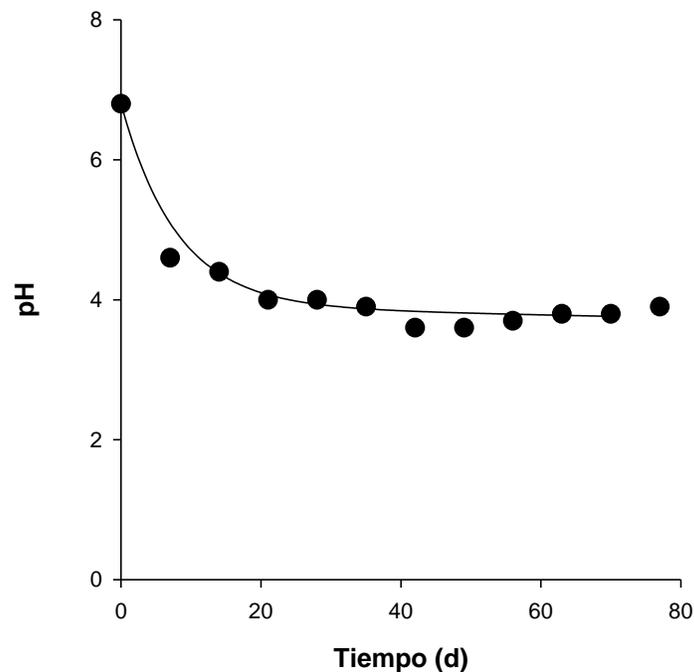


Figura 6.11 Valores de pH medidos en el lixiviado de cebada. Los puntos corresponden a los datos experimentales y la línea continua, al ajuste a un modelo de decaimiento exponencial.

Por otra parte, se observó que el aserrín y las cáscaras de cacahuete liberaron una menor cantidad de materia orgánica, y para estos materiales no se detectaron las dos fases anteriormente mencionadas. En un estudio previo (Ramírez, 2014), también se encontró que la cebada desprende las concentraciones más altas de DQO, seguida del aserrín y de las cáscaras de cacahuete. Sin embargo, las concentraciones de DQO medidas en aquel estudio fueron considerablemente superiores, a saber, 40.8, 39 y 25 g/L, para la cebada, el aserrín y las cáscaras de

cacahuete, respectivamente, después de un ensayo de lixiviación de 50 días realizado bajo las mismas condiciones iniciales.

A partir de balances de masa, se encontró que al cabo de 80 días de experimentación se desprendieron alrededor de 121, 140 y 310 gDQO/kg de aserrín, cáscara de cacahuete y cebada, respectivamente (Figura 6.13).

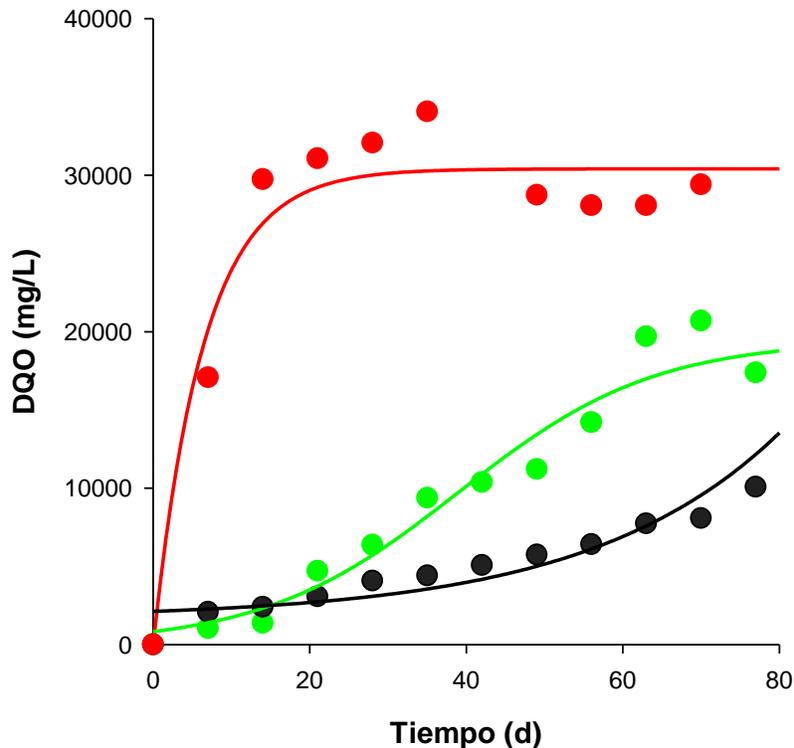


Figura 6.12 DQO en lixiviados de (●) aserrín, (●) cáscaras de cacahuete y (●) cebada. Los símbolos corresponden a los datos experimentales y las líneas continuas, a los ajustes a un modelo sigmoideal (aserrín), exponencial (cacahuete) y de aumento exponencial a un máximo (cebada).

6.3.3 COT

La liberación de materia orgánica se relaciona directamente con la concentración de carbono orgánico total (COT) medida en el medio. Como se muestra en la Figura 6.14, la cebada es el material que desprende la mayor concentración de COT, y con una velocidad constante. Tanto la velocidad de la lixiviación como la concentración de COT liberada por la cebada fueron prácticamente iguales a los reportados por Ramírez (2014) para períodos de lixiviación equiparables. Por su parte, el aserrín y la cáscara de cacahuete mostraron un comportamiento similar entre sí en lo que a la liberación de COT se refiere.

Al cabo de 35 días, se lixiviaron 14766, 17855 y 83295 mgC/kg de aserrín, cáscaras de cacahuate y granos de cebada, respectivamente. En pruebas de lixiviación con aserrín de pino, Svensson *et al.* (2014) encontraron una cantidad mayor de COT (cerca de 45500 mg/kg) después de 14 días. Según estos autores, después de este período se alcanzará un equilibrio y la concentración de COT permanecerá constante. McLaughlan y Al-Mashaqbeh (2009) reportaron cantidades menores de COT (4800 vs. 5824 mg/kg en nuestro estudio) lixiviadas por aserrín de pino luego de 7 días. Estos autores mencionan que factores tales como el tamaño de partícula, la especie vegetal de origen, el tiempo de contacto y la relación peso de material:volumen de líquido pueden acarrear diferencias en los resultados de ensayos de lixiviación con aserrín.

