



00361

13
Zej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**DINAMICA DE POBLACIONES DE LOS LODOS ACTIVADOS
UTILIZADOS EN EL PROCESO DE BIODEGRADACION DE
EFLUENTES INDUSTRIALES**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS (BIOLOGIA)**

P R E S E N T A

ARIEL GONZALEZ CASAS

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

DIRECTOR DE TESIS: Dr. GERMAN BUITRON MENDEZ

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO

RESUMEN	1
LISTA DE FIGURAS.....	2
LISTA DE TABLAS.....	3
LISTA DE FOTOGRAFÍAS.....	4
LISTA DE ANEXOS.....	4
GLOSARIO	5
ABREVIATURAS	5
INTRODUCCIÓN	6
I ANTECEDENTES	7
HIPÓTESIS.....	9
II METODOLOGÍA	10
II.1 MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS.....	10
II.1.1 <i>Agar bacteriológico</i>	11
II.1.2 <i>Agar nutritivo</i>	11
II.1.3 <i>Peptona de caseína</i>	12
II.1.4 <i>Agar CGY</i>	12
II.1.5 <i>Agar R2A</i>	13
II.1.6 <i>Medio de cultivo Lowenstein modificado por Jensen</i>	13
II.1.7 <i>Procedimiento de siembra de micobacterias con medio Lowenstein</i>	14
II.2 SELECCIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO ADECUADO.....	14
II.2.1 <i>Pruebas de diferentes concentraciones del compuesto tóxico en el medio de cultivo</i>	15
II.2.2 <i>Preparación de las diluciones para la cuenta heterótrofa en placa</i>	16
II.3 AISLAMIENTO DE CEPAS PURAS DE BACTERIAS PARA LA DEGRADACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS.....	16
II.4 IDENTIFICACIÓN DE CEPAS PURAS DE BACTERIAS AEROBIAS.....	16
II.4.1 <i>Técnica de tinción de Gram</i>	16
II.4.2 <i>Sistema de identificación API 20E</i>	17
II.5 DESCRIPCIÓN Y OPERACIÓN DEL REACTOR PILOTO UTILIZADO.....	19
II.6 ACLIMATACIÓN DE MICROORGANISMOS A COMPUESTOS FENÓLICOS.....	20
II.7 DINÁMICA DE POBLACIONES DEL PROCESO DE LODOS ACTIVADOS.....	20
II.8 CINÉTICAS DE DEGRADACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS.....	21
II.9 TÉCNICAS ANALÍTICAS EMPLEADAS.....	22
II.10 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC).....	25

III RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
III.1 MEDIOS DE CULTIVOS EMPLEADOS PARA BACTERIAS ACLIMATADAS A COMPUESTOS FENÓLICOS	26
III.1.2 VIABILIDAD DURANTE LA ACLIMATACIÓN	29
III.2 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS	30
III.2.1 <i>Temperatura y pH</i>	30
III.2.2 <i>Sólidos suspendidos totales</i>	30
III.2.3 <i>Índice volumétrico de lodo</i>	31
III.2.4 <i>Carbón orgánico total y fenoles</i>	31
III.2.5 <i>Determinación de cloruros</i>	32
III.3 MORFOLOGÍA DEL FLÓCULO EN EL PERIODO DE ACLIMATACIÓN.....	34
III.3.1 <i>Evolución de la morfología del flóculo durante el periodo de aclimatación a fenoles</i> ...	35
III.3.2 <i>Diferentes poblaciones que constityen a los lodos activados durante el periodo de aclimatación</i>	35
III.3.3 <i>Diferentes especies de protozoarios observados en el periodo de aclimatación</i>	36
III.3.4 <i>Diferentes especies de rotíferos en el periodo de aclimatación</i>	37
III.4 DINÁMICA DE POBLACIONES DE LOS LODOS ACTIVADOS	38
III.4.1 INTERACCIONES ENTRE MICROORGANISMOS DEL PROCESO DE LOS LODOS ACTIVADOS	39
III.4.1.1 <i>Competencia</i>	39
III.4.1.2 <i>Predación</i>	39
III.4.1.3 <i>Herbivoría</i>	39
III.4.1.4 <i>Simbiosis</i>	39
III.4.1.5 <i>Parasitismo</i>	40
III.4.1.6 <i>Comensalismo</i>	40
III.4.1.7 <i>Mutualismo</i>	40
III.4.2 CADENA ALIMENTICIA EN LOS LODOS ACTIVADOS	42
III.4.2.1 <i>Nichos ecológicos de los lodos activados</i>	43
III.4.3 DINÁMICA DE POBLACIONES BACTERIANA	45
III.4.4 DINÁMICA DE POBLACIONES DE PROTOZOARIOS Y ROTÍFEROS.....	49
III.4.5 DINÁMICA DE POBLACIONES DE ALGAS, HONGOS, NEMÁTODOS, PROTOZOARIOS Y ROTÍFEROS	51
IV CINÉTICAS DE DEGRADACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS.....	52
IV.1 APLICACIÓN DEL MODELO DE HALDANE	53
IV.2 DETERMINACIÓN DE LA POBLACIÓN BACTERIANA RESPONSABLE DE LA DEGRADACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS	55
IV.3 CINÉTICAS DE DEGRADACIÓN DEL PROCESO DE LODOS ACTIVADOS ACLIMATADOS A FENOLES.....	56
IV.4 AISLAMIENTO DE MICOBACTERIAS.....	70
CONCLUSIONES	71
BIBLIOGRAFÍA	73
ANEXOS	79

DEDICATORIAS

A mi madre

María Teresa Casas Rodríguez por su amor, dedicación y paciencia

A mi padre

Carlos Ariel González Reyes Vera por su filosofía de la vida

A mi hermano

Omar Jesús González Casas por su ejemplo

A la mujer que decidió enfrentar este reto junto conmigo

Elizabeth Graciela Saldaña Breceda

A la vida misma....

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Germán Buitrón Méndez por haber aceptado ser el director del presente trabajo y por compartir experiencias personales, así como por sus comentarios y sugerencias al respecto.

A los miembros del jurado de tesis: Dra. Marisa Mazari Hiriart, Dra. Valeria Sousa Saldivar, M. en C. Azucena Herroz Zamorano, Dr. Teófilo Herrera Suárez, Dr. Zenón Cano Santana y el M. en C. Rodrigo Arturo Cardenas Espinoza por la revisión crítica del manuscrito, por sus acertados comentarios y sugerencias.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico UNAM (PAPIIT IN 500794), por el apoyo económico otorgado para la realización de este trabajo de tesis.

A las familias: Casas Rodríguez, González Reyes Vera, Sevilla Chávez, Vega Ruíz, Castil Vega, Ortiz Lozano, Martínez Estañol, Uribe Richaud, Richaud Moreno, Tirado Ventura, Granados Beltrán, Saldaña Breceda, Hernández Mira, Saldaña Mier, Ortega Sarkantyu y García Jon por su invaluable apoyo.

A la Facultad de Ciencias por otorgarme la formación académica necesaria para luchar en la vida y por todos los amigos que ahí conocí.

A la refaccionaria "LA ERMITA" S. A. de C. V. por su ayuda y amistad otorgadas a su servidor.

A la corporación "QUARRY" S. A. de C. V. por su amistad.

A "ALEBRÍJE" aplicaciones gráficas por el diseño de la portada de tesis.

A todo el personal científico pertenecientes los laboratorios de Limnología, Ecología de Pesquerías, Zooplancton, Políquetos, Física y Genética del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM, por que sin su amistad y apoyo no hubiera tenido sentido el trabajo de todo este tiempo.

Al anfoño, chais, manuel y a todas las morsis.....por los momentos y chelas compartidas.

Al M. en I. B. B. Edgar Vázquez Contreras por ser lo más cercano a un hermano.

Al Dr. Adalberto Noyola Robles coordinador de bioprocesos ambientales del Instituto de Ingeniería de la UNAM, por su apoyo y facilidades para la realización de la tesis.

A todos los becarios del II por compartir vivencias inolvidables con cada uno de ellos.

Y A TODO AQUEL QUE SE SIENTA ALUDIDO

GRACIAS

Venir a aumentar el número de los vivientes, ser un hombre más donde hay tantos hombres, oír decir de sí: **“Es un tal fulano”** es ser un árbol más en una alameda. pero pasar cinco y seis lustros oscuros y desconocidos, y llegar una noche entre otras, convocar a un pueblo, hacer tributaria su curiosidad, conmover el corazón, subyugar el juicio, hacerse aplaudir y aclamar y oír al día siguiente de sí mismo al pasar por una calle o por el prado: “Aquel es el escritor de la comedia aplaudida” eso es algo; es nacer; es devolver al autor de nuestros días por un apellido oscuro un hombre claro; es dar alcurnia a sus ascendientes en vez de recibirla de ellos; es sobreponerse al vulgo y decirle: “Me has creído tu inferior, sal de tu engaño; poseo tu secreto y el de tus sensaciones, domino tu aplauso y tu admiración; de hoy más no estará en tu mano despreciarme, medianía; calumníame, aborreceme, si quieres, pero alaba”. Y conseguir esto un tiempo definido, y tener mañana un nombre, una posición, una carrera hecha en la sociedad, el que quizá no tenía ayer dónde reclinar su cabeza, es algo, y prueba mucho en favor del poder del talento. Esta aristocracia es por lo menos tan buena como las demás, pues que tiene el lustre de la cuna y pues que vale dinero como al de la riqueza....

Los amantes de Teruel

Drama en cinco actos, en prosa y verso,
por don Juan Ignacio (sic) de Hartzembusch.
Periodico: *El Español*, 22 de enero de 1837

RESUMEN

Se describe la dinámica de poblaciones de los lodos activados en el periodo de aclimatación a una mezcla, a proporciones iguales, de compuestos fenólicos (fenol, 4-clorofenol, 2,4-diclorofenol y 2,4,6-triclorofenol) a una concentración total de 40 mg/l. Para llevar a cabo el periodo de aclimatación se utilizó un reactor de vidrio de dos litros con un aireador en el fondo. El reactor estuvo funcionado de manera discontinua secuencial (SBR). Se utilizaron técnicas para el análisis de agua descritas por APHA (1992). El seguimiento de la dinámica de poblaciones de los lodos activados durante la aclimatación se realizó durante 63 días de operación del reactor. Las poblaciones de bacterias se aislaron en un medio de cultivo sólido de peptona caseína con 0.1 mg/l de la mezcla de fenoles. Las poblaciones de bacterias que prevalecieron durante la aclimatación fueron *Chryseomonas luteola*, *Pseudomonas* sp., *Aeromonas* sp., *Flavimonas oryzihabitans* y micobacterias. La presencia de los protozoarios *Vorticella convallaria* y el rotífero *Proales* sp. se observó hasta el día 63 de operación del reactor. Las poblaciones de nemátodos, hongos y algas se observaron hasta los días 50, 57 y 61 respectivamente. La mezcla de clorofenoles fue degradada con porcentajes de eliminación superiores al 75 %. El periodo de aclimatación se caracterizó por presentar una disminución en las poblaciones de bacterias, hongos, algas, nemátodos, protozoarios y rotíferos. Se presentó un cambio morfológico y una disminución del consorcio de microorganismos que forman al flóculo. Se comprobó la degradación de cada uno de los compuestos fenólicos mediante la cinética de degradación, después de 120 días de operación del reactor, para los lodos activados aclimatados y para las cepas puras de *Chryseomonas luteola*, *Aeromonas* sp., *Pseudomonas* sp. y *Flavimonas oryzihabitans*. El consorcio de los lodos activados aclimatados fue el que presentó las tasas de degradación más grandes para los fenoles utilizados: 407 mg fenol/gSSV-d, 784 mg 4-clorofenol/gSSV-d, 610 mg 2,4-diclorofenol/gSSV-d, y 457 mg 2,4,6-triclorofenol/gSSV-d, en comparación con las tasas de degradación obtenidas para las cepas puras.

Lista de Figuras

- II.5.1 Etapas del funcionamiento del reactor discontinuo secuencial (SBR).
- II.8.1 Sistema empleado para las cinéticas de degradación de compuestos fenólicos.
- III.1.1 Bacterias viables, medio de cultivo peptona de caseína.
- III.2.2.1 Patrón de cambio en el reactor de sólidos suspendidos totales $X = 1.15 \times 10^9$ UFC/l.
- III.2.3.1 Índice volumétrico de lodos; Aclimatación a fenoles.
- III.2.4.1 Eficiencias de degradación para COT y fenoles.
- III.2.5.1 Cloruros en el periodo de aclimatación.
- III.4.1.1 Nichos ecológicos de los lodos activados.
- III.4.2.1 Cadena alimenticia aplicada a los lodos activados durante la aclimatación.
- III.4.2.1.1 Sentido de las depredaciones en los lodos activados.
- III.4.3.1 Periodos en los que están presentes cada elemento de la población bacteriana.
- III.4.3.2 Tiempo de retención celular, en el periodo de aclimatación.
- III.4.4.1 Periodos en los que están presentes cada elemento de las poblaciones de protozoarios y rotíferos.
- III.4.5.1 Dinámica de poblaciones de algas, hongos, nemátodos, protozoarios y rotíferos.
- IV.2.1 Eficiencias de degradación del COT.
- IV.3.1 Patrones de degradación de los fenoles por los lodos activados aclimatados.
- IV.3.2 Cinética de degradación del fenol por los lodos activados aclimatados.
- IV.3.3 Cinética de degradación del 4-clorofenol por los lodos activados aclimatados.
- IV.3.4 Cinética de degradación del 2,4-diclorofenol por los lodos activados aclimatados.
- IV.3.5 Modelo de Haldane para el COT obtenido por los lodos activados aclimatados.
- IV.3.6 Patrones de degradación de los fenoles por *Chryseomonas luteola*.
- IV.3.7 Cinética de degradación del COT por *Chryseomonas luteola*, modelo de orden cero.
- IV.3.8 Patrones de degradación de los fenoles por *Aeromonas* sp.
- IV.3.9 Modelo de Haldane para el COT obtenido por *Aeromonas* sp.
- IV.3.10 Patrones de degradación de los fenoles por *Pseudomonas* sp.
- IV.3.11 Modelo de Haldane para el COT obtenido por *Pseudomonas* sp.
- IV.3.12 Patrones de degradación de los fenoles por *Flavimonas oryzihabitans*.
- IV.3.13 Modelo de Haldane para el COT obtenido por *Flavimonas oryzihabitans*.
- IV.3.14 Determinación de cloruros.

Lista de Tablas

- I.1 Límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a cuerpos receptores provenientes de las industrias que utilizan fenoles.
 - II.1.1.1 Características físicas del medio de cultivo del agar bacteriológico.
 - II.1.2.1 Contenido del medio de cultivo del agar nutritivo.
 - II.1.3.1 Contenido del medio de cultivo de peptona de caseína.
 - II.1.3.2 Características del medio de cultivo de peptona de caseína.
 - II.1.4.1 Contenido del medio de cultivo CGY.
 - II.1.5.1 Características del medio de cultivo del agar R2A.
 - II.1.6.1 Contenido del medio de cultivo Lowenstein modificado por Jensen para aislamiento de micobacterias.
 - II.2.1.1 Propiedades de los compuestos fenólicos.
 - II.4.2.1 Pruebas bioquímicas estandarizadas del sistema API 20E.
 - II.4.2.2 Clasificación para las pruebas del API 20E de acuerdo a los grupos y valores de cada uno.
 - II.5.1 Soluciones de nutrimentos utilizados dentro del reactor durante la aclimatación.
 - II.9.1 Técnicas analíticas empleadas.
 - II.10.1 Valores de t_R para los clorofenoles utilizados.
- III.1.1 Número de UFC/ml (10^5) y medios de cultivo empleados adicionados con diferentes concentraciones de fenoles, Promedios \pm desviación estándar. Inóculo proveniente de la planta de tratamiento de aguas residuales de CU.
- III.1.2 Número de UFC/ml (10^4) y medios de cultivos, Promedios \pm desviación estándar. Inóculo proveniente de la planta de tratamiento de aguas residuales de Ecatepec.
- III.1.3 Número de UFC/ml (10^6) y comparación del medio de cultivo peptona de caseína con el agar R2A, Promedios \pm desviación estándar. Inóculo proveniente de la planta de tratamiento de aguas residuales de CU.
- III.2.5.1 Porcentajes de eficiencia de eliminación del COT, Cl⁻ y clorofenoles, durante el periodo de aclimatación.
- III.4.1 Factores que limitan la distribución en el proceso de lodos activados.
- III.4.3.1 Bacterias identificadas Gram negativas y porcentajes de identificación del sistema Api 20E.
- III.4.3.2 Microorganismos registrados en la biodegradación de compuestos fenólicos, sistemas empleados y modo de operación.
- III.4.3.3 Biodegradación de compuestos fenólicos por consorcios de microorganismos.
- III.4.4.1 Protozoarios y rotíferos presentes en el inicio de la aclimatación a fenoles.
- IV.2.1 Identificación de bacterias (API 20E) Gram negativas aclimatadas a la degradación de fenoles.
- IV.3.1 Coeficientes biocinéticos de la degradación de los fenoles para lodos activados aclimatados a 40 mg/l de fenoles.
- IV.3.2 Coeficientes biocinéticos obtenidos de las cinéticas de degradación del COT, con 40 mg/l de la mezcla de clorofenoles.
- IV.3.3 Tasas de eliminación de sustrato obtenidas para los compuestos fenólicos.
- IV.3.4 Coeficientes biocinéticos para fenoles utilizando diferentes consorcios microbianos.
- IV.3.5 Tasas máximas específicas de compuestos orgánicos eliminados.

Lista de Fotografías

- III.3.1.1 Morfología del flóculo con agregaciones de hongos y algas, antes de ponerlo en contacto con la mezcla de los fenoles; 987 mg SST/l, 650 mg SSV/l, 385 mg SSF/l.
- III.3.1.2 Morfología del flóculo, fija a él *Vorticella convallaria* a los 26 días de operación del reactor; 490 mg SST/l, 275 mg SSV/l, 215 mg SSF/l.
- III.3.1.3 Morfología del flóculo y protozooario muerto a los 60 días de operación del reactor; 290 mg SST/l, 180 mg SSV/l, 120 mg SSF/l.
- III.3.2.1 *Aspidisca costata* sobre el flóculo en el día 3 de operación del reactor; 915 mg SST/l, 625 mg SSV/l, 290 mg SSF/l.
- III.3.2.2 Agregaciones de hongos en el flóculo en el día 6 de operación del reactor; 815 mg SST/l, 470 mg SSV/l, 365 mg SSF/l.
- III.3.2.3 Alga espirulada en el día 10 de operación del reactor; 745 mg SST/l, 450 mg SSV/l, 275 mg SSF/l.
- III.3.3.1 *Vorticella convallaria* en el día 43 de operación del reactor; 540 mg SST/l, 355 mg SSV/l, 185 mg SSF/l.
- III.3.3.2 *Vorticella communis* en el día 24 de operación del reactor; 525 mg SST/l, 265 mg SSV/l, 165 mg SSF/l.
- III.3.3.3 *Vorticella* sp. en el día 7 de operación del reactor; 815 mg SST/l, 485 mg SSV/l, 360 mg SSF/l.
- III.3.4.1 *Monostyla* sp. a los 13 días de operación del reactor; 415 mg SST/l, 240 mg SSV/l, 175 mg SSF/l.
- III.3.4.2 *Proales* sp. a los 60 días de operación del reactor; 290 mg SST/l, 180 mg SSV/l, 120 mg SSF/l.

Lista de Anexos

- 1 Resultados a partir de los cuales se obtuvieron los coeficientes biocinéticos para la degradación del fenol por lodos activados aclimatados.
- 2 Resultados a partir de los cuales se obtuvieron los coeficientes biocinéticos para la degradación del 4-clorofenol por lodos activados aclimatados.
- 3 Resultados a partir de los cuales se obtuvieron los coeficientes biocinéticos para la cinética de degradación del 2,4-diclorofenol por lodos activados aclimatados.
- 4 Resultados a partir de los cuales se obtuvieron los coeficientes biocinéticos para la degradación del COT por lodos activados aclimatados.
- 5 Resultados a partir de los cuales se obtuvieron los coeficientes biocinéticos para la degradación del COT por *Aeromonas* sp.
- 6 Resultados a partir de los cuales se obtuvieron los coeficientes biocinéticos para la degradación del COT por *Pseudomonas* sp.
- 7 Resultados a partir de los cuales se obtuvieron los coeficientes biocinéticos para la degradación del COT por *Flavimonas oryzihabitans*.

Glosario

ADN	Ácido DesoxirriboNucleico
AGV	Ácidos Grasos Volátiles
API	Analytical Profile Index
ARN	Ácido RiboNucleico
COT	Carbón Orgánico Total
CU	Ciudad Universitaria
CHP	Cuenta Heterótrofa en Placa
DQO	Demanda Química de Oxígeno
DBO	Demanda Biológica de Oxígeno
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
IVL	Índice Volumétrico de Lodo
LAA	Lodos Activados Aclimatados
LSS	Lauril Sulfato de Sodio
NOM	Norma Oficial Mexicana
NMP	Número Más Probable
%RSS	Porcentaje de Reducción de Sólidos Suspendedos
SST	Sólidos Suspendedos Totales
SSV	Sólidos Suspendedos Volátiles
SSF	Sólidos Suspendedos Fijos
SMC	Suma de Mínimos Cuadrados
S₀/X₀	Sustrato Inicial / Biomasa Inicial
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
4-CF	4-CloroFenol
2,4-DCF	2, 4-DiCloroFenol
2, 4, 6-TCF	2, 4, 6-TriCloroFenol
K_i	Constante de inhibición de Haldane, mg/l
K_s	Constante de afinidad o de saturación, mg/l
S	Concentración del sustrato, mg/l
μ_{max}	Tasa de crecimiento máxima de la biomasa, h ⁻¹
q_v = mg/l/d	Tasa volumétrica de eliminación de sustrato
q_x = mg/g SSV/d	Tasa específica de eliminación de sustrato
q_x = mg de fenoles/UFC/d/10⁹	Tasa específica de eliminación de sustrato

Abreviaturas

d	días
fig	figura
h	horas
min	minutos
ml	mililitros
rpm	revoluciones por minuto

INTRODUCCIÓN

El incremento en la actividad industrial y la implantación de nuevas tecnologías de producción requieren del uso de sustancias producidas por el hombre, que son arrojadas al medio ambiente en concentraciones superiores a las que normalmente se encuentran en la naturaleza, denominadas en su conjunto compuestos xenobióticos. Este es el caso de los fenoles, los cuales están presentes en numerosos efluentes de aguas residuales industriales y en algunos cuerpos de aguas naturales. La Legislación Mexicana lista a los fenoles como contaminantes tóxicos prioritarios (SEDESOL, 1994).

Los procesos biológicos aerobios son utilizados exitosamente para la eliminación de los compuestos orgánicos tóxicos presentes en los efluentes de aguas residuales industriales (Buitrón *et al.* 1994; Cardinal y Stenstrom, 1994). En los procesos biológicos aerobios la degradación de los compuestos orgánicos se lleva a cabo por consorcios de microorganismos. Estos consorcios forman flóculos llamados **lodos activados** los cuales utilizan a los compuestos orgánicos presentes en el agua residual como fuente de energía. Los lodos activados están constituidos por poblaciones de bacterias, hongos, protozoarios, algas y algunas veces nemátodos. Las bacterias heterótrofas constituyen el grupo más importante, ya que son las responsables de la formación de flóculos y de llevar a cabo la biodegradación de compuestos orgánicos presentes en las aguas residuales.

Muchos han sido los microorganismos reportados en la literatura por su capacidad de biodegradar compuestos orgánicos específicos, ya sea dentro de un sistema de lodos activados, o bien aisladamente. Uno de los principales factores que distinguen la biodegradación de compuestos tóxicos es que éstos son inhibidores de los microorganismos. La presencia de un sustrato complejo, como en el caso de los efluentes industriales es otro factor de importancia, ya que un tóxico puede inhibir la biodegradación de los otros compuestos presentes en la mezcla.

Entre los grupos de microorganismos más citados en los lodos activados encontramos a las bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Citrobacter* y *Achromobacter* que degradan compuestos tóxicos (Silverstein *et al.* 1994, Buitrón, 1993). Sin embargo, poco se sabe de las comunidades microbianas que actúan sobre los compuestos orgánicos tóxicos a altas concentraciones. De la misma manera poco se sabe acerca de las condiciones óptimas para la estimación cuantitativa de los microorganismos que participan en la biodegradación de los tóxicos. Esto está relacionado con el hecho de que las técnicas descritas en la literatura generalmente se aplican para la enumeración de los microorganismos presentes en las aguas residuales domésticas. Sin embargo, al aclimatarse las poblaciones bacterianas experimentan un cambio en su metabolismo que hace probable que no se reproduzcan a una tasa óptima en los medios utilizados para su cuenta.

La intención de este trabajo es describir la dinámica de poblaciones de un sistema de lodos activados durante el periodo de aclimatación a una mezcla de compuestos fenólicos, así como establecer un técnica para cuantificar e identificar bacterias aclimatadas a compuestos fenólicos y estudiar las cinéticas de degradación de las bacterias responsables de la degradación de compuestos fenólicos.

I ANTECEDENTES

La producción de aguas residuales industriales en México es aproximadamente de 160 m³/s, de los cuales cerca del 45 % son producidas por las industrias química, de papel y celulosa, del petróleo, textil, siderúrgica y eléctrica (CONADE, 1992). Las Normas Oficiales Mexicanas (NOM) establecen los límites máximos permisibles de compuestos fenólicos en las descargas de aguas residuales a cuerpos receptores como: ríos, cuencas, cauces, vasos, aguas marinas y demás depósitos o corrientes de agua y los derrames de aguas residuales en los suelos (tabla I.1).

Tabla I.1 Límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residual a cuerpos receptores provenientes de las industrias que utilizan fenoles.

Industrias	NOM	Fenoles (mg/l)		DQO (mg/l)		SST (mg/l)		pH
		Promedio Diario	Promedio Instantáneo	Promedio Diario	Promedio Instantáneo	Promedio Diario	Promedio Instantáneo	Promedio
Producción de azúcar de caña	002	0.5	0.75	-----	-----	-----	-----	6 - 9
Refinación de petróleo y petroquímica	003	0.5	0.75	100	120	70	85	6 - 9
Fabricación de productos plásticos y polímeros sintéticos	005	0.5	0.75	200	240	70	84	6 - 9
Hierro y del acero	013	0.5	0.75	-----	-----	50	60	6 - 9
Textil	014	0.1	0.2	200	240	100	120	6 - 9
Impregnación de productos de aserradero	019	0.1	0.2	180	240	120	150	6 - 9
Agroindustria	031	5	10	-----	-----	-----	-----	6 - 9

SEDESOL (1994).

Cada vez es más frecuente la aplicación de los procesos de tratamiento biológico para la descontaminación de los efluentes industriales. Sin embargo, poco se sabe de las comunidades microbianas mixtas naturales que actúan sobre los compuestos sintéticos a concentraciones ambientalmente importantes.

La dinámica de poblaciones microbianas se define como una rama de la ciencia y tecnología del agua que describe las interacciones entre los microorganismos de un consorcio microbiano complejo (Wanner, 1994). La importancia del estudio de los lodos activados es la presencia o ausencia de pequeñas poblaciones mixtas capaces de degradar muchos de los compuestos orgánicos presentes en los efluentes industriales y que en condiciones apropiadas incrementan su número lo que se refleja en la degradación del sustrato orgánico.

Durante el periodo de aclimatación a diferentes compuestos tóxicos los microorganismos experimentan cambios fisiológicos, morfológicos y/o genéticos, de tal forma que solo los más aptos se desarrollan bajo las nuevas condiciones del medio. La duración del periodo de aclimatación es muy variable y puede durar desde una hora hasta muchos meses. La aclimatación se define como el intervalo de tiempo a partir de la introducción del compuesto orgánico en determinado ambiente, hasta cuando se hace evidente la remoción del compuesto (Buitrón, 1993).

Entre los estudios orientados a describir la dinámica de poblaciones del proceso de lodos activados se encuentran los de Curds (1975), Madoni *et al.* (1979), Kinner y Curds (1987), Duchene y Cotteux (1993), en los cuales se describe la técnica de observaciones microscópicas de la microfauna del proceso de lodos activados. La técnica consiste en utilizar como indicadores biológicos a las poblaciones de protozoarios, las cuales responden a variaciones de operación de las plantas de tratamiento de aguas.

Reddy *et al.* (1993) analizaron la variación de la dinámica de poblaciones del proceso de lodos activados en una planta de tratamiento de aguas residuales durante tres años. Observaron que la concentración de sólidos suspendidos variaba en las diferentes estaciones del año (en primavera, 900 mg/l y en invierno, 1700 mg/l). Los microorganismos detectados a lo largo del estudio fueron: rotíferos, ciliados libres nadadores, flagelados y nemátodos.

Para la estimación de bacterias aerobias viables presentes en las aguas se usa el método de la cuenta heterótrofa en placa (CHP) descrito por APHA (1992). Kavanaugh y Randall (1993), describen las poblaciones de bacterias de una planta de tratamiento de aguas del proceso de lodos activados. Con el método de la CHP y la técnica de los ácidos grasos volátiles (AGV), obtuvieron grupos dominantes de coliformes del complejo *Aeromonas/Vibrio* y de *Pseudomonas* sp. El aislamiento de cultivos puros de bacterias Gram negativas condujo a la identificación de *Acinetobacter* sp. la cual fue la bacteria representativa de la zona aerobia y la responsable de la remoción de fósforo del sistema.

Silverstein *et al.* (1994) utilizaron el método de la CHP para la enumeración de bacterias responsables de la degradación del 2,4-dinitrofenol (DNF) en cultivos de procesos de lodos activados. Estos autores confirmaron que al reciclar la biomasa en el proceso de lodos activados se incrementa el número de *Rhodococcus* sp. responsable de la degradación del DNF. Al adicionar una fuente suplementaria de carbono en forma de glucosa al DNF, hubo un incremento del 10 % en la biomasa de *Rhodococcus* sp.

Hay varios métodos para la identificación de bacterias que se utilizan según los objetivos y la precisión que se traten de alcanzar. Entre los más generales y de fácil manejo se encuentran los sistemas API (Analytical Profile Index), que constan de una serie de cúpulas de plástico en forma de galerías conteniendo diferentes pruebas bioquímicas. Otros métodos de identificación están basados en el mismo principio del sistema API, como son los Enterotubos (Roche), Rapid ID y Oxi-Term (Roche). El sistema API 20E se ha utilizado en numerosos estudios para la identificación de cepas puras de bacterias (Smith *et al.* 1972; Robertson *et al.* 1976; Holmes *et al.* 1978). Kavanaugh y Randall (1993), utilizaron el sistema API 20E, para identificar el crecimiento de cepas puras por ejemplo: *Pseudomonas* sp., *Achromobacter* sp., *Moraxella* sp., *Acinetobacter* sp. y *Aeromonas/Vibrio* entre otras.

Existen también métodos avanzados en biología molecular para la identificación y el análisis de los genes de bacterias. El método de la reacción de **PCR** (Polymerase Chain Reaction) se basa en la capacidad de ampliar secuencias específicas de ADN. El ADN de doble cadena se separa completamente formando dos cadenas simples que sirven como moldes para los primers. Las dos cadenas obtenidas (una original y una recién sintetizada) sirven como molde para el nuevo ciclo de la reacción que consiste en la separación de las cadenas, alineación de los primers y síntesis de ADN. El resultado de la reacción de **PCR** es un número de varios ciclos donde se alcanza un máximo teórico de moléculas replicadas de ADN de doble cadena que se encontraban entre dos primers. Todas las formas de ADN o ARN pueden ser sustratos para la **PCR**. Eso incluye el ADN genómico (de procariontes y eucariontes), los plásmidos y el ADN de fagos. Para el ADN genómico de bacterias se utilizan cantidades desde pico gramos hasta nanogramos del ADN. Aunque la **PCR** es una técnica relativamente nueva, ya ha sido aplicada en muchas áreas como en la investigación básica en la genética y evolución molecular, medicina y medio ambiente, es muy importante saber cual es el objetivo del uso de la **PCR**, ya que desafortunadamente las condiciones óptimas para lograr una mayor especificidad son incompatibles con la eficiencia de amplificación. Por esta razón, cuando uno decide emplear la **PCR** debe saber a cual de estos tres parámetros (especificidad, eficiencia y fidelidad) dará la prioridad.

Blackhall (1993) utilizó el método de la **PCR** para la identificación y ampliación del gen 16S rARN, comparándolo con la base de datos del banco de genes de la Universidad de Queensland (Department of Microbiology Culture Collection) para las especies de bacterias del género *Nocardia*. Se encontró las secuencias específicas de los genes para las diferentes especies de *Nocardia* contribuyendo así al conocimiento de la taxonomía y filogenia de esta especie.

Hipótesis

Una población bacteriana inicial, al verse sometida al proceso de aclimatación, variará en cuanto al tipo de microorganismo de tal modo únicamente los microorganismos capaces de degradar los tóxicos permanecerán.

II METODOLOGÍA

El estudio se dividió en dos partes. En la primera parte se realizaron pruebas con diferentes medios de cultivo y diferentes concentraciones de la mezcla de fenoles (0.05, 0.1 y 2 mg/l) con la finalidad de seleccionar un medio de cultivo adecuado para el crecimiento y desarrollo de las unidades formadoras de colonias (UFC) para bacterias aclimatadas a compuestos fenólicos. También se realizó el seguimiento de la dinámica de poblaciones del proceso de lodos activados en el periodo de aclimatación a 40 mg/l de la mezcla de fenoles. El inóculo se obtuvo de la planta de tratamiento de aguas residuales de Ciudad Universitaria. En la segunda parte se llevó a cabo un estudio cinético. Se comenzó el periodo de la aclimatación a una concentración total de 40 mg/l de la mezcla de fenoles, con un inóculo de la planta de tratamiento de aguas residuales de Ecatepec, Estado de México. El reactor estuvo funcionando con ciclos de 2 días durante 120 días de operación. Al término de estos 120 días se realizó el estudio de las cinéticas de degradación para los lodos activados aclimatados y para cada una de las cepas puras aisladas e identificadas.

II.1 Medios de cultivo empleados

El protocolo de investigación que se estableció para poder determinar las mejores condiciones bajo las cuales las bacterias aclimatadas a compuestos fenólicos pueden ser cuantificadas, fue el de probar los medios de cultivos CGY, R2A y peptona de caseína recomendados por APHA (1992). Otro medio de cultivo probado fue el agar bacteriológico adicionado con agua del sedimentador de la planta de tratamiento de Ciudad Universitaria. El medio de cultivo del agar nutritivo fue utilizado como medio general para la cuantificación de bacterias. A todos los medios de cultivos antes mencionados se les adicionó tres diferentes concentraciones de la mezcla de fenoles (0.5, 0.1 y 2 mg/l). Se realizó la CHP con todos los medios de cultivo adicionando las diferentes concentraciones de fenoles. La selección del medio de cultivo se realizó con el medio que presentó la CHP más alta. Se observaron las características morfológicas de las cepas puras. Se describen a continuación los medios de cultivos que se utilizaron para el crecimiento y desarrollo de UFC de bacterias aclimatadas a compuestos fenólicos así como la técnica para prepararlos:

II.1.1 Agar bacteriológico

Para prepararlo se suspendieron 15 g de agar bacteriológico en 1000 ml de agua filtrada del sedimentador de una planta de tratamiento de agua. Se mezcló muy bien y se calentó a ebullición por 2 minutos. Las características de este medio de cultivo se señalan en la tabla II.1.1.1. Se homogeneizó y esterilizó a 121 °C durante 15 minutos. Finalmente, el preparado se vació en cajas de petri.

Tabla II.1.1.1 Características físicas del agar bacteriológico.

Parámetro	Valor
Punto de gelificación	32-39 °C
Punto de fusión	80-88 °C
Pérdida en el secado	6-12 %
Residuo de ignición	3.5-6.5%
Fuerza de gel	500-675 g /cm ²

II.1.2 Agar nutritivo

Para prepararlo se suspendieron 23 g del polvo de agar nutritivo en 1000 ml de agua destilada. Se mezcló muy bien y se calentó a ebullición por 2 minutos. Cuyo contenido se muestra en la tabla II.1.2.1. Se homogeneizó y esterilizó a 121 °C durante 15 minutos. Finalmente, el preparado se vació en cajas de petri.

Tabla II.1.2.1 Contenido del agar nutritivo.

Compuesto	Cantidad
Peptona de gelatina	5 g
Extracto de carne de res	3 g
Agar	15 g
pH final	6.8 ± 0.2

II.1.3 Peptona de caseína

Para prepararlo se suspendieron 3.5 g de peptona de caseína, 0.2 g de fosfato de potasio, 0.05 g de sulfato de magnesio, 0.001 g de cloruro férrico y 15 g de agar bacteriológico con un pH final de 7.2, en 1000 ml de agua destilada. El contenido y las características se muestran en las tablas II.1.3.1 y II.1.3.2. Se mezcló muy bien y se calentó a ebullición por 2 minutos. Se homogeneizó y esterilizó a 121 °C durante 15 minutos. Finalmente, el preparado se vació en cajas de petri.

Tabla II.1.3.1 Contenido del medio de cultivo peptona de caseína.

Compuesto	Cantidad (g)
Peptona de caseína	3.5
Fosfato de potasio (K_2HPO_4)	0.2
Sulfato de Magnesio ($MgSO_4$)	0.03
Cloruro Férrico ($FeCl_3$)	0.001
Agar bacteriológico	15

Tabla II.1.3.2 Características del medio de cultivo peptona de caseína.

Elemento	Proporción
Nitrógeno total	10 % ó más
Nitrógeno amínico	4.5 % ó más
Residuo de ignición	15 % ó menos
Azúcares reductores	Negativo
Proteína coagulable	Negativo
Solubilidad a 30 °C	250 g / 1000 cc
Pérdida en el secado	7 % ó menos

II.1.4 Agar CGY

Para prepararlo se suspendieron 5.0 g de casitona (Difco), 5.0 g de glicerol, 1.0 g de extracto de levadura y 13 g de agar bacteriológico con un pH final de 7.2, en 1000 ml de agua destilada. Se mezcló muy bien y se calentó a ebullición por 2 minutos. El contenido se muestra en la tabla II.1.4.1. Se homogeneizó y esterilizó a 121 °C durante 15 minutos. Finalmente, el preparado se vació en cajas de petri.

Tabla II.1.4.1 Contenido del medio de cultivo CGY.

Compuesto	Cantidad (g)
Casitona Difco	5
Glicerol	5
Extracto de levadura	1
Agar	13

II.1.5 Agar R2A

Para prepararlo se suspendieron 18.2 g de agar R2A en 1000 ml de agua destilada. Se mezcló muy bien y se calentó a ebullición por 2 minutos. Las características se muestra en la tabla II.1.5.1. Se homogeneizó y esterilizó a 121 °C durante 15 minutos. Finalmente, el preparado se vació en cajas de petri.

Tabla II.1.5.1 Características del agar R2A.

Elemento	Cantidad
Extracto de levadura	0.5 g
Peptona	0.5 g
Ácido casamino	0.5 g
Dextrosa	0.5 g
Almidón soluble	0.5 g
Piruvato de sodio	0.3 g
Fosfato de potasio dibásico	0.3 g
Sulfato de magnesio	0.05 g
Agar	15 g
pH final	7.2 ± 0.2

II.1.6 Medio de cultivo Lowenstein modificado por Jensen

Para el aislamiento de micobacterias se utilizó el medio de cultivo de Lowenstein modificado por Jensen (Difco) cuyo contenido se presenta en la tabla II.1.6.1. Se empleó el método propuesto por Engbaek *et al.* (1967) al 3 % de Lauril Sulfato de Sodio (LSS) y 1 % de hidróxido de sodio (NaOH). Este método sirve para el desarrollo de micobacterias tratando de eliminar las bacterias y hongos con requerimientos similares que puedan crecer en éste medio de cultivo.

Tabla II.1.6.1 Contenido del medio de cultivo Lowenstein modificado por Jensen para aislamiento de micobacterias.

Elemento	Cantidad
Asparagina	3.6 g
Fosfato monopotásico	2.4 g
Sulfato de magnesio	0.24 g
Citrato de magnesio	0.6 g
Harina de papa	30 g
Verde de Malaquita	0.4 g
Glicerol	12 ml
Agua destilada	588 ml
Huevo homogeneizado	1000 ml

II.1.7 Procedimiento de siembra de micobacterias con medio Lowenstein.

Exclusivamente para el aislamiento de micobacterias se usó el método descrito por Kamala *et al.* (1994) que consistió en: (a) Homogeneizar el reactor. (b) Tomar 5 ml de muestra del reactor y mezclar con 5 ml del detergente previamente esterilizado (LSS al 3 % con NaOH 1 %), centrifugar 3 minutos a 1000 r.p.m. El detergente LSS actúa para la eliminación de microorganismos como bacterias y hongos asociados con los bacilos del género *Mycobacterium* sp., de las muestras de agua. El detergente LSS conserva la viabilidad de las micobacterias. (c) Trabajar en condiciones estériles. (d) Flamear los bordes de los tubos, al abrirlos y antes de cerrarlos. (e) Tomar 1 ml del sobrenadante de la centrifugación y con puntas estériles depositarlo en los tubos del medio Lowenstein y (f) Incubar los tubos ya sembrados, a una temperatura de 35 a 37 °C, durante 3 semanas.