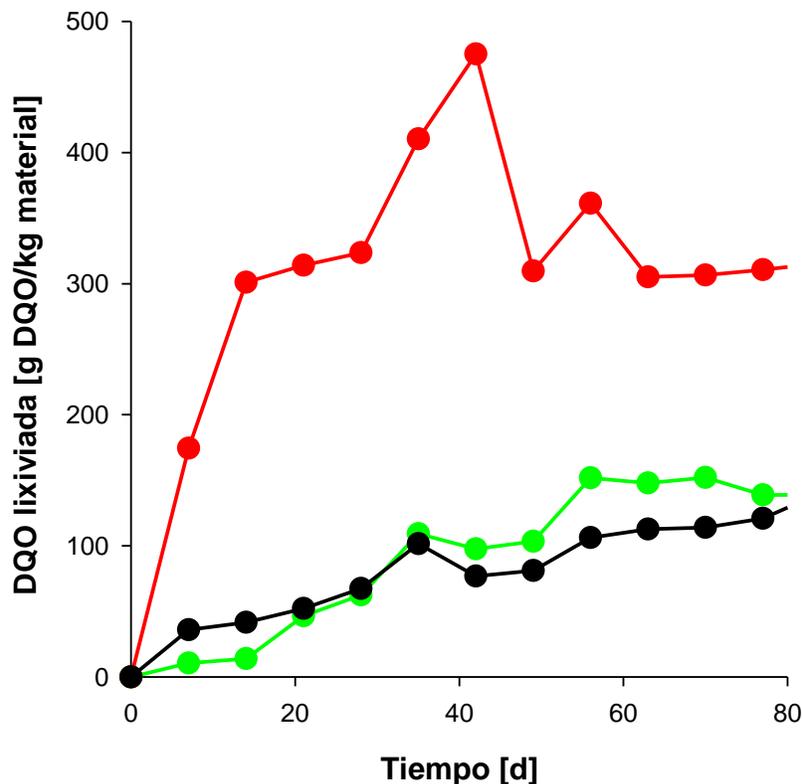


Figura 6.13 DQO lixiviada por gramo de (●) aserrín, (●) cáscaras de cacahuate y (●) cebada.

Dado que se contaba con la proporción de C contenido en los materiales originales (§ 5.3.1), fue posible calcular el % de C que se lixivió al medio acuoso. Así, al cabo de 35 días, en la fase líquida se encontraba el 2.9, 4.8 y 18.7% del carbono inicial contenido en el aserrín, las cáscaras de cacahuate y la cebada, respectivamente. El porcentaje de C lixiviado del aserrín luego de siete días (1.2%) es similar al

reportado por McLaughlan y Al-Mashaqbeh (2009) para aserrín de pino y el mismo tiempo de lixiviación (1.1%).

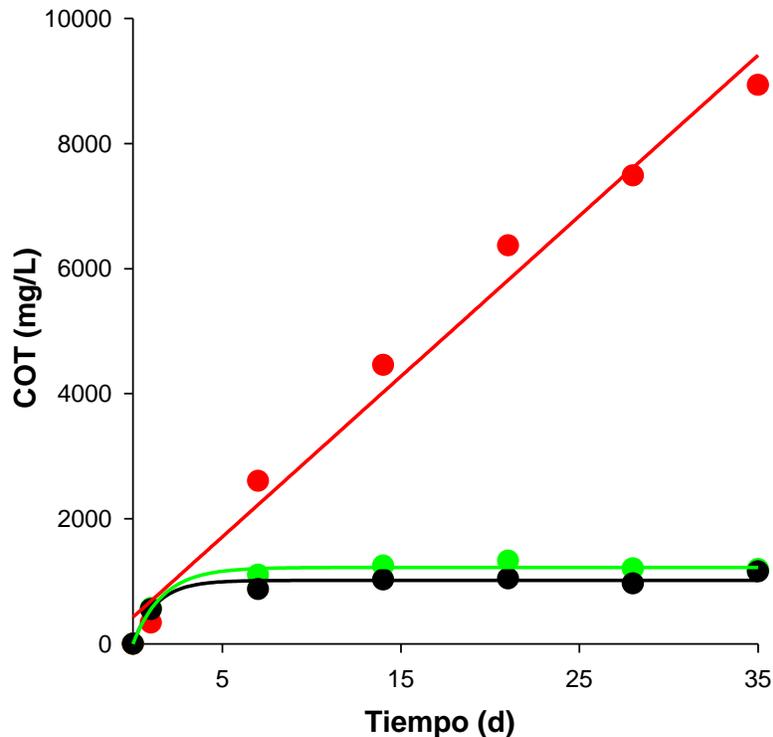


Figura 6.14 COT en lixiviados de (●) aserrín, (●) cáscaras de cacahuate y (●) cebada. Los símbolos corresponden a los datos experimentales y las líneas continuas, a los ajustes a un modelo de aumento exponencial a un máximo (aserrín y cacahuate) y a uno lineal (cebada).

La liberación lenta de COT a partir del aserrín o las cáscaras de cacahuate puede parecer un inconveniente si lo que se busca es un donador exógeno de carbono. Sin embargo, estos materiales pueden asegurar un suministro sostenido de carbono en un proceso biológico de tratamiento del agua. De esta forma, estos materiales no se agotan rápidamente, ni requieren ser cambiados con frecuencia para garantizar la operación del reactor (Healy *et al.*, 2012).

6.3.4 UV₂₅₄

En virtud de que diversos compuestos no biodegradables (xenobióticos), sustancias húmicas, lignina y otros compuestos aromáticos absorben fuertemente radiación UV (Chang *et al.*, 1998), la medición de la absorbancia UV a 254 nm (UV₂₅₄) en muestras de agua se puede asociar a la presencia de estos compuestos; en

particular, se le considera un indicador de materia orgánica persistente (Wu *et al.*, 2011).