II.2 Selección del medio de cultivo adecuado

Se realizó la selección del medio de cultivo más adecuado observando la CHP. Con la finalidad de escoger el medio de cultivo que presentara una mayor cuenta de colonias y las mejores condiciones de desarrollo, se efectuaron por triplicado para cada uno de los medios de cultivos y para cada dilución empleada (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5}), para las cuales se usó agua tamponada. Para preparar una solución tampón de fosfato (*Agua tamponada*) se disolvió 34.0 g de fosfato dihidrógeno de potasio (KH_2PO_4) en 500 ml de agua destilada, se ajustó el pH a 7.2 +/- 0.5 con hidróxido de sodio (NaOH) al 1 N y se aforó hasta 1 litro en agua destilada. Se añadió 1.25 ml de solución madre de tampón de fosfato y 5.0 ml de solución de cloruro de magnesio (81.1 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ / en un litro de agua destilada). Finalmente, se repartió en alícuotas que proporcionen 9 ml (+/- 0.2 ml) después de pasarlas 15 min por el autoclave.

II.2.1 Pruebas de diferentes concentraciones del compuesto tóxico en el medio de cultivo

Se probaron tres diferentes concentraciones de una mezcla a partes iguales de compuestos fenólicos (fenol, 4-CF, 2,4-DCF y 2,4,6-TCF): las cuales fueron 0.05, 0.1 y 2 mg/l. Las concentraciones estudiadas se escogieron con base en la toxicidad para cada uno de los fenoles utilizados. Los fenoles se agregaron en diferentes matraces, después de retirar los medio de cultivo del autoclave, a partir de una solución madre concentrada. La tabla II.2.1.1 muestra datos de toxicidad para cada compuesto orgánico utilizado.

Tabla II.2.1.1 Propiedades de los compuestos fenólicos.

Compuesto	Fórmula	Peso molecular	Toxicidad EC ₅₀ mg/l ¹	Tasas de Degradación Ambiental ²
Fenol	C ₆ H ₅ OH	94.11	520 - 800 ^{3,4}	Alta 3.5 días Baja 0.25 días
4-Clorofenol	ClC ₆ H ₄ OH	128.50	42 - 150 ^{4,5}	Alta 6.2 días
2,4-Diclorofenol	Cl ₂ C ₆ H ₃ OH	163.01	44 - 50 ^{4,5}	Alta 8.3 días Baja 2.78 días
2,4,6-Triclorofenol	Cl ₃ C ₆ H ₂ OH	197.50	191 ⁶	Alta 70 días Baja 7 días

¹EC₅₀ : Concentración de sustancia que produce 50 % de la reducción de la tasa de consumo de O₂.

²Tasas de Degradación Ambiental: Tasas de vida media en agua superficial para organismos no aclimatados.

³Gaudy *et al.* (1988).

⁴Klecka y Maier (1988).

⁵Beltrame *et al.* (1988).

⁶Howard *et al.* (1991).

II.2.2 Preparación de las diluciones para la cuenta heterótrofa en placa

En el periodo de aclimatación, se homogenizó el reactor y se tomaron 2 ml que se depositaron en un macerador de tejidos para asegurar la separación total del flóculo. Del macerador se tomó 1 ml el cual fue puesto en el tubo de la dilución 10^{-1} así sucesivamente hasta la dilución 10^{-5} . Se vertieron 0.2 ml de la dilución escogida en cada caja petri con el medio de cultivo. La dilución se seleccionó de forma que el número de colonias en la caja petri fuera de 30 a 300. La cuenta de las colonias de bacterias que se desarrollaron sobre el agar seleccionado, se realizó después de 2 días de ser incubadas a una temperatura de 35 °C.

II.3 Aislamiento de cepas puras de bacterias para la degradación de compuestos fenólicos

El aislamiento se realizó transfiriendo a los microorganismos con una asa de siembra y estriando en un medio de cultivo sólido para obtener una cepa pura. Durante el periodo de aclimatación se realizaron diferentes tipos de estriado para observar el patrón de desarrollo resultante de las cepas puras obtenidas. Se describieron las características morfológicas de las colonias sobre la placa de agar (forma, bordes, elevación, textura y color de las colonias), y las características microscópicas (morfología y tipo de agrupación), para cada cepa pura aislada.

II.4 Identificación de cepas puras de bacterias aerobias

Para la identificación de cepas puras de bacterias se utilizó la técnica de tinción de Gram y observaciones al microscopio óptico. Como no se encontraron bacterias Gram positivas se utilizó el sistema API 20E, que sirve para identificar Enterobacterias y otros bacilos Gram negativos, descrita por API (1990).

II.4.1 Técnica de tinción de Gram

A las bacterias aisladas se les practicó la tinción de Gram. Esta tinción consiste en aplicar 4 reactivos: el cristal violeta o colorante primario, éste imparte color a todos los microorganismos del frote; el segundo reactivo es una solución denominada iodo de Gram o lugol, ésta actúa como mordente (aumenta o refuerza la unión entre el colorante y el sustrato, formando un complejo cristal violeta-iodo-ribonucleato de magnesio); el tercer reactivo es el alcohol-acetona, que actúa como decolorante disolviendo y arrastrando fuera de las células al colorante primario.

Las bacterias Gram positivas, cuya pared celular es relativamente gruesa (25 a 30 nm), con un mayor contenido de peptidoglucano (20 a 80 %) y con numerosos enlaces transversales entre las cadenas de N-acetil-murámico y N-acetil-glucosamina, no pierden el complejo cristal violeta-iodo al ser tratadas con alcohol-acetona. En este grupo bacteriano, el colorante deshidrata y reduce la permeabilidad de la pared; en tanto que, las bacterias Gram negativas, cuya pared celular es más delgada (10 a 15 nm) y contienen poco peptidoglucano (5 a 10 %) con pocos enlaces transversales, el alcohol-acetona disuelve los abundantes lípidos (20 a 30 %) de la pared, abriendo los poros y facilitando la salida del complejo cristal violeta-iodo y la decoloración de este tipo de bacterias, por lo que se tornan invisibles, y reaccionan con la safranina que es el cuarto reactivo también llamado colorante de contraste. Las bacterias que retienen el colorante primario a lo largo de todo el proceso y no reaccionan con el colorante de contraste son llamadas Gram positivas, éstas se tiñen de morado; el segundo grupo de bacterias pierden el colorante primario, reaccionan con el colorante de contraste y se denominan Gram negativas, éstas se tiñen de rojo. La técnica completa la describen Ramírez-Gama *et al.* (1995).

II.4.2 Sistema de identificación API 20E

El sistema de identificación API 20E, es un sistema estandarizado, en versión miniatura de los procesos convencionales para la identificación de enterobacterias y otras bacterias Gram negativas. Está compuesto de 23 pruebas bioquímicas que se aplican sobre cepas puras de bacterias, que se señalan en la tabla II.4.2.1. El sistema consiste en una tira de plástico con galerías o microtubos que contienen sustancias deshidratadas. Estas sustancias son reconstituidas al adicionar la suspensión celular. Los resultados de las pruebas se leen a las 24 o 48 h después de incubar las galerías a 35 °C. Las pruebas se clasifican como positivas o negativas de acuerdo con los resultados obtenidos. La lectura de las reacciones se hace de acuerdo con la tabla de lectura y la identificación mediante el índice API 20E. El índice de perfiles analíticos API 20E (1994) es una base de datos que comprende las características de 78 especies de Enterobacterias y 47 grupos de otras bacterias Gram negativas. De acuerdo a las 21 pruebas bioquímicas se agrupan en 7 grupos según muestra la tabla II.4.2.2. Sólo las valoraciones positivas se toman en cuenta. A cada resultado se le asigna un valor numérico, dependiendo de la posición del grupo al que corresponden. Un código de 7 dígitos se construye al sumar los valores encontrados para cada grupo de pruebas, que posteriormente se busca en el índice analítico API 20E, se localiza el género de la bacteria identificada. El principio numérico de la identificación se basa en los cálculos observados para el perfil de las frecuencias de ocurrencia observadas (reacciones positivas: $F_i = P_i (1 - \alpha_i) + (\alpha_i \times P_i)$ y reacciones negativas: $F_i = P_i (1 - \alpha_i) + (\alpha_i \times P_i)$). Los taxones se clasifican por los valores decrecientes de el porcentaje de identificación:

Excelente identificación	% ide \geq 99.9 y T \geq 0.75
Muy buena identificación	% ide \geq 99.0 y T \geq 0.5
Buena identificación	% ide \geq 90.0 y T \geq 0.25
Aceptable identificación	% ide \geq 80.0 y T \geq 0

Tabla II.4.2.1 Pruebas bioquímicas estandarizadas del sistema API 20E.

Símbolo	Prueba
ADH	Arginina dihidrolasa
AMY	Amigdalina
ARA	Arabinosa
CIT	Utilización de citratos
GEL	Hidrólisis de la gelatina
GLU	Fermentación de glucosa
H ₂ S	Producción de sulfuro de Hidrógeno
IND	Producción de indol
INO	Inositol
LDC	Lisina de carboxilasa
MAN	Fermentación de manitol
MEL	Melobiosa
NO ₂	Reducción de nitratos a nitrógeno (N ₂)
NO ₃	Reducción de nitratos a nitritos (NO ₂)
ODC	Ornitina decarboxilasa
ONPG	O-nitrofenil beta-galactosidasa
OX	Citocromo oxidasa
RHA	Ramnosa
SAC	Sacarosa
SOR	Sorbitol
TDA	Triptofano de aminasa
URE	Hidrólisis de la urea
VP	Prueba de Voges-Proskauer

Tabla II.4.2.2 Clasificación para las pruebas del API 20E de acuerdo a los grupos y el valor de cada una.

1	2	3	4	5	6	7	Valor de la prueba
ONPG	ODC	URE	VP	MAN	RHA	AMY	1
ADH	CIT	TDA	GEL	INO	SAC	ARA	2
LDC	H ₂ S	IND	GLU	SOR	MEL	OX	4

II.5 Descripción y operación del reactor piloto utilizado

Para el estudio se utilizó un reactor piloto de vidrio con un volumen total de dos litros, aireado en el fondo y con biomasa en suspensión. El reactor estuvo funcionando en un modo discontinuo secuencial (SBR), es decir como un proceso periódico orientado para funcionar en el tiempo (alimentación, reacción, decantación, tiempo muerto y descarga) bajo condiciones controladas (fig. II.5.1). Se estudiaron dos inóculos: el primer inóculo fue de la planta de tratamiento de aguas residuales de Ciudad Universitaria y el segundo fue de la planta de tratamiento de aguas de Ecatepec, Estado de México. Los inóculos estuvieron constituidos por microorganismos provenientes de los tanque de aireación del proceso de lodos activados de ambas plantas de tratamiento de aguas residuales. La alimentación del reactor consistió en una mezcla, a proporciones iguales de: fenol, 4-clorofenol, 2,4-diclorofenol y 2,4,6-triclorofenol a una concentración de 40 mg de fenoles totales/l, adicionado además con nutrientes (tabla II.5.1) y 650 mg/l de SSV como biomasa inicial, aforado con agua hasta un volumen total de 2 litros. Durante la reacción la aireación fue continua; las etapas de decantación y de tiempo muerto, fueron sin aireación y de 30 min cada una. La descarga fue de 1.5 litros del volumen total del reactor dejando 500 ml de lodos activados decantados para el próximo ciclo, esta etapa se efectuó manualmente.

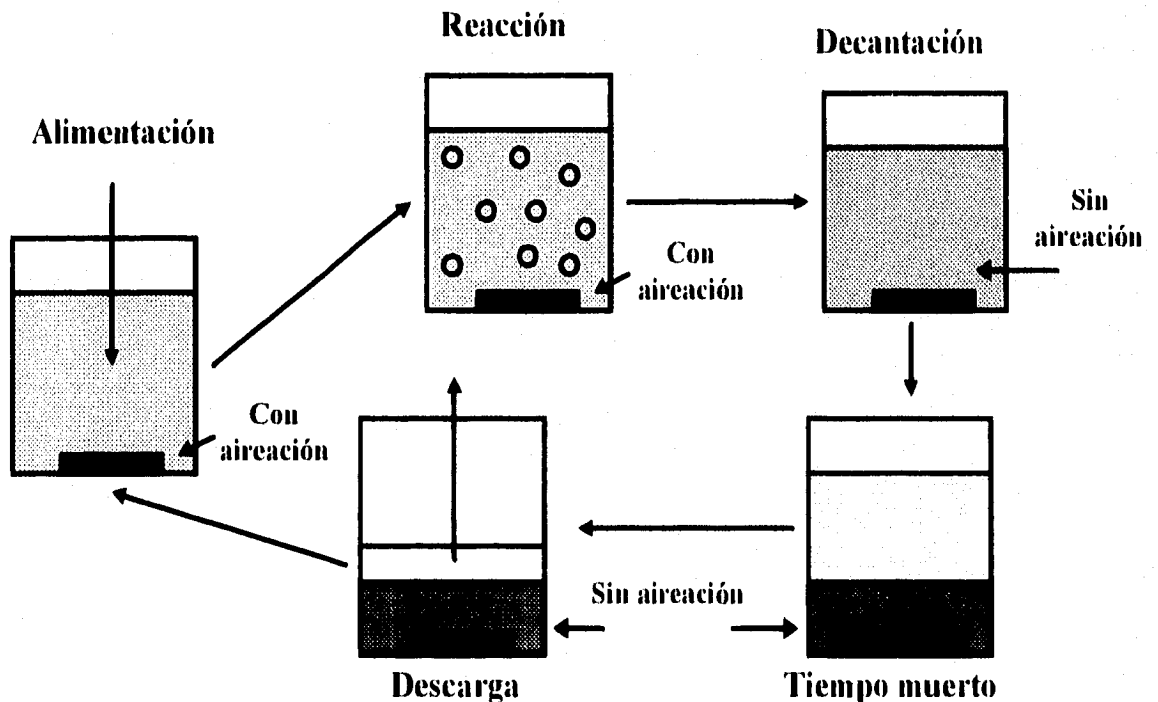


Figura II.5.1 Etapas del funcionamiento del reactor discontinuo secuencial (SBR).

El sistema SBR se eligió por presentar ventajas en el establecimiento de un consorcio de microorganismos estables y flexibilidad de operación. Este tipo de reactores se emplean para el tratamiento biológico de aguas residuales industriales (Irvine y Ketchum, 1989; Wanner, 1992).

Tabla II.5.1 Soluciones de nutrimentos utilizados dentro del reactor durante la aclimatación.

Compuesto	Concentración (mg/l)
Acido bórico	0.057
Cloruro de amonio	2.5
Cloruro férrico hexahidratado	0.044
EDTA (FeCl 6H ₂ O)	0.055
Fosfato de potasio dibásico	10.875
Fosfato de potasio monobásico	8.5
Fosfato de sodio dibásico	25.152
Heptamolibdato de amonio	0.034
Sulfato de calcio dihidratado	36.4
Sulfato de magnesio heptahidratado	22.5
Sulfato de zinc heptahidratado	0.043
Sulfato férrico hexahidratado	0.25
Sulfato manganeso monohidratado	0.030

II.6 Aclimatación de microorganismos a compuestos fenólicos

El periodo de aclimatación se define como el intervalo de tiempo a partir de la introducción del compuesto orgánico en determinado ambiente, hasta cuando se hace evidente la remoción del compuesto (Buitrón, 1993). El periodo de aclimatación duró 63 d (15 ciclos) a 40 mg/l de la mezcla de compuestos fenólicos. Durante el periodo de aclimatación se realizaron las técnicas para análisis de aguas (tabla II.9.1) descritas por APHA (1992). Así mismo, se describió la dinámica de poblaciones de los lodos activados (bacterias, protozoarios, rotíferos, hongos, nemátodos y algas) a lo largo de esta etapa de aclimatación, para poder establecer qué tipos de microorganismos son los que se aclimatan y biodegradan los compuestos fenólicos.

II.7 Dinámica de poblaciones del proceso de lodos activados

El seguimiento de la dinámica de poblaciones bacteriana se realizó mediante la técnica de la cuenta heterótrofa en placa, aislando e identificando las poblaciones de bacterias en un inicio y cada 2 d durante todo el periodo que duró la aclimatación. La dinámica de poblaciones de protozoarios se siguió mediante observaciones directas en un microscopio óptico (*Ernst Leitz Wetzlar GmbH*) a diferentes aumentos (10x, 25x, 40x y 100x). La identificación de los géneros de protozoarios se realizó mediante la guía de Lee *et al.* (1985) y la descripción de lodos activados de Vedry (1977). Las poblaciones de hongos, algas, protozoarios, rotíferos y nemátodos se registraron cualitativamente (presencia o ausencia) a lo largo del periodo de aclimatación.

II.8 Cinéticas de degradación de compuestos fenólicos

Las cinéticas de degradación se realizaron a partir del inóculo de la planta de tratamiento de aguas residuales de Ecatepec, Estado de México. Después de 120 d de operación del reactor, los estudios de las cinéticas se efectuaron con el consorcio de los lodos activados aclimatados (LAA) y con cepas puras de bacterias a partir de aislamientos del consorcio de los LAA. Con las cepas puras se procedió a incrementar la biomasa en matraces de 250 ml con un medio nutritivo líquido de peptona de caseína (sin agar), adicionado con 10 mg/l de la mezcla de los compuestos fenólicos más los nutrientes utilizados en el periodo de aclimatación. La incubación duró 7 d a una temperatura de 30 °C, con agitación constante de 230 rpm. Una vez obtenida una adecuada cantidad de biomasa necesaria (70 mg SSV/l) para cada cepa pura, éstas se centrifugaron 3 veces y se lavaron con agua tamponada esterilizada durante 3 min a 4,000 rpm con la finalidad de eliminar el carbón orgánico sobrante del medio. La biomasa se colocó en matraces de 1000 ml, conteniendo 500 ml de agua destilada esterilizada, 40 mg/l de la mezcla de los compuestos fenólicos y nutrientes. Los matraces se sellaron para evitar la contaminación del medio. Se montó un sistema de purificación de aire que tenía una trampa de algodón para evitar el paso de impurezas, un matraz conteniendo una solución de hipoclorito de sodio (6 % Cl⁻ libre) para desinfectar el aire, un filtro de carbón activado para la adsorción de gases y un filtro de membrana de 0.2 µm. Este sistema repartía el aire por medio de mangueras de silicón, que atravesaban los tapones de hule conectados con un aireador en el fondo de cada matraz como se muestra en la figura II.8.1.

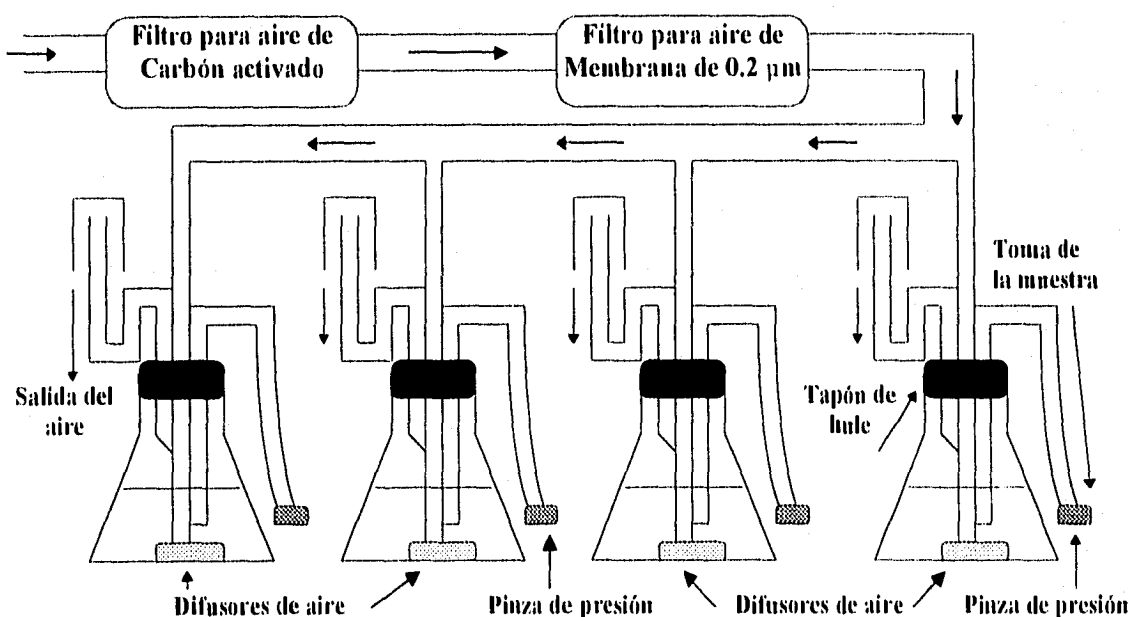


Figura II.8.1 Sistema empleado para las cinéticas de degradación de compuestos fenólicos.

Se determinaron los SST y la CHP al inicio y final de las cinéticas de degradación, con la finalidad de poder estimar la biomasa y comprobar la pureza de las cepas utilizadas. Para los lodos activados, la toma de muestras se realizó cada 15 min hasta eliminar el 85 % del carbón orgánico total, mientras que para las cinéticas de degradación de cepas puras el muestreo se realizó cada día, durante 9 d seguidos.