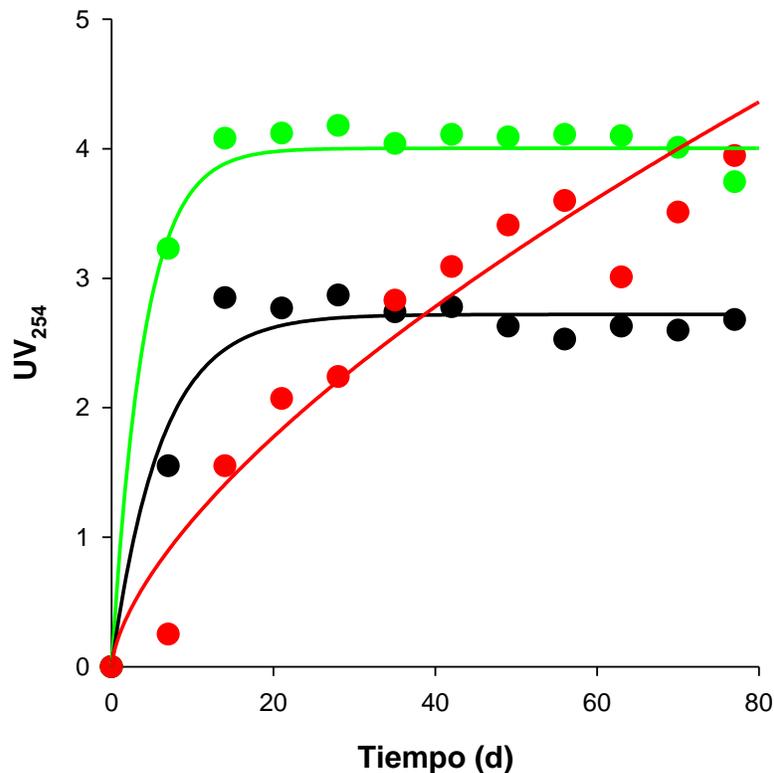


Figura 6.15 UV₂₅₄ en lixiviados de (●) aserrín, (●) cáscaras de cacahuate y (●) cebada. Los símbolos corresponden a los datos experimentales y las líneas continuas, a los ajustes a un modelo de aumento exponencial a un máximo (aserrín y cáscara de cacahuate) y de potencia (cebada).

La Figura 6.15 muestra la progresión de la UV₂₅₄ en los lixiviados de los materiales naturales. En este contexto, los resultados reflejarían la liberación, más que de sustancias húmicas o compuestos xenobióticos, de lignina y otros compuestos fenólicos que son abundantes en los materiales de estudio. La lignina es la molécula más abundante en la madera de *Pinus sylvestris* y en las cáscaras de cacahuate, en donde representa el 44.9% (Valentín *et al.*, 2010) y el 36.5%, (Martín *et al.*, 2006), respectivamente. En los granos de cebada la lignina se encuentra en una proporción mucho menor (2.9%; Kim y Dale, 2004).

Las cáscaras de cacahuate y la cebada son además una fuente considerable de compuestos fenólicos, cuya lixiviación contribuye a la producción de UV₂₅₄. Los derivados de los ácidos benzoico y cinámico, flavonoides, taninos, cumarinas y resorcinoles son ejemplos de compuestos fenólicos abundantes en materiales de origen vegetal (Dykes y Rooney, 2007). Estos compuestos tienen un papel crucial

en el crecimiento de plantas y en sus mecanismos de defensa contra daños e infecciones (Ballard, 2008). En granos de cebada, los compuestos fenólicos representan entre 450-1346 $\mu\text{g/g}$ (Dykes y Rooney, 2007).

6.3.5 DBO₅

Aunque la DBO₅ producida por cada material se midió mensualmente, sólo para el aserrín se obtuvieron resultados confiables que reflejaran todo el período de experimentación.

Luego de 30 días de tiempo de contacto, se midieron 950, 2000 y 13500 mgDBO₅/L en los lixiviados de aserrín, cáscaras de cacahuate y granos de cebada, respectivamente. La semejanza entre los dos primeros lixiviados y la elevada concentración producida por la cebada también se observó para la DQO (§ 6.3.2) y el COT (§ 6.3.3).

A partir de los resultados medidos a los 30 días, se obtuvo la relación DBO₅/DQO de los extractos. Esta relación se utiliza comúnmente como indicador de biodegradabilidad de compuestos orgánicos y de aguas residuales (Pitter y Chudoba, 1990). Así, se considera que un tratamiento biológico es adecuado para estas últimas si presentan relaciones DBO₅/DQO superiores a 0.4 (Tao *et al.*, 2005). Para los extractos de aserrín, cáscaras de cacahuate y granos de cebada, respectivamente, la relación DBO₅/DQO fue de 0.15, 0.42 y 0.49. El bajo valor de la relación DBO₅/DQO que encontramos para el aserrín se encuentra en el rango (0.14–0.33) reportado por Tao *et al.* (2005).

Por consiguiente, se asume que la mayor parte de la materia orgánica liberada por las cáscaras de cacahuate y la cebada se biodegradará fácilmente (en menos de 5 días), mientras que una proporción considerable de la materia orgánica liberada por el aserrín es persistente o lentamente biodegradable. Como se mencionó en el apartado anterior, el aserrín produce extractos acuosos ricos en lignina, así como en taninos, tropolonas, terpenos y otros compuestos fenólicos. A estas sustancias, que no son fácilmente biodegradables, se les atribuye también la toxicidad de los lixiviados de madera (Taylor y Carmichael, 2003; Tao *et al.*, 2005).