El tiempo se ajustó según el desarrollo de la cinética. Las muestras obtenidas se filtraron con un filtro de membrana de nitrato de celulosa de 0.45 μm (*Whatman*) y se refrigeraron posteriormente. Las técnicas analíticas que se aplicaron a las muestras obtenidas fueron COT, fenoles, cloruros y cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

II.9 Técnicas analíticas empleadas

Las técnicas analíticas empleadas en el presente trabajo se muestran en la tabla II.9.1.

Tabla II.9.1 Técnicas analíticas empleadas.



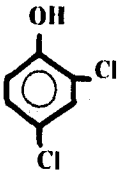
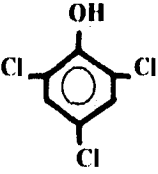
Prueba	Descripción	Principio	Referencia	Precisión	Límite de detección
Demanda Química de Oxígeno (DQO)	Cantidad de materia orgánica, sea o no biodegradable, susceptible a ser oxidada.	Oxidación de la materia orgánica con dicromato de potasio en un medio ácido, en presencia de un catalizador a alta temperatura.	APHA (1992)	A una DQO promedio de 193 mg O ₂ /l en ausencia de cloruro, la desviación estándar fue de ± 17 mg O ₂ /l.	DQO > 5 mg O ₂ / l
Carbón Orgánico Total (COT)	Es una expresión directa del contenido de carbón orgánico total del agua.	El método se basa en la combustión de la materia orgánica transformada a CO ₂ y transportado a un analizador de gas infra rojo.	Analizador de carbón orgánico total (TOC-5050 Shimadzu).	En muestras limpias o en muestras que han sido filtradas antes del análisis, la precisión se aproxima al ± 1 mg de carbón / l.	COT ≥ 1 mg / l
Sólidos Suspendedos Totales (SST)	Es toda la materia suspendida en el agua residual.	Se basa en las diferencias peso de la materia orgánica e inorgánica no soluble en el agua, después de ser evaporada el agua y volatilizada la materia orgánica.	APHA (1992)	En los estudios realizados por 3 laboratorios sobre 4 muestras y 10 replicas, la desviación estándar fue de 11 mg/l a 170 mg/l de sólidos totales volátiles.	Requiere de 10 a 200 mg de residuo seco.
Índice Volumétrico de Lodo (IVL)	Es la capacidad de sedimentación o compactación del lodo. Se define como el volumen que ocupa un gramo de lodo, después de sedimentar durante un cierto tiempo.	El volumen que ocupa el lodo después de sedimentarse por 30 minutos.	APHA (1992)	Depende de la medida de los sólidos en suspensión, las características de sedimentación de la suspensión y las variables asociadas a la medida del volumen de lodo sedimentado.	En función de la graduación de la probeta y la determinación de los SS
Cloruros	El cloruro en forma de ion (Cl ⁻) es uno de los iones inorgánicos principales en el agua natural y residual.	En el método argentométrico, una solución neutra, usando el cromato potásico como indicador, se titula con el nitrato de plata. Se precipita el cloruro de plata, antes de formarse el cromato de plata rojo.	APHA (1992)	Se analizó en 41 laboratorios por el método argentométrico una muestra sintética compuesta por 241 mg de Cl ⁻ / l y 42.5 mg/l de alcalinidad total en agua destilada, con una desviación estándar de 4,2 % y 1,7 % de error relativo.	De 0.15 a 10 mg de Cl ⁻
Fenoles	Método colorimétrico de la 4-aminoantipirina: cualquier color producido por la reacción se informa como fenol.	Los fenoles se condensan con la 4-aminoantipirina y prosigue una oxidación alcalina, para formar una antipirina coloreada y poder medir la absorbancia a 500 nm.	APHA (1992)	A concentraciones desde 0.02 hasta 6.4 mg/l, la desviación estándar promedio fue de ± 12 %	0 a 0.2 mg de fenol / l

Prueba	Descripción	Principio	Referencia ó Aparato de medición	Precisión	Límite de detección
Temperatura (° C)	Se basa en el estado de equilibrio termodinámico del sistema.		Termómetro Brannan de mercurio.	De 0.1 de la escala del termómetro Brannan	Intervalo de temperatura del termómetro -10 a 260 °C.
pH	Es una medida de la actividad de los iones hidrógeno.	Se usa para indicar la acidez o la basicidad de soluciones acuosas, y es el resultado de las propiedades de disociación de los solutos.	Electrodo pH meter CG 837 Schott Gerate	Escala de 1 a 14 unidades de pH	0.1 unidades de la escala 1 a 14 de pH
Cuenta Heterótrofa en Placa (CHP)	Método utilizado para estimar el número de colonias de bacterias que se han desarrollado en cajas de petri conteniendo diferentes medios de cultivo (agar R2A, agar NWRI, entre otros).	Calcula el número de bacterias viables en un volumen conocido por medio de diluciones.	APHA (1992)	El personal del laboratorio que no pueda repetir sus propios CHP de la misma caja con un error inferior al 10 % en el rango de 30 a 300 UFC por caja, deberá repetir las cuentas.	Se requiere que el número de bacterias sea entre 30 a 300 UFC por caja.
Sistema de Identificación API (API 20E)	En la identificación de cepas puras de Enterobacterias y otros bacilos Gram negativos, mediante 23 pruebas bioquímicas estandarizadas y miniaturizadas.	Se basa en reacciones enzimáticas por el metabolismo de las bacterias, con base en el cambio de color que se interpreta visualmente.	API (1990)	El sistema tiene una selección de identificación: Excelente con % id ≥ 99.9 y T ≥ 0.75, Muy buena % id ≥ 99 y T ≥ 0.5, Buena % id ≥ 90 y T ≥ 0.25 y Aceptable % id ≥ 80 y T ≥ 0.	Identifica bacilos Gram negativos incluidos en la base de datos (Index Api 20 E).
Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)	En la cromatografía líquida es necesaria una fase móvil y una fase estacionaria (columna). Cuando se inyecta una muestra los compuestos presentes interactúan con la fase estacionaria y la fase móvil. Desplazándose a través de la columna a distintas velocidades lo que permite su separación.	La separación cromatográfica se va a realizar de acuerdo a la interacción de los compuestos presentes en la muestra con la fase móvil y la fase estacionaria. La detección se efectúa mediante un detector de UV que registra cada componente como un pico. Los picos pueden cuantificarse mediante un registrador.	Equipo HPLC marca Waters que incluye una bomba modelo 510, un inyector automático modelo 717 plus, un detector UV modelo A86 y un integrador Spectra Physics	La precisión depende de las diferencias de polaridad que existen entre los compuestos, la fase móvil y la fase estacionaria. La detección se efectúa mediante un detector de UV para ser fácilmente cuantificados por medio de un integrador.	Los límites de detección son de 0.1 a 0.8 ppm.

II.10 Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

La cromatografía de líquidos de alta resolución se llevó a cabo en una columna radial resolve C-18 de 5 μm , Marca Radial Pack. La fase móvil fue Acetato de amonio 0.03 M, la cual se mantuvo a una velocidad de flujo de 1.5 ml/min. El volumen de muestra fue de 20, 40 y 200 microlitros. El detector de la columna fue de UV Milipore; $\lambda = 285 \text{ nm}$; AUFS = 0.05. Con una atenuación de 64. En la Tabla II.10.1 se muestran los valores del tiempo de retención (t_R) para cada uno de los clorofenoles utilizados en el HPLC.

Tabla II.10.1 Valores de t_R para los clorofenoles utilizados.

Pureza Estimada (%)	Nombre	Formula química	t_R (min)
97.29	FENOL		2.86
99	4-CLOROFENOL		6.18
100	2,4-DICLOROFENOL		12.67
98	2,4,6-TRICLOROFENOL		23

III RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.1 Medios de cultivos empleados para bacterias aclimatadas a compuestos fenólicos

A continuación se muestran los resultados obtenidos con los diferentes medios de cultivo estudiados con el fin de establecer cual presentaba las mejores condiciones de desarrollo de las UFC. A cada uno de los medios de cultivo se les adicionó 0.05, 0.1 y 2 mg/l, de una mezcla, a partes iguales, del compuesto orgánico tóxico (fenol, 4-CF, 2,4-DCF y 2,4,6-TCF). Estas concentraciones se escogieron para tratar de mantener baja la relación sustrato inicial/biomasa inicial (S_0/X_0) y evitar un efecto inhibitorio a las UFC ya aclimatadas y al mismo tiempo satisfacer los requerimientos metabólicos de las bacterias aclimatadas. La tabla III.1.1 muestra la cuenta heterótrofa en placa $N=3$ realizado a los 2, 4 y 7 d después de la incubación a una temperatura de 30 °C.

Tabla III.1.1 Número de UFC/ml (10^5) y medios de cultivos empleados adicionados con diferentes concentraciones de fenoles. Promedios \pm desviación estándar. Inóculo proveniente de la planta de tratamiento de aguas residuales de CU.

Medio de Cultivo	Sin fenoles	0.05 mg de fenoles/l	0.1 mg de fenoles/l	2 mg de fenoles/l
Agar nutritivo	7.3 \pm 0.8	8.4 \pm 0.5	11.7 \pm 0.5	10.2 \pm 0.4
Peptona de caseína	7.4 \pm 0.6	9.5 \pm 0.4	13.7 \pm 0.5	10.7 \pm 0.3
Agar CGY	6.1 \pm 0.5	8.3 \pm 0.9	12.5 \pm 0.7	10.2 \pm 0.4
Agar del sedimentador	1.8 \pm 0.9	5.7 \pm 0.4	6.7 \pm 0.3	5.6 \pm 0.5

Los resultados que se muestran en la tabla III.1.1 provienen de un inóculo aclimatado de la planta de tratamiento de CU. Los resultados se obtuvieron con la técnica de la CHP descrita por APHA (1992), con una dilución de 10^{-3} , después de 4 d de incubación a una temperatura de 30 °C. Se realizaron análisis estadísticos (pruebas de t de student) para comparar entre los dos medios de cultivo que presentaron la CHP más altas. Los resultados mostraron que no hay diferencias entre los medios de cultivo de peptona de caseína y el agar CGY para un $\alpha = 0.05$. Sin embargo, con un $\alpha = 0.1$ ($t_{exp} = 2.6$, $t_4^{95} = -2.13$ a 2.13) existen diferencias significativas entre los medios de cultivo que presentaron las mayores CHP.

El análisis estadístico para las dos concentraciones que presentó la CHP más alta (0.1 y 2 mg/l), mostraron que difieren significativamente a un $\alpha = 0.01$ ($t_{exp} = 7.2$, $t_4^{.995} = -4.60$ a 4.60). Así se concluye que la concentración de 0.1 mg/l de la mezcla de fenoles utilizada en los medios de cultivo, genera las mayores CHP para los diferentes medios de cultivo estudiados. En la tabla III.1.2 se muestran los resultados obtenidos a partir del inóculo aclimatado de la planta de tratamiento de aguas residuales de Ecatepec, Estado de México. Las condiciones de operación del reactor durante los 63 d que duró el periodo de aclimatación fueron de una temperatura de $13\text{ }^\circ\text{C}$ y un pH de 7 ± 1 .

Tabla III.1.2 Número de UFC/ml (10^4) y medios de cultivos, Promedio \pm desviación estándar. Inóculo proveniente de la planta de tratamiento de aguas residuales de Ecatepec.

Medio de cultivo	Sin fenoles	0.05 mg de fenoles/l	0.1 mg de fenoles/l	2 mg de fenoles/l
Agar nutritivo	8.6 ± 0.5	9.9 ± 0.7	13 ± 0.4	11 ± 0.4
Peptona de caseína	9.1 ± 0.4	10.4 ± 0.4	14 ± 0.3	12 ± 0.5
Agar CGY	8.4 ± 0.3	9.2 ± 0.4	12 ± 0.4	10.8 ± 0.4

Los resultados de la tabla anterior se obtuvieron después de 7 d de incubación, a una dilución de 10^{-2} , bajo una temperatura de $30\text{ }^\circ\text{C}$. Los medios de cultivos agar nutritivo y peptona de caseína presentaron las estimaciones más altas de UFC. La prueba de t de student mostró que existe una diferencia significativa para un $\alpha = 0.05$ ($t_{exp} = 2.8$, $t_4^{.975} = -2.78$ a 2.78) entre los medios de cultivos agar nutritivo y peptona de caseína adicionados con 0.1 mg/l de la mezcla de los fenoles. La concentración 0.1 mg/l de la mezcla de los compuestos fenólicos presentó diferencias significativas para un $\alpha = 0.01$ ($t_{exp} = 4.8$, $t_4^{.995} = -4.60$ a 4.60) con las otras dos concentraciones utilizadas. Se realizó la comparación de los medios de cultivo peptona de caseína y el agar R2A, recomendado por APHA (1992), para microorganismos estresados de altos requerimientos de nutrientes. En la tabla III.1.3 se muestran los resultados de los medios de cultivo que presentaron las mayores cuentas adicionados con 0.1 mg/l de la mezcla de fenoles y sin adicionar a los mismos medios de cultivo ninguna concentración de fenoles.

Tabla III.1.3 Número de UFC/ml (10^6) y comparación del medio de cultivo peptona de caseína con el Agar R2A, Promedio \pm desviación estándar. Inóculo proveniente de la planta de tratamiento de aguas residuales de CU.

Medio de Cultivo	Sin fenoles	0.1 mg de fenoles/l
Peptona de caseína	3.8 ± 0.3	4.2 ± 0.4
Agar R2A	3.6 ± 0.4	4.1 ± 0.5

Los resultados presentados en la tabla III.1.3, se obtuvieron con 6 d de incubación a una dilución de 10^{-4} , con una temperatura de 30 °C y una concentración de SSV= 168 mg/l. El análisis estadístico mostró que no hay diferencias entre los medios de cultivos y la concentración de 0.1 mg/l de fenoles utilizada.

Realizando una comparación entre las tablas III.1.1 y III.1.3, existe una diferencia en ordenes de magnitud entre los inóculos de la planta de tratamiento de aguas residuales de CU, esta diferencia se debe a que se realizó con una diferencia de tiempo (25 d) durante el periodo de aclimatación.

A pesar de que no hay diferencias significativas entre los medios de cultivo estudiados, se decidió seleccionar a la peptona de caseína como el medio de cultivo para la cuantificación y el aislamiento de bacterias aclimatadas a compuestos fenólicos. Las razones para seleccionar el medio de cultivo peptona de caseína adicionado con 0.1 mg/l de la mezcla de fenoles fueron que presentó la mayor cuenta en placa para bacterias aclimatadas a compuestos fenólicos y por el precio de la peptona de caseína en comparación con el del agar R2A o el CGY.

El medio de cultivo de peptona de caseína es un digerido pancreático que es empleado para el cultivo de bacterias incluyendo microorganismos de difícil crecimiento. La concentración de 0.1 mg/l de la mezcla de los fenoles que se utilizó en el medio de cultivo permite un desarrollo satisfactorio y favorece el metabolismo de las bacterias aclimatadas a fenoles. El medio de cultivo de peptona de caseína adicionado con 0.1 mg/l de la mezcla de fenoles, presentó la mayor diversidad y tamaño de las UFC.

III.1.2 Viabilidad durante la aclimatación

El medio de cultivo de peptona de caseína adicionado con 0.1 mg/l de la mezcla de fenoles, se utilizó para la CHP en el periodo de aclimatación y los aislamiento de cepas puras de bacterias aclimatadas a fenoles. La figura III.1.2.1 presenta la evolución de la cantidad de bacterias viables en función de los ciclos de aclimatación. Al analizar se encontró que el medio de cultivo de peptona de caseína a los 6 d presentaba el mayor número de 3.6×10^9 UFC/l. Tras la adición de la mezcla de compuestos fenólicos se presenta una fase de retardo, que representa el tiempo requerido para lograr la división y comenzar el crecimiento logarítmico, el cual se establece al sexto día con 610 mg de SSV/l. Posteriormente se presenta una fase de muerte logarítmica, durante esta fase, la tasa de muertes de las bacterias excede la producción de células nuevas. Se logra una estabilización de bacterias viables en los ciclos siguientes. Las bacterias viables desarrolladas durante el periodo de aclimatación muestran claramente la necesidad de una fuente de carbón adicional en el medio de cultivo. Los requerimientos nutritivos de un microorganismo están determinados por la composición química de la célula, por su constitución genética y por factores del medio. Considerando las necesidades nutricionales de los microorganismos desde un punto de vista meramente químico, cualquier sustrato o medio de cultivo que contenga los componentes constitutivos de las células proporcionará los requerimientos nutricionales para el desarrollo de los microorganismos; no obstante, estos varían ampliamente en sus características genéticas y consecuentemente en sus propiedades fisiológicas y su capacidad para utilizar y transformar a los diferentes compuestos químicos. También la temperatura, CO_2 y O_2 tienen importancia junto con el medio de cultivo para que la comunidad de bacterias aerobias se desarrollen óptimamente.

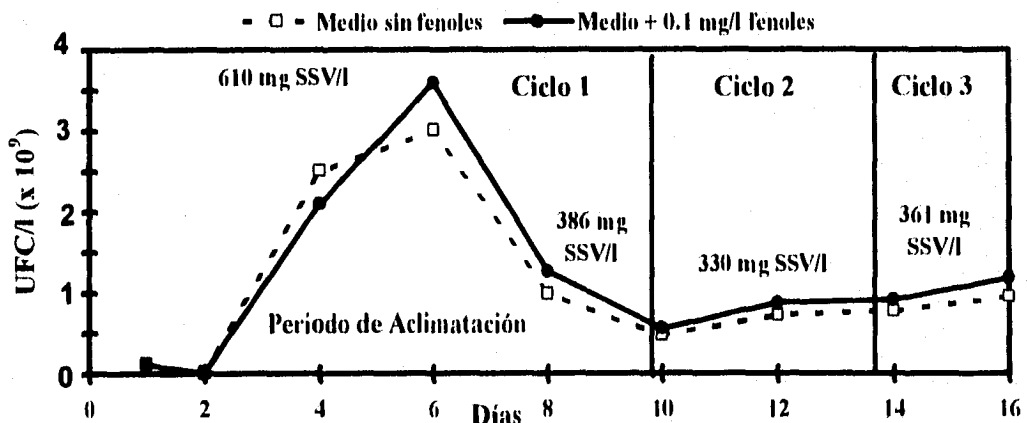


Figura III.1.2.1 Bacterias viables, medio de cultivo peptona de caseína, los datos son promedios ± 1 de $N=3$.

III.2 Análisis fisicoquímicos

La duración de cada ciclo del reactor fue determinada de acuerdo con el porcentaje de eliminación de los tóxicos; es decir, los ciclos se prolongaron hasta que los microorganismos degradaran el 75% de la concentración inicial de fenoles. En el periodo de aclimatación se realizaron los siguientes análisis: temperatura, pH, sólidos suspendidos totales, índice volumétrico de lodo, carbón orgánico total, determinación de cloruros, descritas por APHA (1992). A continuación se discuten cada uno de los parámetros.

III.2.1 Temperatura y pH

La temperatura que se mantuvo en el reactor fue de 13 ± 1 °C y el pH fue de 7 ± 1 durante todos los ciclos del periodo de aclimatación a compuestos fenólicos.

III.2.2 Sólidos suspendidos totales

Se presentó una disminución de la materia orgánica total producida por el efecto de los compuestos fenólicos, afectando la morfología del floculo y lavado del mismo (fig. III.2.2.1). Durante los dos primeros ciclos el porcentaje de reducción de sólidos suspendidos fue del 11 %. Una vez pasados los primeros ciclos de la aclimatación, los sólidos suspendidos tienden a estabilizarse, por la reducción de la materia orgánica de los microorganismos (respiración endógena). En los ciclos 7 al 15 los microorganismos están utilizando la única fuente de carbono en el sistema.

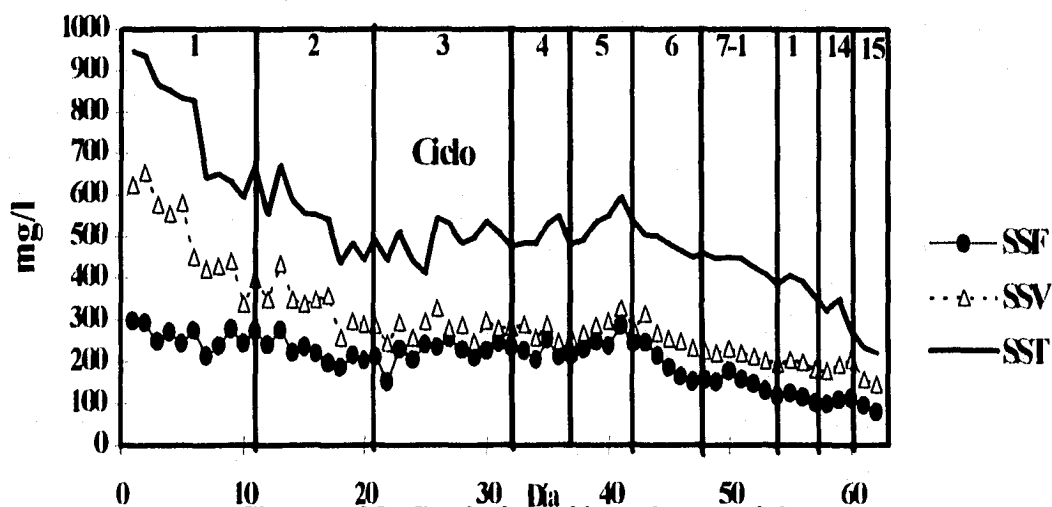


Figura III.2.2.1 Patrón de cambio en el reactor de los sólidos suspendidos totales, $X_{\text{máx}} = 1.15 \times 10^9$ UFC/l

III.2.3 Índice volumétrico de lodo

Durante el periodo de aclimatación el IVL fue disminuyendo, al igual que los SST, por el efecto de la mezcla de fenoles empleada (fig. III.2.3.1). El IVL varía de 40 a 100 ml/g para un buen lodo, pero puede exceder de 200 ml/g para un lodo deficiente con tendencia a esponjar, debido a las bacterias filamentosas y hongos en el sistema. A lo largo de la aclimatación el lodo mejoró su capacidad de sedimentación. Las observaciones microscópicas a los flóculos durante el periodo de aclimatación mostraron una disminución en el tamaño y una disgregación de los flóculos provocados por los fenoles. El tipo de sistema SBR que se utilizó durante el periodo de aclimatación, mejoró la capacidad de sedimentación del flóculo ya que no presentaron fuerzas de tensión provocadas por algún tipo de bomba de recirculación, como es el caso en los sistemas en continuo (Wanner, 1992).

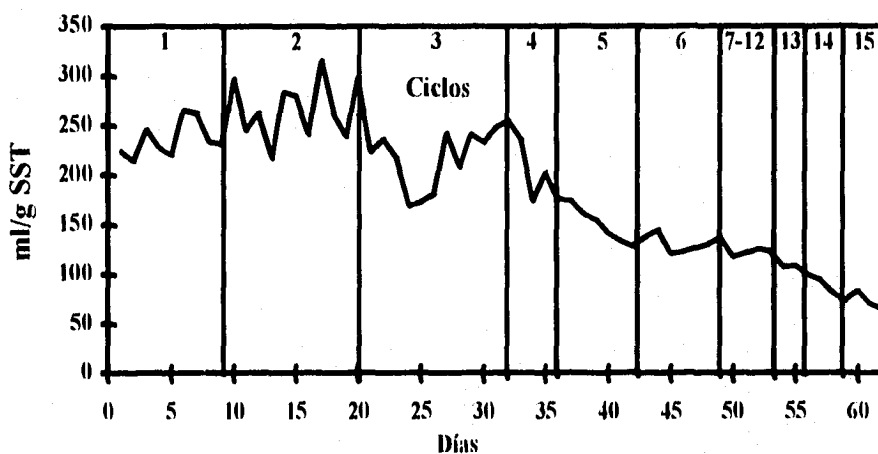


Figura III.2.3.1 Índice volumétrico de lodo; Aclimatación a fenoles

III.2.4 Carbón orgánico total y fenoles

El carbón teórico de la mezcla de fenoles utilizada fue de 21.3 mg/l. La eficiencia de biodegradación del COT que fue del 75 % durante los primeros ciclos. Los compuestos fenólicos se condensan con la 4-aminoantipirina a un pH de 7.9 ± 0.1 , para producir una oxidación alcalina (ferricianuro de potasio) y formar una antipirina coloreada. Debido a que la mezcla de los compuestos fenólicos utilizados proporcionar un patrón universal de fenoles. Por esta razón, el propio fenol (C_6H_5OH) ha sido seleccionado como un patrón para los procedimientos colorimétricos; cualquier color producido por la reacción de otros compuestos fenólicos se informa como fenol. Debido a que la sustitución suele reducir la respuesta, este valor representa la concentración mínima de los compuestos fenólicos. La fig. III.2.4.1 muestra los resultados de la eficiencia de biodegradación para el COT y fenoles.

La figura muestra que hay una eficiencia de degradación del fenol superior al COT en los primeros 3 ciclos del periodo de aclimatación. En estos primeros ciclos la duración de los mismos se estableció cuando el 95 % de los fenoles fuera degradado. Para los ciclos posteriores la eficiencia de degradación para el COT se incrementó por la adición del COT teórico (21.3 mg/l) de la mezcla de fenoles de un ciclo a otro y por el COT de la materia orgánica producto de una lisis celular del sistema. Es por esta razón que los microorganismos utilizan la fuente de carbón disponible en el sistema.

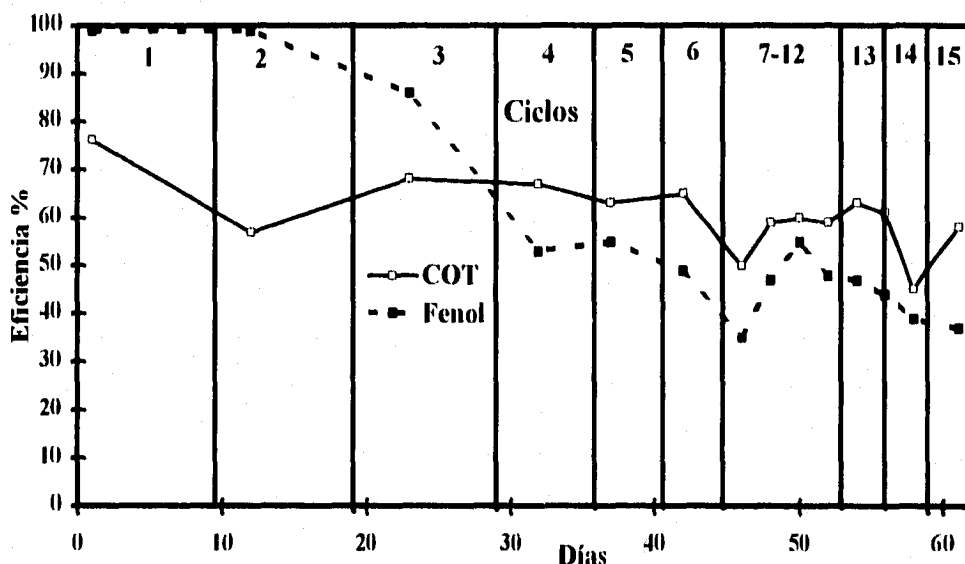


Figura III.2.4.1 Eficiencias de biodegradación para COT y fenoles

III.2.5 Determinación de cloruros

Se realizó un balance de cloruros libres en el reactor considerando la acumulación de Cl por el volumen intercambiado en el reactor y la cantidad de cloruros teóricos (12.6 mg Cl/l) de la mezcla de fenoles. La concentración de los cloruros libres en el reactor se mantuvo a lo largo del periodo de aclimatación, debido al volumen intercambiado en el reactor de un ciclo a otro. Es decir, después de cada ciclo $\frac{1}{4}$ del volumen del reactor permanece en el sistema acumulándose, por lo tanto, durante la aclimatación se acumulan 4.1 mg Cl/l. Los cloruros libres en el reactor se mantuvieron por debajo del teórico, esto significa que la mineralización (hasta CO₂) de los clorofenoles fue del 55 % (fig. III.2.5.1).

Los porcentajes de eficiencia de eliminación para el COT, Cl⁻ y clorofenoles se muestran en la tabla III.2.5.1. El porcentaje de eliminación de COT se mantuvo por encima de los porcentajes de Cl⁻ y clorofenoles. Debido a la acumulación de COT en cada ciclo y por la materia orgánica debida a la lisis celular del sistema. Los clorofenoles fueron mineralizados a CO₂ más agua y cloruros libres dentro del sistema.

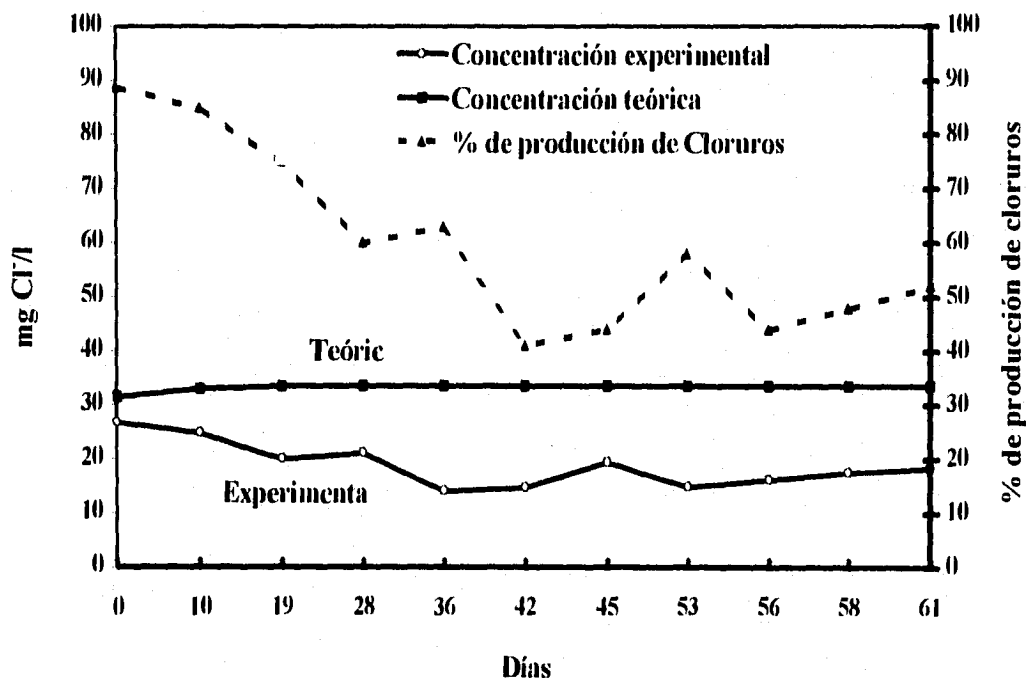


Figura III.2.5.1 Balance de cloruros en la aclimatación

Tabla III.2.5.1 Porcentajes de eficiencia de eliminación del COT, Cl⁻ y clorofenoles, durante el periodo de aclimatación.

Ciclo	% de eliminación del COT	% de eliminación de Cl ⁻	% de eliminación para los Clorofenoles
1	79	88	99
2	57	85	99
3	68	75	86
4	67	60	53
5	63	63	55
6	65	41	49
7-10	50	44	35
11	59	58	47
12	60	44	55
13	59	48	48
14	63	52	47
15	61	43	44

III.3 Morfología del flóculo en el periodo de aclimatación

El flóculo es un conglomerado de microorganismos y materia orgánica e inorgánica, suspendido en un medio acuoso. El conjunto de varios flóculos forman los lodos activados. Desde un punto de vista biológico es una comunidad formada por microorganismos como son: bacterias, algas, protozoarios y hongos. También esta constituido por materia inerte, orgánica e inorgánica del sistema. La composición de los lodos activados en un sistema en particular depende del contenido de nutrientes de las aguas residuales por tratar, así como de las condiciones de operación de la planta de tratamiento.

La formación de flóculos en el proceso de los lodos activados se atribuye a la secreción de polielectrolitos naturales, como los polisacáridos y poliaminoácidos complejos, durante la fase de declive y la endógena. La formación del material de reserva alimentaria poli-hidroxibutirato ha sido asociada con la formación de flóculos, y se ha reportado la conexión entre las células de fibrillas celulósicas con el crecimiento de flóculos libres (Mulder *et al.* 1971).

Las características de un flóculo del proceso por lodos activados (en aguas residuales), en buenas condiciones tiene un olor no molesto característico, una apariencia de color marrón. Si el color es muy oscuro, puede estar próximo a volverse séptico. Si el color es más claro de lo normal puede haber una aireación insuficientemente y los sólidos tienen tendencia a sedimentar lentamente.

En este estudio se realizaron observaciones diarias al microscopio óptico y se tomaron características morfológicas del flóculo en cuanto al color, tamaño, forma y tipos de microorganismos agregados al mismo. Antes de ponerlo en contacto con la mezcla de fenoles los flóculos presentaron un color café oscuro ó marrón, de tamaño grande, compacto y de forma redondeada. En cuanto a la materia orgánica e inorgánica inicial, los sólidos suspendidos fueron: 987 mg de SST/l, 650 mg de SSV/l y 385 mg de SSF/l. Se observaron agregaciones de algas, hongos y ciliados fijos al flóculo como *Vorticella* sp., *Opercularia* sp. y *Epistylis* sp. También se observaron ciliados libres nadadores como *Paramecium* sp., *Euplotes* sp. y *Aspidisca costata* rodeando al flóculo para alimentarse de las bacterias y materia orgánica que lo componen.

Los análisis empleados durante el periodo de aclimatación, muestran una relación de causa-efecto, por la introducción del compuesto de fenoles empleado y para su degradación del mismo, por las diferentes poblaciones de microorganismos que constituyen los lodos activados.

III.3.1 Evolución de la morfología del floculo durante el periodo de aclimatación a fenoles

Al adicionar la mezcla de fenoles, los cambios observados a la morfología del floculo fueron los siguientes. La fig. III.3.1.1 muestra la morfología del floculo con agregaciones de hongos y algas, antes de ponerlo en contacto con la mezcla de los fenoles; 987 mg de SST/l, 650 mg de SSV/l y 385 mg de SSF/l. La fig. III.3.1.2 muestra la morfología del floculo, con *Vorticella convallaria* a los 26 d de operación del reactor; 490 mg de SST/l, 275 mg de SSV/l y 215 mg de SSF/l. La fig. III.3.1.3 muestra la morfología del floculo y protozooario muerto a los 60 d de operación del reactor; 290 mg de SST/l, 180 mg de SSV/l y 120 mg SSF/l.

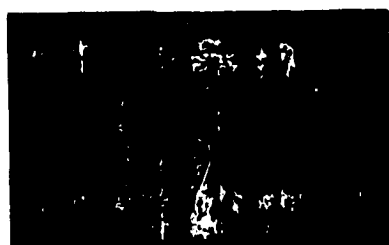


Figura III.3.1.1 (25 x)



Figura III.3.1.2 (40 x)



Figura III.3.1.3 (25 x)

III.3.2 Diferentes poblaciones que constituyen a los lodos activados durante el periodo de aclimatación

Los lodos activados se componen por procariontes como las bacterias aerobias y eucariontes como protozoarios, algas, hongos y nemátodos. La fig. III.3.2.1 muestra a *Aspidisca costata* sobre el floculo en el día 3 de operación del reactor; 915 mg de SST/l, 625 mg de SSV/l y 290 mg de SSF/l. La fig. III.3.2.2 muestra agregaciones de hongos en el floculo en el día 6 de operación del reactor; 815 mg de SST/l, 470 mg de SSV/l y 365 mg de SSF/l. La fig. III.3.2.3 muestra un alga espiralada en el día 10 de operación del reactor; 745 mg de SST/l, 450 mg de SSV/l y 275 mg SSF/l.



Figura III.3.2.1 (100 x)



Figura III.3.2.2 (100 x)



Figura III.3.2.3 (100 x)

III.3.3 Diferentes especies de protozoarios observados en el periodo de aclimatación

En su mayoría formas sésiles con poca ciliatura somática. Bandas ciliares orales usualmente conspicuas. La fig. III.3.3.1 muestra a *Vorticella convallaria* en el día 43 de operación del reactor; 540 mg de SST/l, 355 mg de SSV/l y 185 mg de SSF/l. La fig. III.3.3.2 muestra a *Vorticella communis* en el día 24 de operación del reactor; 525 mg de SST/l, 265 mg de SSV/l y 165 mg de SSF/l. La fig. III.3.3.3 muestra a *Vorticella* sp. en el día 7 de operación del reactor; 815 mg de SST/l, 485 mg de SSV/l y 360 mg de SSF/l.

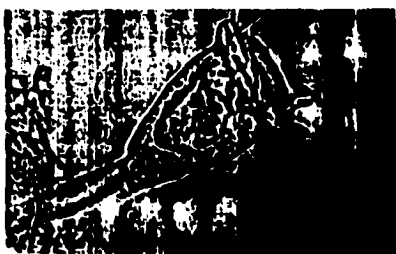


Figura III.3.3.1 (100 x)



Figura III.3.3.2 (100 x)



Figura III.3.3.3 (100 x)

La presencia de *Aspidisca costata* se observó en el flóculo hasta los 10 días del primer ciclo del periodo de aclimatación a fenoles. Las especies características de *Opercularia* sp., *Holophrya* sp., *Peranema* sp., *Acineta* sp. y *Aspidisca* sp. representan un equilibrio general entre las poblaciones que constituyen los lodos activados (Duchene y Cotteux, 1993).

Al inicio del periodo de aclimatación se observaron los primeros protozoarios muertos como *Euplotes* sp., *Euglypha* sp. y *Chilodonella* sp. El color del flóculo cambió de un color café oscuro a café claro después de 4 días. Los ciliados que permanecieron fijos en el flóculo en el primer ciclo fueron *Vorticella* sp., *Opercularia* sp. y *Epistylis* sp.

III.3.4 Diferentes especies de rotíferos en el periodo de aclimatación

Una característica morfológica de los rotíferos es la corona ciliada, la cutícula y el extremo posterior que se adelgaza gradualmente hasta formar un pie con dedos. La faringe posee piezas cuticulares móviles. La fig. III.3.4.1 muestra a *Monostyla* sp. a los 13 d de operación del reactor; 415 mg de SST/l, 240 mg de SSV/l y 175 mg de SSF/l. La fig. III.3.4.2 muestra a *Proales* sp. a los 60 d de operación del reactor; 290 mg de SST/l, 180 mg de SSV/l y 120 mg de SSF/l.

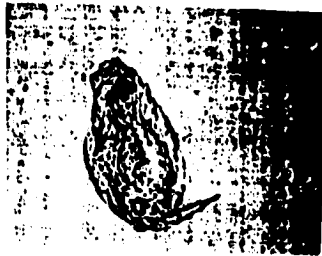


Figura III.3.4.1 (100 x)



Figura III.3.4.2 (100 x)

Al término de los 15 ciclos (63 días) los flóculos presentaron un color café claro y su morfología fue de tamaño pequeño, disperso y con apariencia amorfa. Se encontró la presencia de *Proales* sp. y *Vorticella convallaria* fija al flóculo.

La apariencia morfológica y el tipo de microorganismos que conforman al flóculo dependen de las condiciones de operación de la planta de tratamiento, tales como son: la carga orgánica, oxigenación y el volumen de espuma. Bajo condiciones de operación de una carga orgánica media y con oxigenación estable, el tamaño del flóculo es grande, la forma redondeado, compacto y los microorganismos característicos que lo constituyen son *Opercularia* sp., *Epistylis* sp., *Carchesium* sp. y *Aspidisca* sp. (Gschlößl y Bühl, 1993).

El efecto de la mezcla de los fenoles sobre el flóculo tuvo como consecuencia que este se disgregara. La composición de la mezcla provoca un efecto tóxico en los microorganismos que no pueden aclimatarse. De manera externa al medio, las condiciones de operación del reactor como son tiempo de retención, carga orgánica y aireación, influyen en la biofloculación del proceso de lodos activados.

III.4 Dinámica de poblaciones de los lodos activados

Para describir la dinámica de poblaciones de los lodos activados, es necesario clasificar a los microorganismos que intervienen en el proceso del tratamiento biológico para aguas residuales. En general los microorganismos que podemos encontrar para el tratamiento biológico los podemos reflejar en tres categorías generales: (1) microorganismos que participan en el proceso del tratamiento biológico, en la biofloculación y la degradación de compuestos orgánicos e inorgánicos; (2) los microorganismos que causan algún tipo de problema en el proceso del tratamiento y (3) los microorganismos que no participan en el proceso de tratamiento, en esta última categoría se incluyen los microorganismos que son patógenos y parásitos como bacterias, virus y helmintos. Los principales procesos biológicos utilizados en el tratamiento del agua residual se identifican en tres grupos principales: procesos anaerobios, procesos aerobios y procesos anóxicos. Cada uno de estos procesos se subdividen a su vez, dependiendo de si el tratamiento se lleva a cabo en sistemas de cultivo en suspensión, de cultivo fijo o en combinaciones de los mismos. Las principales aplicaciones de estos procesos son: 1) la eliminación de la materia orgánica carbonosa presente en el agua residual, generalmente medida como DBO, COT ó DQO; 2) nitrificación; 3) desnitrificación, y 4) estabilización.