La relación DBO₅/DQO del extracto de aserrín pudo calcularse también después de 60 y 84 días de tiempo de contacto en la prueba de lixiviación, y en ambos casos fue de 0.04. Esto significa que hubo una disminución sustancial en la DBO₅ del extracto, y por consiguiente también en su tratabilidad biológica. Esta observación coincide con la realizada por Tao *et al.* (2005), quienes monitorearon un lixiviado de aserrín durante un lapso de tiempo mayor (cinco años) y midieron relaciones DBO₅/DQO de 0.33 y 0.14 al inicio y al final del experimento, respectivamente. Así

mismo, Taylor y Carmichael (2003) observaron una disminución de la relación DBO_5/DQO de un extracto de aserrín de 0.47 a 0.37 en un mes de contacto, lo que ellos atribuyeron a la biodegradación preferencial de los compuestos lábiles y de menor tamaño provenientes del aserrín.

La Figura 6.16 muestra un resumen de los resultados relativos a la materia orgánica liberada por los tres materiales al cabo de 35 días. Svensson *et al.* (2014) reportaron una producción de DBO_7 muy inferior a la de este estudio, de alrededor 5.35 $gDBO_7/kg$ de aserrín. Esta gran diferencia con respecto a nuestro resultado puede deberse a que los valores de DBO_5 y de DBO_7 no son equivalentes, y a que el tiempo de contacto que ellos emplearon fue considerablemente menor (24 h).

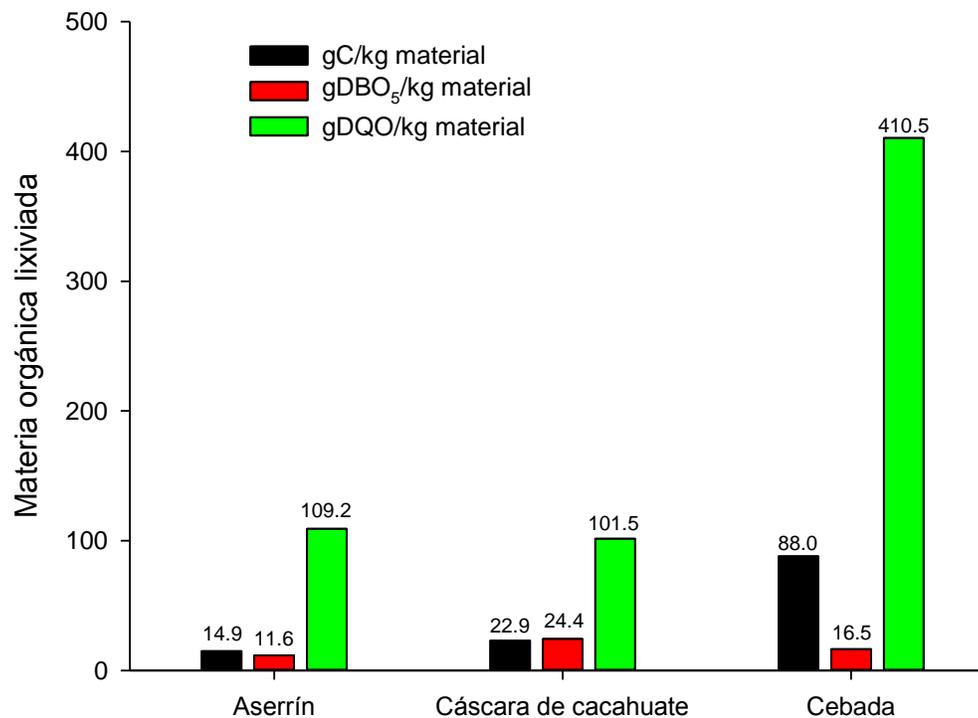


Figura 6.16 Materia orgánica lixiviada por los tres materiales naturales de estudio.

6.3.6 N-Kjeldahl

La liberación de NTK durante las pruebas de lixiviación se muestra en la Figura 6.17. Después de 77 días, los granos de cebada produjeron el lixiviado con la concentración más alta, de aproximadamente 5 mg N/L. Esto es similar a lo reportado por Ramírez (2014) para un periodo de lixiviación de 50 días, quien lo atribuye al contenido de proteínas de este cereal (7.5–15.6%). Al degradarse, éstas liberan nitrógeno orgánico y amoniacal al medio (Andersson *et al.*, 1999).

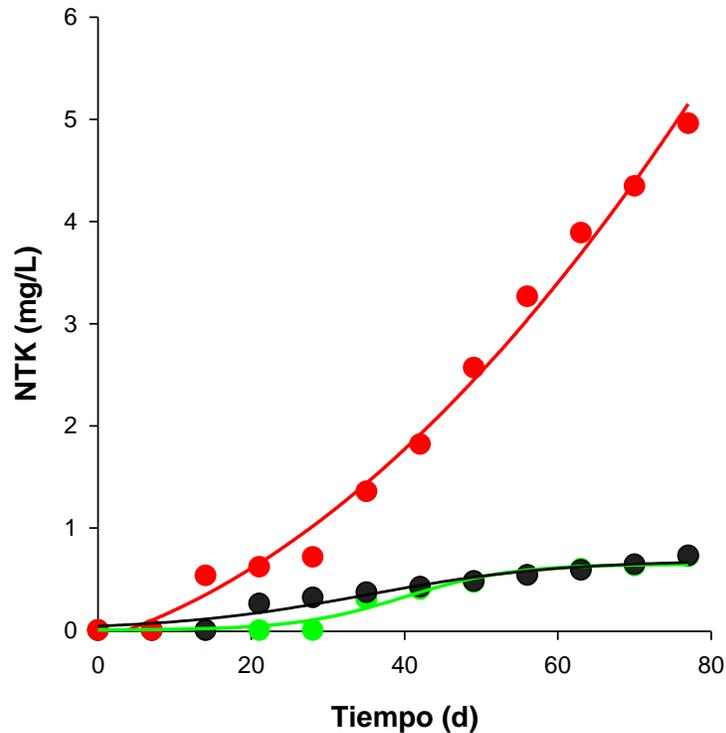


Figura 6.17 NTK en lixiviados de (●) aserrín, (●) cáscaras de cacahuate y (●) cebada. Los símbolos corresponden a los datos experimentales y las líneas continuas, a los ajustes a un modelo sigmoideal (aserrín y cacahuate) y polinomial (cebada).