El proceso de lodos activados fue desarrollado en Inglaterra en 1914 por Andern y Lockett y llamado así porque suponía la producción de una masa activa de microorganismos capaz de estabilizar un residuo por vía aerobia. Para diseñar correctamente un sistema de lodos activados con las debidas garantías de un funcionamiento, es necesario comprender la importancia de los microorganismos dentro del sistema cuyo papel clave de las bacterias es biodegradar la materia orgánica contenida en el agua. En general, las bacterias en el proceso de lodos activados son Gram negativas e incluyen miembros de los géneros *Pseudomonas*, *Zoogloea*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Bedellovibrio*, *Mycobacterium*, y bacterias aerobias nitrificantes como, *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*. Adicionalmente, pueden presentarse diversas formas filamentosas, tales como *Sphaerotilus*, *Beggiatoa*, *Thiothrix*, *Leptomitus*, *Lecicothrix* y *Geotrichum*. Las bacterias Gram positivas que se han descrito del proceso de lodos activados son los géneros *Bacillus* sp. y *Micrococcus* sp. (Lewandowski, 1990). En tanto que las bacterias son los microorganismos que realmente degradan el residuo orgánico del afluente, las actividades metabólicas de otros microorganismos son igualmente importantes en el sistema de lodos activados. Por ejemplo, los protozoarios y rotíferos actúan como depuradores de los efluentes. Los protozoarios son depredadores de bacterias dispersas que no han floculado y los rotíferos consumen cualquier partícula biológica pequeña que no haya sedimentado. Los hongos también juegan un papel importante dentro de la degradación de compuestos orgánicos como son, *Phanerochaete chrysosporium* y *Rizopus* sp. (Lema et al. 1995).

Wanner (1994) define a la dinámica de poblaciones microbiana como una rama de la ciencia y tecnología del agua que describe las interacciones entre los microorganismos de un consorcio microbiano complejo. En la tabla III.4.1 se muestran las interacciones entre los microorganismos de los lodos activados.

Tabla III.4.1 Factores que limitan la distribución en el proceso de lodos activados.

Factores abióticos	Factores bióticos
Físicos: Temperatura Densidad	Relaciones con otros organismos: Competencia Predación Herbivoría Simbiosis Parasitismo Comensalismo Mutualismo
Químicos: Salinidad del agua pH Nutrientes Oxígeno Alcalinidad	

III.4.1 Interacciones entre microorganismos del proceso de los lodos activados

III.4.1.1. Competencia

Fenómeno que tiene lugar cuando un número de microorganismos de una o varias especies utilizan recursos comunes que son escasos (por explotación); o, si los recursos no son escasos, tiene lugar la competencia cuando los microorganismos que buscan esos recursos afectan a otros en el proceso (por interferencia).

III.4.1.2 Predación

Una especie se come a la otra, por lo que la primera resulta beneficiada al tiempo que daña a la segunda.

III.4.1.3 Herbivoría

Especies de microorganismos que se alimentan de algas.

III.4.1.4 Simbiosis

Vida en común de carácter permanente de organismos específicamente distintos, la cual presenta diferentes tipos de simbiosis: parasitismo, comensalismo y mutualismo.

III.4.1.5 Parasitismo

Relación en la cual, uno depende nutricionalmente de otro (el huésped), obtiene refugio de él o de alguna otra forma lo afecta y desencadena una respuesta inmune.

III.4.1.6 Comensalismo

Relación en la cual una especie de microorganismo se beneficia y la otra no resulta afectada.

III.4.1.7 Mutualismo

Relación en la cual ambos microorganismos se benefician de su asociación.

Estas interacciones se presentan entre los microorganismos de las diferentes poblaciones o incluso en una sola población; sin embargo, estas interacciones están sujetas a condiciones de operación del reactor y la materia orgánica e inorgánica que contenga el efluente a tratar. En la figura III.4.1.1 se muestra los nichos ecológicos de los lodos activados.

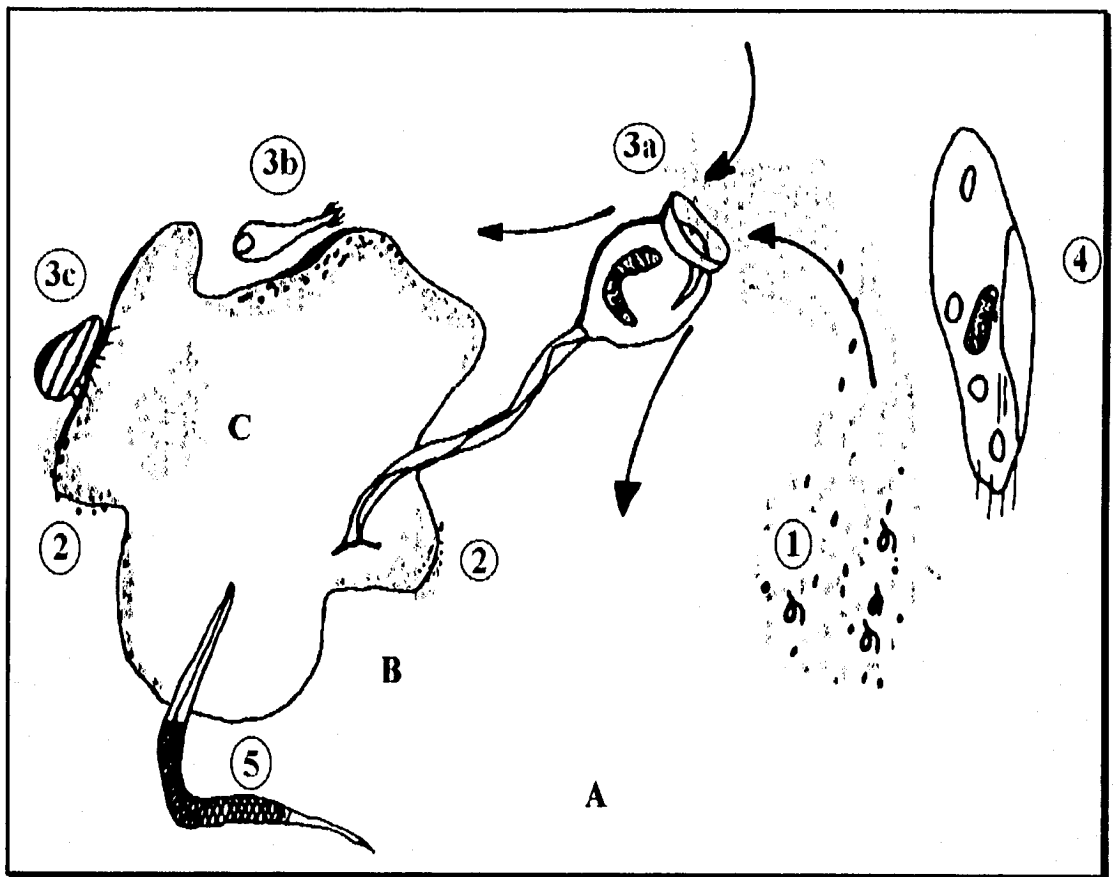


Figura III.4.1.1 Nichos ecológicos de los lodos activados.

A) Líquido intersticial

B) Superficie del flóculo

C) Materia orgánica, interior del flóculo

1.- Bacterias y zooflagelados libres

2.- Bacterias en la superficie del flóculo (bacterias formadoras del flóculo)

3.- Fauna típica del lodo activado formada por:

- Peritricos fijos al flóculo como *Vorticella* sp. (3a)

Función: filtradores, depredadores de bacterias y algas

- Phyllopharyngia como *Chilodonella* sp. (3b) explorando la superficie del flóculo

Función: depredadores de bacterias, algas y da mantenimiento al flóculo

- Spirotriches como el género de *Aspidisca costata* (3c)

Función: depredadores de bacterias, algas y da mantenimiento al flóculo

4.- Fauna de acompañamiento al flóculo (*Paramecium* sp.)

Bacteriófagos

Función: depredadores de bacterias, hongos, algas y materia orgánica

5.- Fauna detritívora: Saprófagos (nematodos)

Función: devoran materia orgánica inerte o en descomposición.

III.4.2 Cadena alimenticia en los lodos activados

La cadena alimenticia de los lodos activados depende de la proliferación de la población bacteriana, donde la densidad de microorganismos es proporcional a la carga orgánica y en la que se desarrollan una sucesión de especies de microorganismos que tienen entre ellos relaciones depredadoras. A continuación se describe la cadena alimenticia (fig. III.4.2.1) del proceso de lodos activados durante el periodo de aclimatación a la mezcla de fenoles.

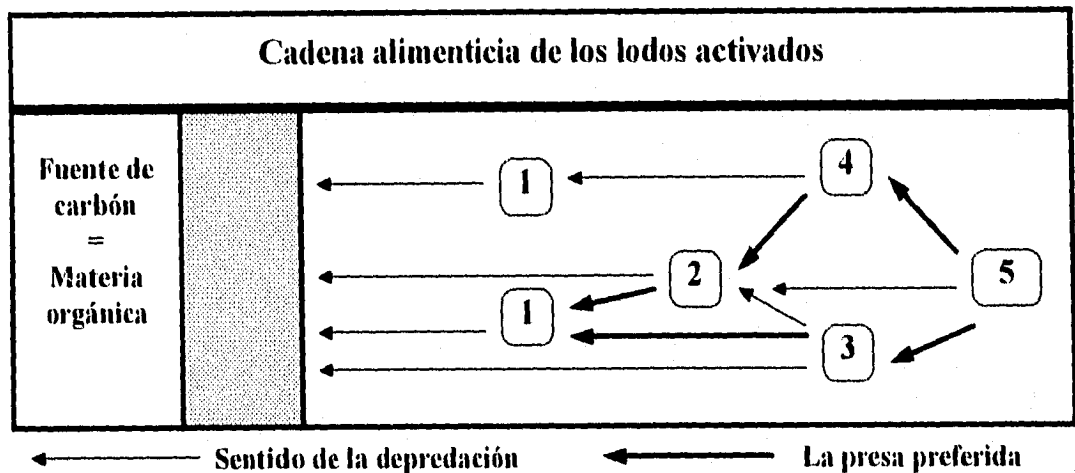


Figura III.4.2.1 Cadena alimenticia aplicada a los lodos activados durante la aclimatación.

1) Producción primaria, constituida de algas, hongos, bacterias y flagelados (*Bodo* sp. y *Ceratium* sp.) en la que el crecimiento de la población de hongos y bacterias es proporcional a la cantidad de carbón orgánico disponible en el sistema.

2) Protozoarios primarios (*Euglypha* sp., *Euglena* sp., *Aspidisca costata* y *Chilodonella* sp.) que son depredadores del número (1), pero también susceptibles de asimilar una parte de los compuestos orgánicos del medio; su crecimiento no es proporcional a la polución por consecuencia solo juegan un papel indirecto en el proceso de degradación.

3) Protozoarios (*Opercularia* sp., *Epistylis* sp. y *Vorticella* sp.) que se alimentan preferentemente del número (1) y utilizan al número (2) como alimento sustituto o en su defecto utilizan la materia orgánica de manera permanente a una tasa reducida siempre y cuando el número (1) falte.

4) Protozoarios (*Paramecium* sp. y *Euplotes* sp.) competidores del número (3) que tiene los mismos alimentos y las mismas preferencias pero no tiene la relación de depredación con el número (3).

5) Los rotíferos (*Proales* sp. y *Monostyla* sp.) son los depredadores de los números (3) y (4) cuya acción tiende a eliminarlos.

III.4.2.1 Nichos ecológicos de los lodos activados

En la mezcla completa de los lodos activados destaca la existencia de unidades morfológicas tales como: masa de flóculo, superficie del flóculo y líquido interflócular. La presencia de fauna específica en estas unidades morfológicas justifica que se les eleve a nichos ecológicos. La especificidad de una especie animal contra la de un nicho ecológico se expresa por una adaptación morfológica a modo de desplazamiento y alimento disponible (formas libres nadadoras, formas sésiles y formas depredadoras) por una etología característica y por una presencia constante en un sitio específico de los lodos activados. Las depredaciones interespecíficas llegan a tener importantes consecuencias para la estabilidad del ecosistema. En la fig. III.4.2.1.1 se muestra el sentido de las depredaciones en los lodos activados. A pesar que los tres nichos ecológicos citados son explotados en una buena actividad, el nicho del líquido intersticial constituido por microorganismos de formas nadadoras rápidas y muy móviles no puede ser objeto de una depredación por los microorganismos de otros nichos que son mucho más lentos y poco móviles. Esta situación debería conducir al enriquecimiento progresivo de los microorganismos que constituyen el nicho flócular.

Las formas sésiles como *Vorticella* sp., *Opercularia* sp. y *Epistylis* sp. que se encuentran en la superficie del flóculo, son objeto de una depredación más marcada tanto por los detritívoros como por los depredadores del líquido intersticial a causa de su lentitud relativa. La presencia de un gran número de vorticelados significa que el crecimiento de bacterias libres es activo y las que están fijadas son testigo de la existencia de un sustrato denso en la superficie del flóculo. La ausencia de la población bacteriana tiene como consecuencia el disparo de la fauna de la superficie de los flóculos en vez de la fauna detritívora (nemátodos). La insuficiencia de sustrato limita el crecimiento bacteriano requerido para asegurar el desarrollo de ciliados libres del líquido intersticial.

Los diferentes géneros de *Vorticellus* sp. al final del periodo de aclimatación a fenoles, indica que la población bacteriana fue lo suficientemente abundante para satisfacer las necesidades alimenticias y mantener vivos a los ciliados durante este periodo. La presencia del depredador *Proales* sp. indica que la cadena alimenticia de los lodos activados se mantuvo hasta el final de la aclimatación a fenoles.

Aspidisca costata es el protozoo que mantiene la superficie del flóculo libre de bacterias y hongos. Los rotíferos como *Proales* sp. y *Euplotes* sp. son los mayores depredadores de bacterias y de protozoarios del sistema de los lodos activados. La población de rotíferos depende de las demás poblaciones de bacterias, algas, hongos y protozoarios que constituyen la cadena trófica de los lodos activados. Los nemátodos son los microorganismos detritívoros del sistema de los lodos activados, devoran una parte de la materia orgánica inerte y cadáveres de protozoarios.

En resumen, la especificidad del modo de vida (nicho ecológico) introduce en los ecosistemas de lodos activados una gran garantía de supervivencia simultánea de especies que explotan el mismo alimento. Las diversas poblaciones de microorganismos que constituyen los lodos activados fueron afectadas por la presencia del compuesto orgánico tóxico. Estas poblaciones reaccionan de manera diferente dependiendo de su capacidad metabólica para lograr su permanencia dentro del sistema y de las interacciones entre los demás microorganismos del proceso de lodos activados.

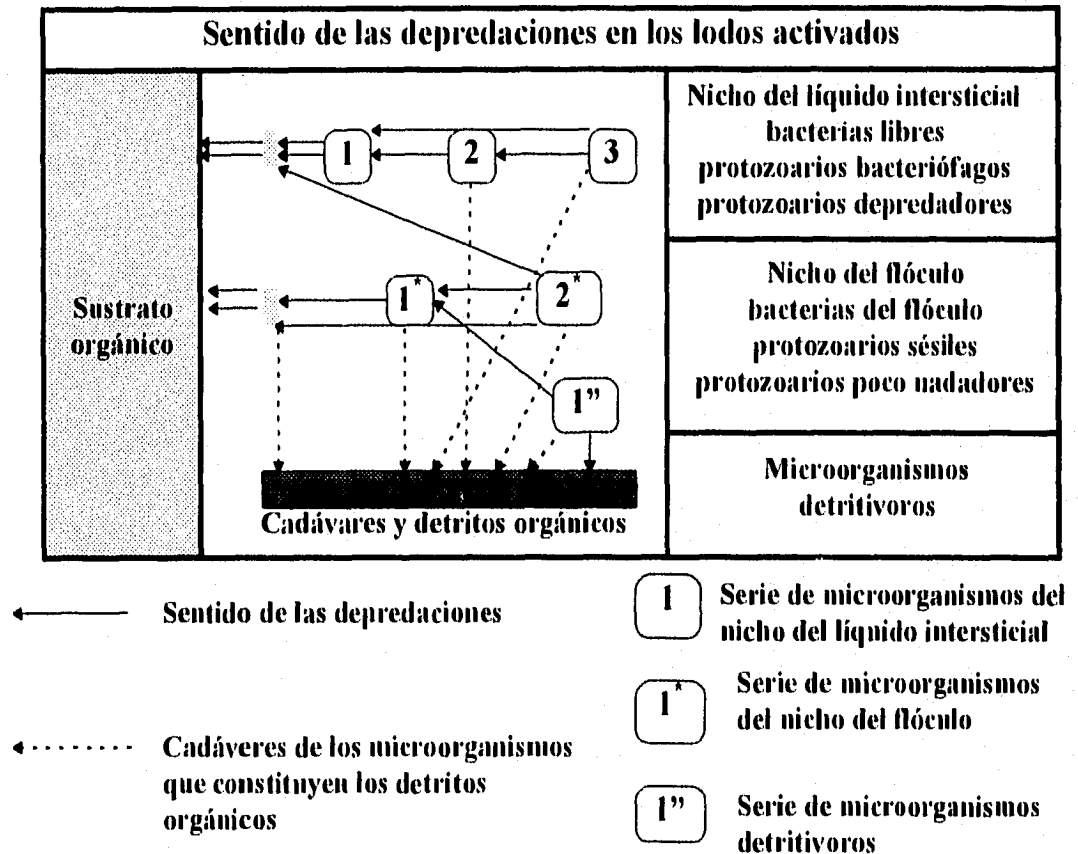


Figura III.4.2.1.1 Sentido de las depredaciones en los lodos activados.

III.4.3 Dinámica de Poblaciones bacteriana

El seguimiento de la dinámica de población bacteriana se realizó mediante aislamientos de cepas puras obtenidas a partir de la CHP realizada cada dos días y durante todos los ciclos del periodo de aclimatación. Se identificaron 10 géneros al inicio del periodo de aclimatación (tabla III.4.3.1). La distribución en la naturaleza de las bacterias identificadas, se encuentran en ambientes acuáticos como son cuerpos de agua epicontinentales. Los géneros de *Serratia*, *Aeromonas*, *Erwinia* y *Proteus* se tienen bien identificados en estudios sobre metabolismo, ya que son causantes de enfermedades gastrointestinales tanto en el hombre como en animales. En la literatura se han reportado los géneros de bacterias Gram positivos de *Bacillus* y *Micrococcus*, identificados a partir de suelos contaminados por compuestos fenólicos (Hill y Robinson, 1975; Spokes y Walter, 1974). En la figura III.4.3.1 se muestra la sucesión de bacterias aerobias Gram negativas durante los 15 ciclos del periodo de aclimatación. En los últimos ciclos del periodo de aclimatación las bacterias identificadas fueron *Chryseomonas luteola*, *Pseudomonas* sp., *Flavimonas oryzihabitans* y *Aeromonas* sp. Los géneros de *Chryseomonas* y *Flavimonas* tienen importancia médica por ser bacterias patógenas Gram negativas y causantes de diversas infecciones intestinales (Kostman *et al.* 1991).

Tabla III.4.3.1 Bacterias identificadas Gram negativas y porcentajes de identificación del sistema Api 20E.

Bacterias aerobias	Porcentaje de identificación
<i>Serratia</i> sp.	Aceptable identificación 82 %; T= 0.77
<i>Aeromonas salmonicida</i>	Buena identificación 95 %; T= 0.76
<i>Erwinia</i> sp.	Buena identificación 98.3 %; T= 0.80
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Buena identificación 90 %; T= 0.76
<i>Pasteurella</i> sp.	Baja identificación 75 % ; T= 0.72
<i>Proteus pemeri</i>	Buena identificación 89 %; T= 0.72
<i>Flavimonas oryzihabitans</i>	Aceptable identificación 81.3 %; T= 0.97
<i>Pseudomonas pseudomallei</i>	Buena identificación 82.7 %; T= 0.70
<i>Chryseomonas luteola</i>	Buena identificación 96 %; T= 0.78
<i>Enterobacter agglomerans</i>	Aceptable identificación 87.4 %; T= 0.67

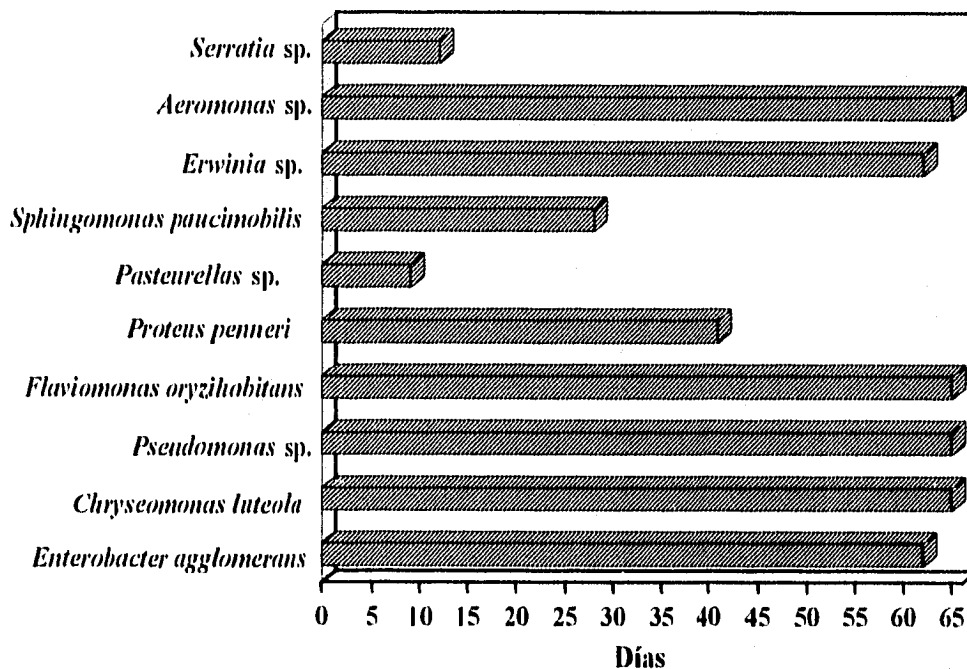


Figura III.4.3.1 Periodos en los que están presentes cada elemento de la población bacteriana durante la aclimatación

El tiempo de retención celular, es el tiempo que permanece una bacteria dentro del sistema. Dentro del reactor, el tiempo de retención celular fue disminuyendo a medida que los tiempos de cada ciclo se reducían y las bacterias se aclimataban (fig. III.4.3.2). En la tabla III.4.3.2 se muestran cepas puras de microorganismos reportados en la biodegradación de compuestos fenólicos.

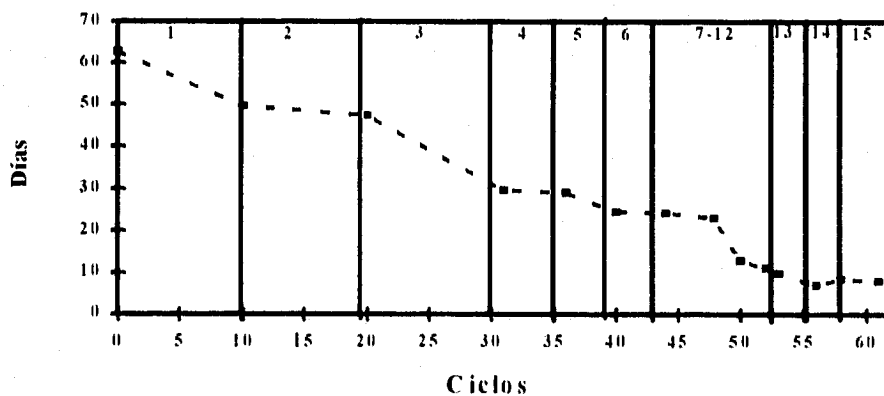


Figura III. 4.3.2 Tiempo de retención celular, en el periodo de aclimatación

Tabla III.4.3.2 Microorganismos registrados en la biodegradación de compuestos fenólicos, sistemas empleados y modo de operación.

Microorganismo	Sustrato	Sistema y modo de operación	Referencia
<i>Pseudomonas putida</i> P 8 y <i>Cryptococcus elinovii</i> H1	Fenol	Air-lift, lote y continuo Reactor loop	Zache y Rehm (1989) Morsen y Rehm (1987)
<i>Alcaligenes</i> sp. A 7-2	4-clorofenol	Columna empacada	Balfanz y Rehm (1991)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> (BKM-F-1767)	Pentaclorofenol	Columna empacada, lote semicontinuo Matraz	Lin <i>et al.</i> (1990)
<i>Pseudomonas putida</i>	4-clorofenol Fenol	Reactor en lote	Sáez y Rittmann (1991) Kottury <i>et al.</i> (1991)
<i>Fusarium flocciferum</i>	Fenol	Reactor mezclado, continuo	Anselmo y Novias (1991)
<i>Pseudomonas</i> sp.	3,4 diclorofenol 2,3,5,6-tetraclorofenol, Pentaclorofenol	Matraz agitado	Ibarra y Rodríguez (1993)
<i>Candida</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp.	Fenol	Reactor loop	Ehrhard y Rehm (1985)
<i>Escherichia coli</i> K 12 <i>Pseudomonas putida</i>	Fenol	Matraz agitado	Keweloh <i>et al.</i> (1989)
<i>Staphylococcus aureus</i> 257 <i>Methanospirillum hungatei</i>	Fenol	Matraz agitado	Knoll y Winter (1989)
<i>Fusarium flocciferum</i>	Fenol	Matraz agitado	Anselmo <i>et al.</i> (1989)
<i>Pseudomonas glathei</i>	4-clorofenol 2,4,6-triclorofenol	Proceso anaerobio - aerobio	Armenante <i>et al.</i> (1992)

Muchos estudios con cepas puras han mostrado que algunos intermediarios tóxicos se acumulan durante la biodegradación debido a que un sólo organismo no posee la habilidad para mineralizar completamente el xenobiótico.

El uso de cultivos mixtos para la degradación de xenobióticos no siempre puede ser tan benéfico como una cepa pura. Como es el caso para Haugland *et al.* (1990) reportaron que un organismo manipulado genéticamente degradó más eficientemente los herbicidas clorados del fenoxiacetato que un cultivo puro de bacterias. En este caso es importante verificar si tal organismo puede prevalecer en un medio ambiente abierto, como ocurre generalmente en los procesos de tratamiento de aguas residuales. La tabla III.4.3.3 muestra a consorcios microbianos registrados para la biodegradación de compuestos fenólicos.

Tabla III.4.3.3 Biodegradación de compuestos fenólicos por consorcios de microorganismos.

Microorganismos	Compuestos fenólicos	Sistema de operación	Referencia
Cultivos mixtos de biopelícula	2,4,6-triclorofenol 2,3,4,6-tetraclorofenol Pentaclorofenol Fenol 3-clorofenol	Reactor aerobio de lecho fluidizado	Puhakka y Järvinen (1992)
Cultivos mixtos de biopelícula	4-clorofenol 2,4-diclorofenol 2,4,6-triclorofenol	Reactor de biopelícula	Lu y Chen (1992)
Cultivos mixtos de biopelícula	2,4,6-triclorofenol 2,3,4,6-tetraclorofenol Pentaclorofenol	Reactor aerobio y anóxico de lecho fluidizado	Puhakka <i>et al.</i> (1992)
Cultivos mixtos	Fenol	Columna de suelo	Gaiek <i>et al.</i> (1994)
Lodos activados	2,4-dinitrofenol	Lodos activados	Silverstein <i>et al.</i> (1994)
Lodos activados	<i>p</i> -nitrofenol	Lodos activados	Matsui <i>et al.</i> (1994)
Cultivos mixtos	2,4-diclorofenolacetico	Columna de suelo	Estrella <i>et al.</i> (1993)

El uso de cultivos mixtos para la degradación de compuestos orgánicos tóxicos son particularmente importantes cuando se busca la completa mineralización de los compuestos orgánicos tóxicos.

III.4.4 Dinámica de poblaciones de protozoarios y rotíferos

El seguimiento de la dinámica de población de protozoarios se realizó mediante observaciones diarias al microscopio óptico, durante los 15 ciclos del periodo de aclimatación. Los géneros de protozoarios identificados al inicio del periodo de aclimatación se muestran en la tabla III.4.4.1. Los géneros *Chilodonella* sp., *Paramecium* sp., *Monostyla*, *Ceratium* sp., *Euglena* sp., *Englypha* sp., *Euplotes* sp. y *Aspidisca costata* se vieron afectados por la mezcla de fenoles en el sistema. Los protozoarios no presentan una actividad enzimática capaz de reconocer el compuesto orgánico tóxico, como las bacterias, por lo que las poblaciones de protozoarios disminuyen conforme el compuesto orgánico está presente en el sistema y los ciclos aumentan. Durante el periodo de aclimatación los géneros *Vorticella* sp. y *Epistylis* sp. representan una buena oxigenación y un funcionamiento estable del reactor. La presencia de *Euplotes* sp. en el medio acuoso refleja una deficiente eliminación de carbono (Madoni, 1994; Duchene y Cotteux, 1993). La evolución de la dinámica de protozoarios y rotíferos durante el periodo de aclimatación se muestra en la fig. III.4.4.1. Los protozoarios *Vorticella convalaria* y el rotífero *Proales* sp. se observaron hasta el día 63 de operación del reactor.

Tabla III.4.4.1 Protozoarios y rotíferos presentes en el inicio de la aclimatación a fenoles.

Phylum Sarcomastigophora	
SubPhylum Mastigophora	
Orden	Género
Dinoflagellida	<i>Ceratium</i>
Euglenida	<i>Euglena</i>
Kinetoplastida	<i>Bodo</i>
SubPhylum Sarcodina	
Orden	Género
Gromiida	<i>Englypha</i>
Phylum Ciliophora	
Subclase	Género
Phyllopharyngia	<i>Chilodonella</i>
Hymenostomatia	<i>Paramecium</i>
Peritrichia	<i>Opercularia</i>
Peritrichia	<i>Epistylis</i>
Peritrichia	<i>Vorticella</i>
Hypotrichia	<i>Aspidisca</i>
Hypotrichia	<i>Euplotes</i>
Metazoarios	
Phylum Rotifera	
Orden	Género
Ploima	<i>Monostyla</i>
Ploima	<i>Proales</i>

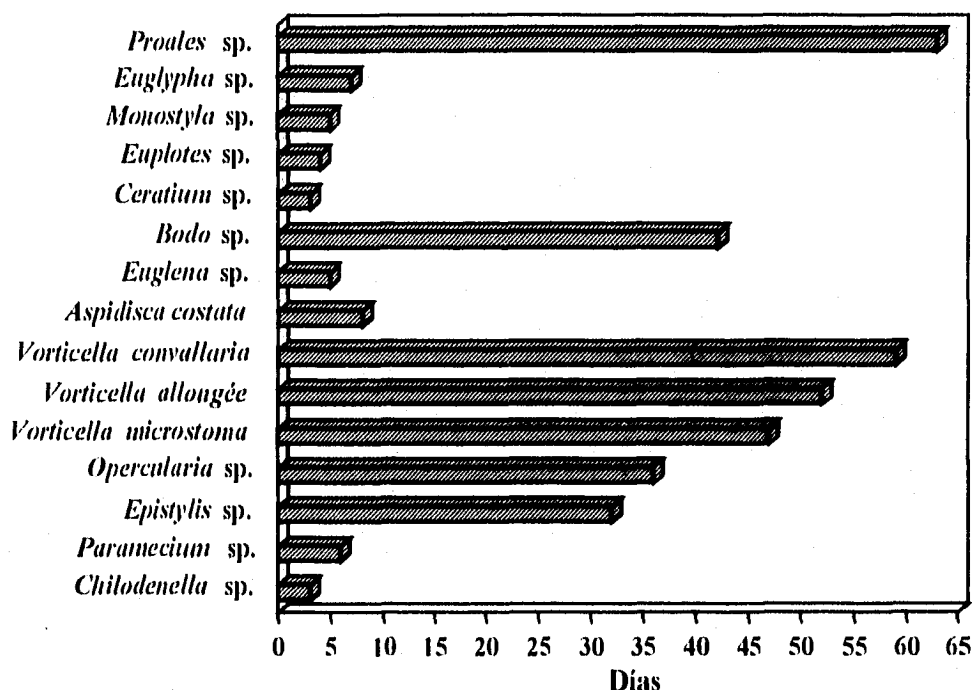


Figura III.4.4.1 Periodos en los que están presentes cada elemento de las poblaciones de protozoarios y rotíferos

Esteban y Tellez (1992) señalan que las especies pertenecientes al género *Opercularia* como son *O. coarctata*, *O. microdiscus*, y *O. minima* sirven como bioindicadores en los procesos de lodos activados. Generalmente, se utilizan para realizar análisis estadístico sobre la calidad del lodo activado. Cuando se incrementa el número de estas especies en el sistema indican que es de mala calidad.

Madoni (1994) menciona que un alto número de ciliados en el medio (mayor a 10^7 /l), por lo general indican que existe un grado óptimo de purificación del agua tratada en la planta. La diversidad de poblaciones de protozoarios están relacionadas con las condiciones de oxigenación, fuerzas de carga y concentraciones de amoníaco dentro de la planta de tratamiento. Cotteux (1993), describe la técnica de observaciones microscópicas de la microfauna del proceso de lodos activados. La técnica consiste en utilizar como indicadores biológicos a las poblaciones de protozoarios, las cuales responden a variaciones de operación de las plantas de tratamiento de aguas. De acuerdo con esta técnica, las especies de *Vorticella convallaria* y *Proales* sp. representan una buena oxigenación y un funcionamiento estable durante el periodo de aclimatación en el reactor.

III.4.5 Dinámica de poblaciones de algas, hongos, nemátodos, protozoarios y rotíferos

El seguimiento de la dinámica de poblaciones de algas, hongos y nemátodos se realizó mediante observaciones al microscopio óptico diarias. En la figura III.4.5.1 se muestra la sucesión de las poblaciones de algas, hongos y nemátodos durante los 15 ciclos del periodo de aclimatación a fenoles. La población de nemátodos se observó hasta el día 51 de operación del reactor. Duchene y Cotteux (1993) relacionan el incremento de la densidad de nemátodos (mayor a 3×10^3 microorganismos/l), con la aireación baja o por una decantación estática en periodos estacionales. Los nemátodos son metazoarios no segmentados y microorganismos saprófagos dentro del reactor.

La población de hongos se observó hasta el día 57 de operación del reactor. Las poblaciones de hongos participan de manera semejante a las bacterias en la biodegradación de compuestos orgánicos tóxicos (Field *et al.* 1993). Los compuestos fenólicos son utilizados en la industria de aserradero para impedir el crecimiento y desarrollo de hongos. La mezcla utilizada de compuestos fenólicos presentó un efecto tóxico sobre las poblaciones de hongos dentro del reactor. Las poblaciones de protozoarios se observó hasta el día 63 de operación del reactor. Las especies de *Vorticella convallaria* y el rotífero *Proales* sp. fueron las que permanecieron a lo largo del periodo de aclimatación a fenoles. La dinámica de poblaciones del proceso de lodos activados se refleja en las condiciones de operación del reactor, en la mezcla de compuestos fenólicos utilizado como sustrato y en las poblaciones de microorganismos del lodo de inóculo. La dinámica de poblaciones de lodos activados se caracterizó por presentar una disminución en las poblaciones de bacterias, protozoarios, hongos, algas, rotíferos y nemátodos.

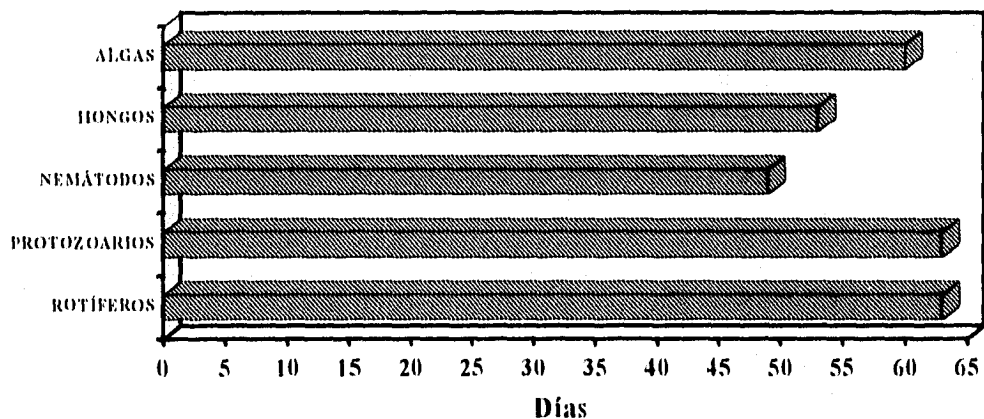


Figura III.4.5.1 Dinámica de poblaciones de algas, hongos, nemátodos, protozoarios y rotíferos

IV Cinéticas de degradación de compuestos orgánicos

Los microorganismos heterótrofos utilizan compuestos orgánicos como fuente de energía para su crecimiento. La degradación de compuestos orgánicos se lleva a cabo durante el metabolismo celular. El proceso del metabolismo tiene lugar a través de secuencias de reacciones consecutivas catalizadas enzimáticamente, en las cuales participan varios compuestos intermedios (Gaudy y Gaudy, 1981).

Las enzimas -catalizadores orgánicos producidos por la célula viviente- son vitales para las reacciones implicadas en dichas vías y ciclos. Las enzimas son proteínas combinadas con una molécula inorgánica o una molécula orgánica de bajo peso molecular. Como catalizadores, las enzimas pueden aumentar en gran medida la velocidad de las reacciones químicas sin alterarse. Existen dos tipos generales de enzimas, extracelulares e intracelulares. Cuando el sustrato o nutriente requerido por la célula no es capaz de penetrar la pared de la célula, la enzima extracelular convierte el sustrato o nutriente en una forma tal que pueda ser transportada al interior de la célula. Las enzimas intracelulares contribuyen a la fotosíntesis y reacciones de energía dentro de la célula. Las enzimas son conocidos por su alto grado de eficacia para convertir el sustrato en productos finales. Una molécula de enzima puede convertir muchas moléculas de sustrato por minuto en productos finales.

Las enzimas se clasifican basándose en la reacción que catalizan. Algunas enzimas son proteínas simples; otras son proteínas conjugadas y contienen grupos prostéticos constituidos por iones metálicos, por coenzimas, o por ambos. Las coenzimas y los grupos prostéticos actúan como transportadores intermediarios de grupos funcionales específicos, de átomos o de electrones.

En las reacciones catalizadas por enzimas, un incremento de la concentración del sustrato aumenta la velocidad de reacción hasta que se alcanza un punto en que dicha velocidad se hace independiente de la concentración del sustrato. En este punto el enzima se halla saturado y la reacción es de orden cero con respecto al sustrato. Los inhibidores competitivos de las enzimas son aquéllos que reaccionan reversiblemente con la enzima libre en competencia con el sustrato para formar un complejo enzima-inhibidor; su acción puede invertirse por incremento de la concentración del sustrato. Los inhibidores acompetitivos no reaccionan con la enzima libre, pero se combinan reversiblemente con el complejo enzima-sustrato, impidiendo la formación de los productos. Los inhibidores no competitivos reaccionan reversiblemente tanto con la enzima libre como con el complejo enzima-sustrato. Los inhibidores irreversibles producen una modificación química permanente de algún grupo funcional esencial en la molécula de la enzima.

Los modelos matemáticos sobre cinéticas de degradación de compuestos xenobióticos es amplia en la literatura como la describen los autores (Pawloswski y Howell, 1973; Papanastasiou y Maier, 1982, y 1983; Eckenfelder, 1982; Rozich y Gaudy, 1983; Banerjee *et al.*, 1984; D'Adamo *et al.*, 1984; Gaudy *et al.*, 1988; Klecka y Maier, 1988; Sokol, 1988; Templeton y Grady, 1988; Pitter y Chudoba, 1990; Saéz y Rittmann, 1991; Buitrón y Capdeville, 1993).

IV.1 Aplicación del modelo de Haldane

Experimentalmente, se ha encontrado que el efecto de un sustrato sobre la tasa de crecimiento específico puede definirse adecuadamente por medio de la expresión de Monod:

(VI.1.1)

$$\mu_{max} = \left(\frac{S}{K_S + S} \right)$$

donde:

μ = tasa de crecimiento específico, tiempo⁻¹

μ_{max} = tasa de crecimiento específico máxima, tiempo⁻¹

S = concentración del sustrato limitante del crecimiento en disolución, masa/unidad de volumen

K_s = constante de afinidad, concentración del sustrato existente: masa/unidad de volumen

En nuestro caso, el modelo utilizado para las cinéticas de degradación de fenoles fue el de Haldane (ecuación IV.1.2), que tiene en cuenta la inhibición del sustrato.

(IV.1.2)

$$\mu = \frac{\mu_{max} S}{K_s + S + \left(\frac{S^2}{K_i} \right)}$$

donde:

μ = tasa de crecimiento, h⁻¹

μ_{max} = tasa de crecimiento máxima de la biomasa en la ausencia de inhibidores, h⁻¹

S = concentración del sustrato, mg/l

K_s = constante de afinidad o de saturación, mg/l

K_i = constante de inhibición de Haldane, mg/l

Las variaciones del sustrato con respecto al tiempo están dadas por la ecuación IV.1.3:
(IV.1.3)

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{\mu}{Y_{\text{obs}}} X_v$$

donde:

X_v = concentración de la biomasa viable, mg/l.
 Y_{obs} = tasa de conversión, mg de biomasa/mg de sustrato.