Las concentraciones de NTK liberado por el aserrín y la cáscara de cacahuate son aproximadamente de 0.7 mg N/L; esta baja concentración se debe a que estos materiales están formados por moléculas orgánicas que carecen de nitrógeno, lo que se confirma con el análisis elemental de los materiales (§ 5.3.1). El aserrín está compuesto principalmente por carbohidratos, mientras que las cáscaras de cacahuate sólo presentan un bajo contenido de proteína (6-7%) (Kerr *et al.*, 1986).

6.3.7 N-NO₃⁻

La Figura 6.18 presenta la liberación de nitratos al medio acuoso por los diferentes materiales. No fue posible detectar nitritos debido a que las concentraciones resultaron estar por debajo del límite de detección de la técnica empleada (0.04 mg N-NO₂⁻/L). La cebada produjo las concentraciones más altas de nitratos en los lixiviados; esto puede atribuirse a los fertilizantes nitrogenados usados en los cultivos, que son asimilados por las plantas y que llegan al producto final (grano). Al ser solubles en agua, los nitratos se transfieren fácilmente al medio acuoso.

En la Figura 6.18 se observa también que, después de 50 días, los nitratos liberados por la cebada se consumen. Lo anterior podría explicarse por procesos de

respiración anóxica; no obstante, no se cuenta con datos de consumo de DBO_5 que permitan corroborar esta suposición. Para el caso del aserrín se alcanza una concentración de 8 mg N/L al final de la experimentación. La cáscara de cacahuate liberó una pequeña concentración de nitratos después de 20 días; sin embargo, estos podrían provenir de contaminación del material natural.

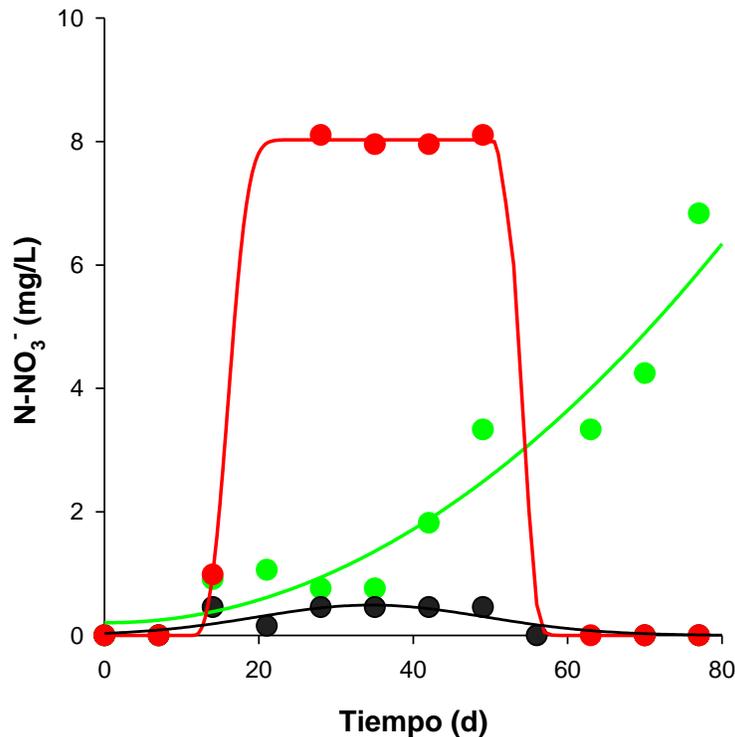


Figura 6.18 N-NO_3^- en lixiviados de (●) aserrín, (●) cáscaras de cacahuate y (●) cebada. Los puntos corresponden a los datos experimentales y las líneas continuas, a los ajustes a un modelo polinomial, gaussiano y sigmoidal¹, respectivamente.

6.3.8 PO_4^{3-}

La liberación de fósforo total de los tres materiales se muestra en la figura 6.19. El aserrín presentó cantidades apenas detectables de fósforo; por su parte, la cebada fue el soporte que produjo las concentraciones más altas (superiores a 1.5 mg/L).

De manera similar a los nitratos, la presencia de este nutriente puede deberse al uso combinado de fertilizantes nitrogenados y fosfatados, que tiene como objetivo mejorar el rendimiento de los cultivos. Estos compuestos pueden migrar con relativa facilidad de los suelos a la cebada.

¹ El ajuste sigmoidal (modelo de Weibull) sólo corresponde a la primera parte de la cinética (<50 h).

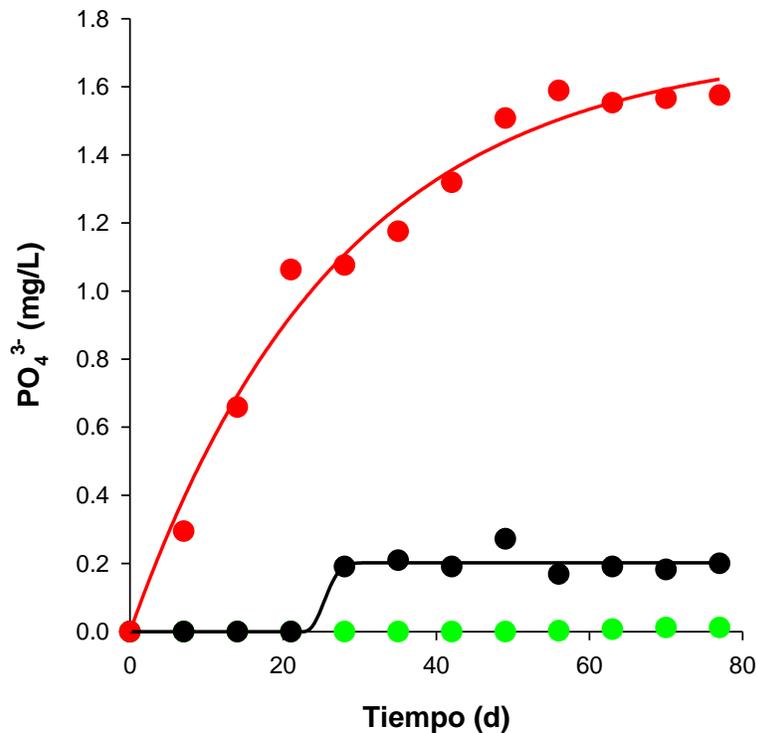


Figura 6.19 PO_4^{3-} en lixiviados de (● verde) aserrín, (● negro) cáscaras de cacahuate y (● rojo) cebada. Los puntos corresponden a los datos experimentales y las líneas continuas, a los ajustes a un modelo sigmoideal (cacahuate) y de aumento exponencial a un máximo (cebada).

De la segunda parte experimental se resume que, aunque la cebada es el material que produce las mayores cantidades de materia orgánica biodegradable, libera también las mayores concentraciones de nutrientes (NTK , N-NO_3^- y PO_4^{3-}). Estas no son muy elevadas, pero por la posibilidad de generar contaminación cruzada justamente con los compuestos que se pretende eliminar, consideramos que la cebada no es un donador adecuado de carbono. El aserrín y las cáscaras de cacahuate se comportaron de modo muy similar en las pruebas de lixiviación. No obstante, el último material se desintegra fácilmente, y aporta más color y sólidos suspendidos (datos no mostrados) que el aserrín. Por lo tanto, este último material es una buena fuente exógena de carbono en un proceso biológico de remoción total de nitrógeno.

7. Conclusiones y perspectivas

Para cumplir con los dos primeros objetivos de este trabajo, se aislaron poblaciones microbianas nitrificantes y desnitrificantes a partir de muestras de agua superficial. Posteriormente se hicieron ensayos por lote para comprobar que las bacterias aisladas realizaran las biotransformaciones correspondientes. Para los microorganismos nitrificantes, esto se confirmó por la disminución de la concentración de N-NH_4^+ y el aumento de la A_{600} . En los ensayos realizados con los organismos nitrificantes no fue posible medir un cambio en la concentración de N-NO_2^- que evidenciara la conversión de tal especie a N-NO_3^- . Sin embargo, la progresión de la A_{600} que se observó en el ensayo posiblemente fue un indicio de que la población aislada es capaz de nitratar. Por último, en el caso de los ensayos realizados con las bacterias desnitrificantes aisladas, no se pudo confirmar si éstas crecieron a partir de la medición de la A_{600} . No obstante, el consumo de la DQO confirmó que estos microorganismos utilizaron las fuentes de carbono disponibles para realizar un proceso de desnitrificación.

En lo concerniente a la selección de una fuente adecuada de materia orgánica para un proceso desnitrificante, se analizaron los lixiviados de tres materiales naturales en términos de liberación de materia orgánica, compuestos nitrogenados y fósforo total. Observamos que el aserrín y las cáscaras de cacahuate son fuentes de carbono adecuadas, ya que liberan una menor cantidad de nutrientes si se les compara con la cebada. Además, del aserrín se lixivia materia orgánica a un ritmo sostenido, al menos durante los primeros 80 días, por lo que no necesita ser reemplazado frecuentemente de un reactor biológico desnitrificante. Por lo tanto, concluimos que el aserrín representa una buena opción como fuente exógena de carbono, ya que, a pesar de que donan materia orgánica en una proporción similar, las cáscaras de cacahuate sufren una desintegración considerable que podría contribuir al aumento de sólidos en suspensión.

Aún se requiere evaluar si los consorcios aislados utilizan como fuente de carbono la materia orgánica lixiviada por el aserrín o las cáscaras de cacahuate, con la finalidad de proponer un sistema de tratamiento biológico. Por último, debe validarse el funcionamiento del sistema con un efluente real que presente una baja relación C:N.

8. Referencias bibliográficas

- Andersson A.M., Cajsa E., Andersson R., Regner S., Aman P. (1999) Chemical and physical characteristics of different barley samples. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79: 979-981.
- APHA (2012) Standard methods for the examination of water, 22nd edition. American Public Health Association, Baltimore.
- Asare E.K., Jaiswal S., Maley J., Båga M., Sammynaiken R., Rosnagel B.G., Chibbar R.N. (2011) Barley grain constituents, starch composition, and structure affect starch in vitro enzymatic hydrolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(9): 4743-4754.
- Ballard T.S.A. (2008) Optimizing the extraction of phenolic antioxidant compounds from peanut skins. Doctoral dissertation, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA.
- Brierley E.D.R., Wood M. (2001) Heterotrophic nitrification in an acid forest soil: isolation and characterization of a nitrifying bacterium. *Soil Biology and Chemistry*, 33: 1403-1409.
- Campos J.L., Garrido-Fernández J.M., Méndez R., Lema J.M. (1999) Nitrification at high ammonia loading rates in an activated sludge unit. *Bioresource Technology*, 68(2): 141-148.
- Carrera J., Baeza J.A., Vicent T., Lafuente J. (2003) Biological nitrogen removal of high-strength ammonium industrial wastewater with two-sludge system. *Water Research*, 37(17): 4211-4221.
- Cervantes C.F., Pérez J., Gómez J. (2000) Avances en la eliminación biológica del nitrógeno de las aguas. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 42: 7382.
- Chang E.E., Chiang P.C., Lin T.F. (1998) Development of surrogate organic contaminant parameters for source water quality standards in Taiwan, ROC. *Chemosphere*, 37(4): 593-606.
- Chen T.K., Ni C.H., Chen J.N., Lin J. (2003) High-strength nitrogen removal of optoelectronic industrial wastewater in membrane bioreactor - a pilot study. *From Nutrient Removal to Recovery*, 48(1): 191-198.
- Deago E., Pizarro G.E. (2013) Denitrification of drinking water using *Saccharum spontaneum* L. as a natural organic solid substrate. *Journal of Water Supply: Research and Technology – Aqua*, 62(7): 477-485.
- Diaz R.J., Rabalais N.N., Breitburg D.L. (2012) *Agriculture's impact on aquaculture: Hypoxia and eutrophication in marine waters*. Organisation for Economic Co-operation and Development.
- Dykes L., Rooney L.W. (2007) Phenolic compounds in cereal grains and their health benefits. *Cereal Foods World*, 52(3): 105-111.
- Félix S.J.N., Gutiérrez C.T., Lemos P.A., Ortiz J.M.A., Pescador E.N.L., Varela F.L. (1996) Manual de laboratorio de ecología microbiana. Instituto Politécnico Nacional, México.
- Fernández-Nava Y., Marañón E., Soons J., Castrillón L. (2010) Denitrification of high nitrate concentration wastewater using alternative carbon sources. *Journal of Hazardous Materials*, 173(1): 682-688.

- Fontenot Q., Bonvillain C., Kilgen M., Boopathy R. (2007) Effects of temperature, salinity, and carbon:nitrogen ratio on sequencing batch reactor treating shrimp aquaculture wastewater. *Bioresource Technology*, 98(9): 1700-1703.
- Glover H.E. (1985) The relationship between inorganic nitrogen oxidation and organic carbon production in batch and chemostat cultures of marine nitrifying bacteria. *Archives of Microbiology*, 142(1): 45-50.
- Godini H., Rezaee A., Khavanin A., Ahmadabadi A.N., Rastegar S., Hossini H. (2011) Heterotrophic biological denitrification using microbial cellulose as carbon source. *Journal of Polymers and the Environment*, 19(1): 283-287.
- Grady C.P., Smets B.F., Barbeau D.S. (1996) Variability in kinetic parameter estimates: a review of possible causes and a proposed terminology. *Water Research*, 30(3): 742-748.
- Green J.S., Prakash O., Gihring M.T., Akob M.D., Jasrotia P., Jardine M.P., Watson B.D., Brown D.S., Palumbo V.A., Kostka E.J. (2010) Denitrifying bacteria isolated from terrestrial subsurface sediments exposed to mixed-waste contamination. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(10): 3244–3254.
- Greenan C.M., Moorman T.B., Kaspar T.C., Parkin T.B., Jaynes D.B. (2006) Comparing carbon substrates for denitrification of subsurface drainage water. *Journal of Environmental Quality*, 35(3): 824-829.
- Hagopian D.S., Riley J.G. (1998) A closer look at the bacteriology of nitrification. *Aquacultural Engineering*, 18: 223- 244.
- Harley P.J. (2002) Laboratory exercises in microbiology. McGraw-Hill, Boston.
- Healy M.G., Ibrahim T.G., Lanigan G.J., Serrenho A.J., Fenton O. (2012) Nitrate removal rate, efficiency and pollution swapping potential of different organic carbon media in laboratory denitrification bioreactors. *Ecological Engineering*, 40: 198-209.
- Huiliñir C.E., Aspé E.R., Roeckel M.D. (2008) Remoción de carbono y nitratos de vertidos de la industria salmonera usando reactores tubulares. *Información Tecnológica*, 19(6): 33-46.
- Islam M., George N., Zhu J., Chowdhury N. (2009) Impact of carbon to nitrogen ratio on nutrient removal in a liquid–solid circulating fluidized bed bioreactor (LSCFB). *Process Biochemistry*, 44(5): 578-583.
- Jones B.W., Westerman W.F., Losordo M.T. (2007) Wood chips and wheat straw as alternative biofilter media for denitrification reactors treating wastewater with high nitrate concentrations. *Aquacultural Engineering*, 37(3): 222–233.
- Josserand A., Cleyet-Marel J.C. (1979) Isolation from soils of *Nitrobacter* and evidence for novel serotypes using immunofluorescence. *Microbial Ecology*, 5: 197-205.
- Keen G.A., Prosser J.I. (1987) Steady state and transient growth of autotrophic nitrifying bacteria. *Archives of Microbiology*, 147: 73-79.
- Kerr T.J., Windham W.R., Woodward J.H., Benner R. (1986) Chemical composition and in-vitro digestibility of thermochemically treated peanut hulls. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 37(7): 632-636.
- Kim S., Dale B.E. (2004) Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass and Bioenergy*, 26(4): 361-375.
- Knowles R. (1982) Denitrification. *Microbiological Reviews*, 46(1): 43-70.

- Lewis R.F., Pramer D. (1958) Isolation of *Nitrosomonas* in pure culture. *Journal of Bacteriology*, 76(5): 524-528.
- Lukow T., Diekmann H. (1997) Aerobic denitrification by a newly isolated heterotrophic bacterium strain TL1. *Biotechnology Letters*, 19(11): 1157-1159.
- Manahan S.E. (2007) Introducción a la química ambiental. Editorial Reverté, Madrid.
- Martín C., López Y., Plasencia Y., Hernández E. (2006) Characterisation of agricultural and agro-industrial residues as raw materials for ethanol production. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 20(4): 443-447.
- Martins C.I.M., Eding E.H., Verdegem M.C.J., Heinsbroek L.T.N., Scheneider O., Blancheton J.P., Orbcastel E., Verreth J.A.J. (2010) New developments in recirculating aquaculture systems in Europe: A perspective on environmental sustainability. *Aquacultural Engineering*, 43: 83-93.
- Matilainen A., Gjessing E.T., Lahtinen T., Hed L., Bhatnagar A., Sillanpää M. (2011) An overview of the methods used in the characterisation of natural organic matter (NOM) in relation to drinking water treatment. *Chemosphere*, 83: 1431-1432.
- McLaughlan R.G., Al-Mashaqbeh O. (2009) Effect of media type and particle size on dissolved organic carbon release from woody filtration media. *Bioresource Technology*, 100(2): 1020-1023.
- Morello J.A., Granato P.A., Mizer H.E. (2002) Laboratory manual and workbook in microbiology, 7th edition. McGraw-Hill, Boston.
- Mubarak A., Howald R.A., Woodriff, R. (1977) Elimination of chloride interferences with mercuric ions in the determination of nitrates by the phenoldisulfonic acid method. *Analytical Chemistry*, 49(6): 857-860.
- ONU (2014) Water Quality – Water for Life Decade. Organización de las Naciones Unidas. <http://www.un.org/waterforlifedecade/quality.shtml> [en línea].
- Pirt S.J. (1975) Principles of microbe and cell cultivation. Blackwell Scientific Publications, Londres.
- Pitter P., Chudoba J. (1990) Biodegradability of organic substances in the aquatic environment. CRC Press, Boca Raton.
- Poth M. (1986) Dinitrogen production from nitrite by a *Nitrosomonas* isolate. *Applied and Environmental Microbiology*, 52(4): 957-959.
- Ramírez G.J. (2014) Propuesta de un proceso biológico para el tratamiento de efluentes con baja relación carbono:nitrógeno: caso de la industria acuícola. Tesis de maestría, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Hidalgo, México.
- Ramírez G.J., Beltrán H.I., Coronel O.C., Contreras L.E., Quezada C.M., Vázquez, R.G. (2013) Recirculating systems for pollution prevention in aquaculture facilities. *Journal of Water Resource and Protection*, 5: 5-9.
- Rivett M.O., Buss S.R., Morgan P., Smith J.W., Bemment C.D. (2008) Nitrate attenuation in groundwater: a review of biogeochemical controlling processes. *Water Research*, 42(16): 4215-4232.
- Rothermel M.C., Landis A.E., Barr W.J., Soratana K., Reddington K.M., Weschler M.K., Witter G., Harper W.F. (2013) A Life Cycle Assessment Based Evaluation of a Coupled Wastewater Treatment and Biofuel Production Paradigm. *Journal of Environmental Protection*, 4: 1018-1033.

- Satoh H., Nakamura Y., Ono H., Okabe S. (2003) Effect of oxygen concentration on nitrification and denitrification in single activated sludge flocs. *Biotechnology and Bioengineering*, 83(5): 604-607.
- Sawyer C.N., McCarty P.L., Parkin G.F. (2001) Química para ingeniería ambiental. Mc Graw-Hill, Bogotá.
- Schmidt C.A., Clark M.W. (2013) Deciphering and modeling the physicochemical drivers of denitrification rates in bioreactors. *Ecological Engineering*, 60, 276-288.
- Schulz C., Gelbrecht J.B., Rennert B. (2003) Treatment of rainbow trout farm effluents in constructed wetland with emergent plants and subsurface horizontal water flow. *Aquaculture*, 217: 207–221.
- Semarnat (2012) Calidad del Agua. En: Informe de la Situación del Medio Ambiente en México. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales, México. http://app1.semarnat.gob.mx/dgeia/informe_12/06_agua/cap6_3.html [en línea].
- Shan H., Obbard J. (2003) Ammonia removal from freshwater using nitrifying bacteria enriched from a seawater aquaculture pond. *Biotechnology Letters*, 25: 1469–1471.
- Soares M.I.M., Abeliovich A. (1998) Wheat straw as substrate for water denitrification. *Water Research*, 32(12): 3790-3794.
- Spieck E., Bock E. (2005) The lithoautotrophic nitrite-oxidizing bacteria. En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Springer, Heidelberg, pp. 149-153.
- Stephen J.R., McCaig A. E., Smith Z., Prosser J.I., Embley T.M. (1996) Molecular diversity of soil and marine 16S rRNA gene sequences related to β -subgroup ammonia-oxidizing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(11): 4147-4154.
- Svensson H., Marques M., Kaczala F., Hogland W. (2014) Leaching patterns from wood of different tree species and environmental implications related to wood storage areas. *Water and Environment Journal*, 28(2): 277-284.
- Tao W., Hall K.J., Masbough A., Frankowski K., Duff S.J. (2005) Characterization of leachate from a woodwaste pile. *Water Quality Research Journal of Canada*, 40(4): 476–483.
- Taylor R.B., Carmichael B.N. (2003) Toxicity and chemistry of aspen wood leachate to aquatic life: field study. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22(9): 2048–2056.
- Tortora J.G., Funke R.B., Christine L.C. (2007) Introducción a la microbiología, Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires.
- Trois C., Pisano G., Oxarango L. (2010) Alternative solutions for the bio-denitrification of landfill leachates using pine bark and compost. *Journal of Hazardous Materials*, 178(1): 1100-1105.
- Valentín L., Kluczek-Turpeinen B., Willför S., Hemming J., Hatakka A., Steffen K., Tuomela M. (2010) Scots pine *Pinus sylvestris* bark composition and degradation by fungi: Potential substrate for bioremediation. *Bioresource Technology*, 101(7): 2203-2209.
- Verbaendert I., De Vos P., Boon N., Heylen K. (2011) Denitrification in Gram-positive bacteria: an underexplored trait. *Biochemical Society Transactions*, 39(1): 254-258.
- Vossen E., Doolaeye H.A., Demewez M.H., De Meulenaer B., Szczepaniak S., Raes K., De Smet S. (2012) Effect of sodium ascorbate dose on the shelf life stability of reduced nitrite liver pâtés. *Meat Science*, 91: 29-35.

- Wallenstein M.D., Myrold D.D., Firestone M., Voytek M. (2006) Environmental controls on denitrifying communities and denitrification rates: insights from molecular methods. *Ecological Applications*, 16(6): 2143–2152.
- Wang P., Yuan Y., Li Q., Yang J., Zheng Y., He M., Geng H., Xiong L., Liu D. (2013) Isolation and immobilization of new aerobic denitrifying bacteria. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 76: 12-17.
- Warneke S., Schipper L.A., Matiassek M.G., Scow K.M., Cameron S., Bruesewitz D. A., McDonald I.R. (2011) Nitrate removal, communities of denitrifiers and adverse effects in different carbon substrates for use in denitrification beds. *Water Research*, 45(17): 5463-5475.
- WTW (2006) System OxiTop® Control-Operation Manual. WTW Measurements Systems, Heidelberg. http://www.globalw.com/downloads/WQ/oxitop_oc_100.pdf [en línea].
- Wu Y., He J., Hu Z., Yang L., Zhang N. (2011) Removal of UV 254 nm matter and nutrients from a photobioreactor-wetland system. *Journal of Hazardous Materials*, 194: 1-6.
- Zhang J., Feng C., Hong S., Hao H., Yang Y. (2012) Behavior of solid carbon sources for biological denitrification in groundwater remediation. *Water Science and Technology*, 65(9): 1696-1704.
- Zumft G.W. (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(4): 533- 616.