Si consideramos Y_{obs} constante durante los ciclos de la biodegradación nosotros obtenemos:

(IV.1.4)

$$Y_{\text{obs}} = \frac{X_v - X_{\text{ov}}}{S_0 - S}$$

entonces:

$$X_v = Y_{\text{obs}} (S_0 - S) + X_{\text{ov}}$$

Combinando las ecuaciones (IV.1.1, 3 y 4) nosotros obtenemos las relaciones que muestran la velocidad de eliminación del sustrato en el medio (ecuaciones IV.1.5-7):

(IV.1.5)

$$-\frac{ds}{dt} = \frac{1}{Y} \frac{dx}{dt} = Y = -\frac{dx/dt}{ds/dt}$$

(IV.1.6)

$$-\frac{dx}{dt} = \mu_{\text{max}} \frac{S}{S + K_s + S^2/K_i}$$

(IV.1.7)

$$-\frac{ds}{dt} = q_{\text{max}} = \frac{S}{S + K_s + S^2/K_i}$$

A fin de evaluar las constantes biocinéticas de μ_{max} , K_s y K_i , se utilizó un programa en turbo Pascal IV. Este programa realiza, dentro de la primer subrutina la integración numérica de la ecuación del modelo de Haldane con la ayuda del método numérico de Runge-Kutta de 4 grado. Dentro de la subrutina siguiente los coeficientes biocinéticos son estimados por el método de Hooke y Jeeves. El conjunto de coeficientes se obtiene por la minimización de la suma de residuos al cuadrado (SRC). Los parámetros iniciales introducidos por el cálculo son: la tasa de conversión, Y_{obs} y la concentración de biomasa viable X_{ov} (Buitrón, 1993).

IV.2 Determinación de la población bacteriana responsable de la degradación de los compuestos fenólicos

Se determinó las poblaciones de bacterias responsables de la degradación de los fenoles, después de 120 d de operación del reactor, con ciclos de dos días, a una concentración de 40 mg/l de la mezcla de fenoles. Se aislaron e identificaron cuatro cepas de bacterias (tabla IV.2.1) provenientes de los lodos activados aclimatados. Con objeto de caracterizarlas se realizaron cinéticas de degradación a 40 mg/l de la mezcla de los fenoles para cada una de ellas. Las concentraciones de los fenoles durante las cinéticas de degradación se determinaron mediante un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC). También, se determinaron cloruros, COT, SSV y la CHP. Los resultados de la degradación del COT del periodo de aclimatación (120 días) se muestran en la fig. IV.2.1. Durante este periodo la eficiencia de degradación fue del 50 % .

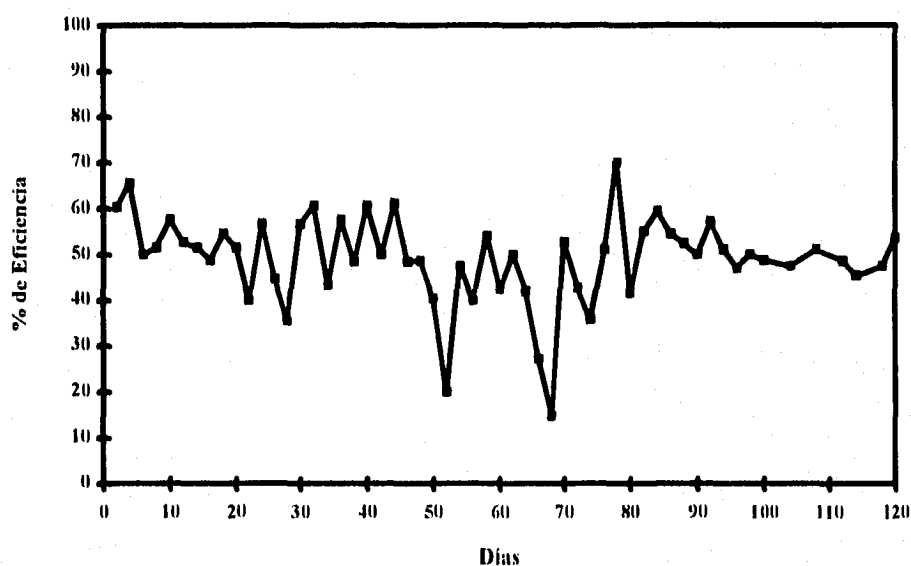


Figura IV.2.1 Eficiencia de degradación del COT

Tabla IV.2.1 Identificación de bacterias (API 20E) Gram negativas aclimatadas a la degradación de fenoles.

Bacterias aclimatadas	Porcentajes de identificación
<i>Chryseomonas luteola</i>	Buena identificación 99.9 % ; T= 0.80
<i>Aeromonas</i> sp.	Buena identificación 88 % ; T= 0.77
<i>Pseudomonas</i> sp.	Aceptable identificación 85 % ; T= 0.72
<i>Flavimonas oryzihabitans</i>	Buena identificación 91.4 % ; T= 0.78

El consorcio de microorganismos formado por las cuatro cepas aisladas estuvo distribuido de la siguiente manera: *Chryseomonas luteola* : 20 %, *Aeromonas* sp. : 20 %, *Pseudomonas* sp. : 25 %, *Flavimonas oryzihabitans* 25 % y 10 % de micobacterias.

IV.3 Cinéticas de degradación del proceso de lodos activados aclimatados a fenoles

Como resultado de los estudios cinéticos practicados sobre los lodos activados aclimatados (LAA), se encontró que la degradación de los fenoles fue secuencial: el fenol y el 4-CF fueron los primeros en ser degradados, seguidos del 2,4-DCF y finalmente el 2,4,6-TCF (fig. IV.3.1). La estructura del 2,4,6-TCF es más compleja que la de los otros fenoles por lo cuál es la última en ser biodegradada. El modelo que presentó los LAA es de orden cero para los fenoles.

La biodegradación de los fenoles por el consorcio de los LAA depende de varios factores entre los que se encuentran: 1) la estructura del compuesto fenólico, el número y la posición del sustituyente, la forma de la molécula, su carga eléctrica, su tamaño, la naturaleza de sus enlaces químicos, su hidrofobicidad y también la capacidad del sustrato de inducir o reprimir la síntesis de enzimas o de inhibir éstas; 2) el modo de operación del reactor como el tiempo de retención hidráulico; 3) factores abióticos como volatilización, adsorción entre otros y 4) la presencia o ausencia de las poblaciones mixtas apropiadas.

Buitrón (1993) realizó estudios sobre la volatilización de fenoles en un proceso aerobio. Las concentraciones de fenoles que utilizó fueron de 100 a 1000 mg de fenol/l y de 50 a 400 mg de 4-CF/l. La aireación se mantuvo constante a 60 l/h dentro del reactor. La lectura de la condensación del gas se realizó por 24-48 h de aireación en el reactor. Para las concentraciones del fenol, el porcentaje por volatilización fue del 0.006 % total dentro del reactor. En el caso del 4-CF fue de 0.0054 % total. Por otro lado, determinó las isothermas de adsorción para diferentes concentraciones de biomasa en contacto del 4-CF, a una temperatura constante de 25 °C y con un tiempo de exposición de 4 horas. La constante energética obtenida fue de 4.15 ± 1.04 mg de 4-CF/g de SSV y la cantidad máxima del 4-CF adsorbida por la biomasa representó el 2.6 % total. En conclusión para los resultados de este trabajo, nos indican que la eliminación por factores abióticos como son la volatilización y adsorción de compuestos fenólicos es mínima. La biodegradación es el proceso principal de la eliminación de los compuestos fenólicos.

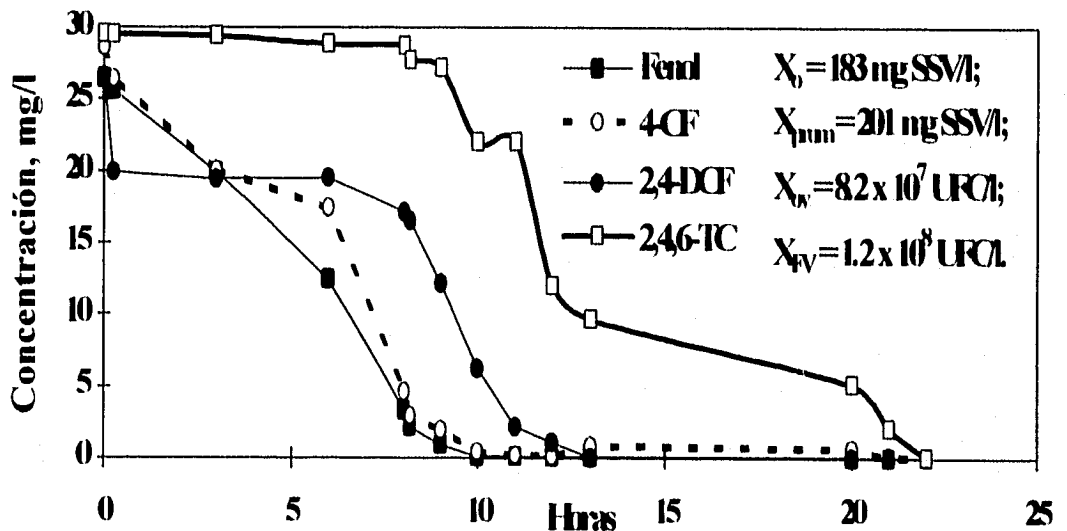


Figura IV.31 Patrones de degradación de los fenoles por los lodos activados adimantados

La biodegradación del fenol comienza en la primera hora de la cinética, por ser el compuesto que presenta la estructura menos compleja y más fácilmente biodegradable por las bacterias. Se aplicó el modelo de Haldane para cada compuesto fenólico (fenol, 4-CF y 2,4-DCF) utilizado en la cinética de degradación de los LAA. Este modelo no se aplicó para el 2,4,6-TCF por que no presenta una tendencia clara de biodegradación, ya que únicamente el modelo toma en cuenta la parte degradada observada en la cinética. Las figuras IV.3.2, IV.3.3 y IV.3.4, muestran los modelos de Haldane y los coeficientes biocinéticos obtenidos para el fenol, 4-CF y 2,4-DCF respectivamente (anexos 1, 2 y 3).

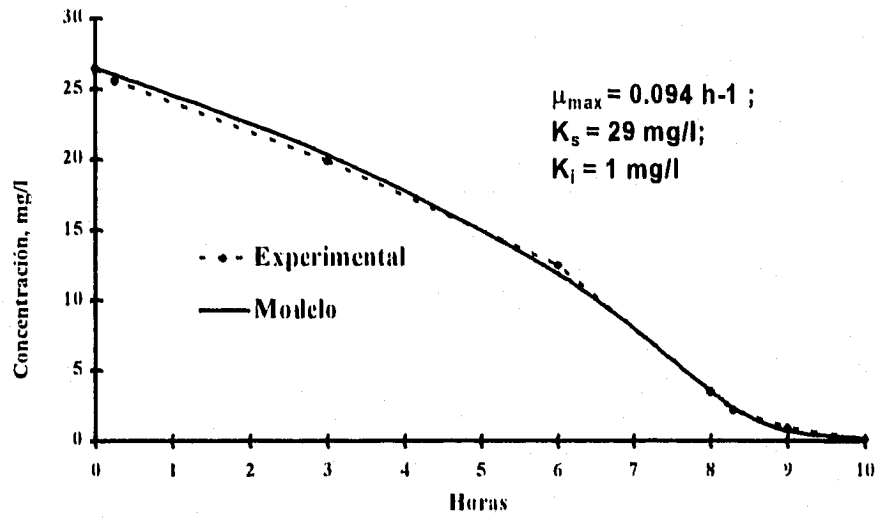


Figura IV.3.2 Cinética de degradación del fenol por lodos activados aclimatados

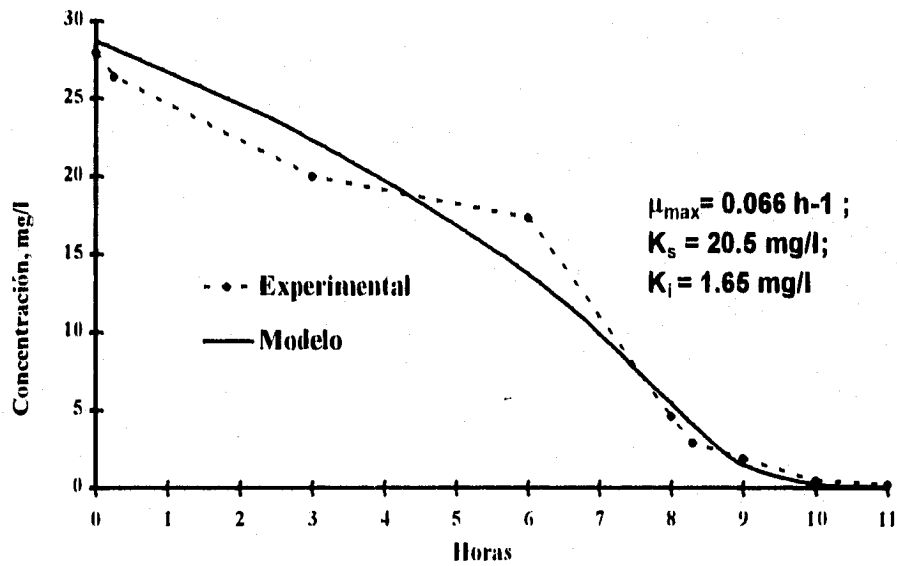


Figura IV.3.3 Cinética de degradación del 4-CF por los lodos activados aclimatados

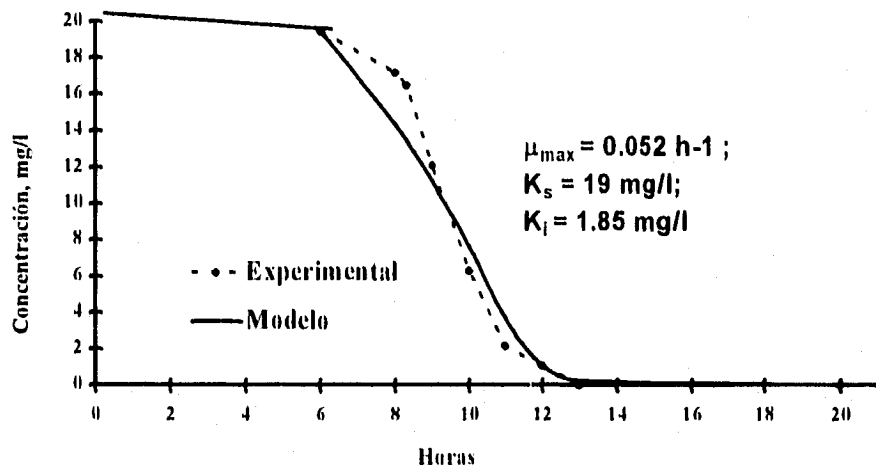


Figura IV.3.4 Cinética de degradación del 2,4-DCF por lodos activados aclimatados

En la tabla IV.3.1 se muestran los coeficientes biocinéticos de LAA obtenidos del modelo de Haldane para la degradación del fenol, 4-CF y 2,4-DCF. La tasa de crecimiento expresada como el coeficiente μ_{\max} , disminuye al aumentar la toxicidad del compuesto para el 4-CF y 2,4-DCF. En la figura IV.3.5 se muestra el modelo de Haldane obtenido para el COT durante la cinética de degradación de los LAA (anexo 4).

Tabla IV.3.1 Coeficientes biocinéticos de la degradación de los fenoles para lodos activados aclimatados, 40 mg/l de fenoles.

Lodos activados aclimatados	μ_{\max} h^{-1}	K_s mg/l	K_i mg/l	X_0 mg SSV/l	Y_{prom} $\text{mg SSV/mg de mezcla de fenoles}$	X_{FV} UFC/l
Fenol	0.094	29.37	1	183	0.33	1.2×10^8
4-Clorofenol	0.066	20.5	1.65	183	0.33	1.2×10^8
2,4-Diclorofenol	0.052	19	1.85	183	0.33	1.2×10^8

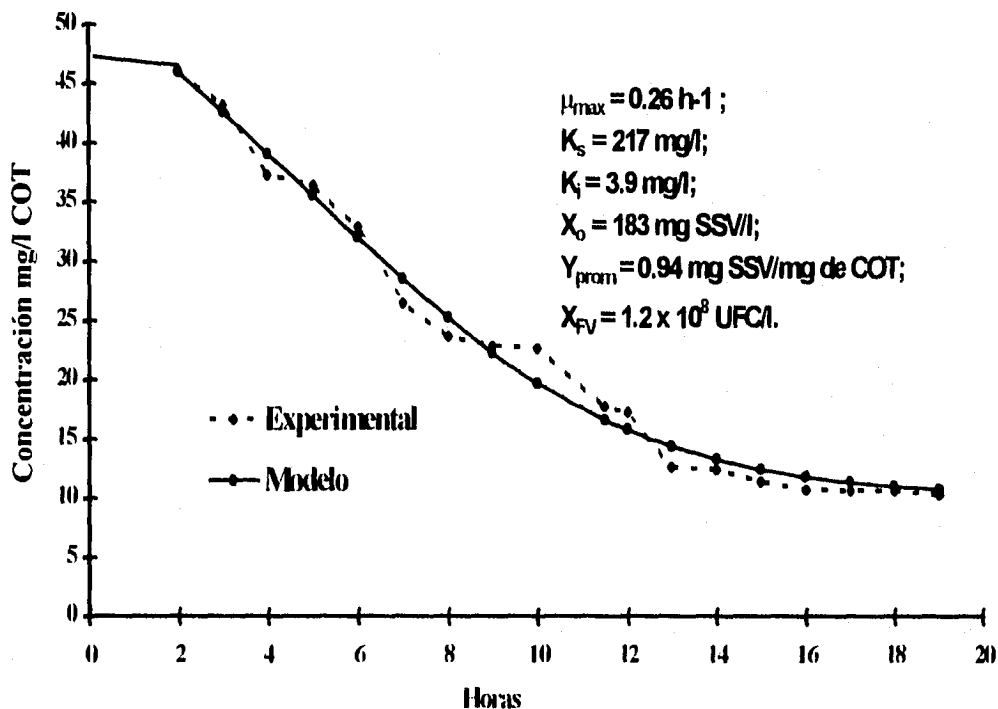


Figura IV.3.5 Modelo de Haldane para el COT obtenido por los lodos activados aclimatados

Los resultados obtenidos en la degradación de clorofenoles por los LAA son semejantes a los logrados por Puhakka *et al.* (1992), quienes obtuvieron altas eficiencias de eliminación para clorofenoles en un reactor aerobio-anóxico con $217 \text{ g/m}^3/\text{d}$ en un tiempo de retención hidráulico de 5 h. Reportan para reactores con biopelícula la degradación sucesiva de mono, dicloro y policlorofenoles como la única fuente de carbón y energía. Las eficiencias de eliminación obtenidas fueron del 99 % en la biodegradación de clorofenoles.

Durante la cinética de degradación para LAA se presentó un aumento en la concentración de la biomasa ($X_{OV} = 8.2 \times 10^7 \text{ UFC/l}$), se establece la presencia de poblaciones mixtas capaces de degradar los compuestos fenólicos y que en condiciones apropiadas incrementan su número lo que se refleja en la biodegradación del sustrato orgánico.

Los estudios cinéticos, practicados sobre cada una de las cepas aisladas del consorcio de lodos activados, demostraron que el consorcio fue más eficiente que cada una de las cepas por separado. En la figura IV.3.6 se muestra la cinética de degradación por parte de *Chryseomonas luteola*, la cual no presentó una clara degradación de los fenoles.

La reacción que presentó *C. luteola* es un modelo de orden cero para los fenoles y COT (fig. IV.3.7). La utilización del modelo de Haldane se limita a cultivos aclimatados y únicamente toma en cuenta la parte degradada de la cinética, por esta razón no se aplicó éste modelo para los fenoles y COT de la cinética de *C. luteola*.

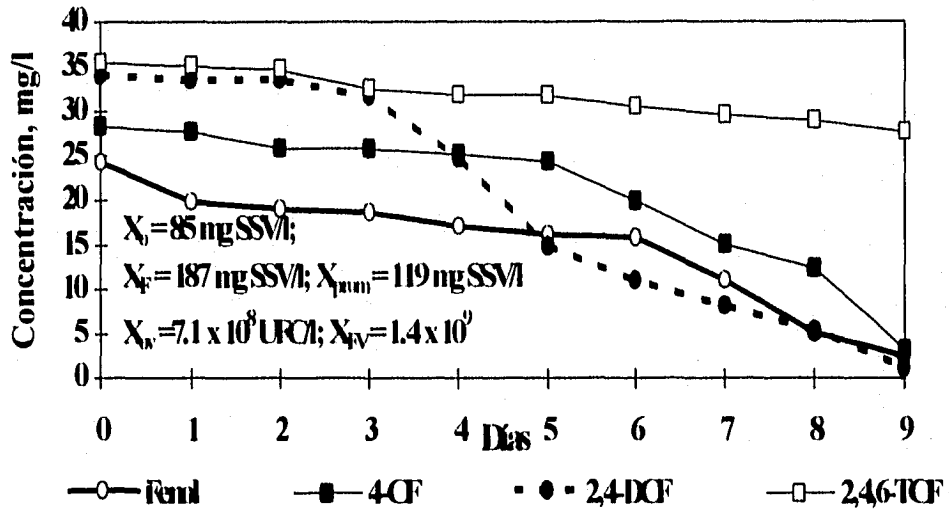


Figura IV.3.6 Patrones de degradación de los fenoles por *Chryseomonas luteola*

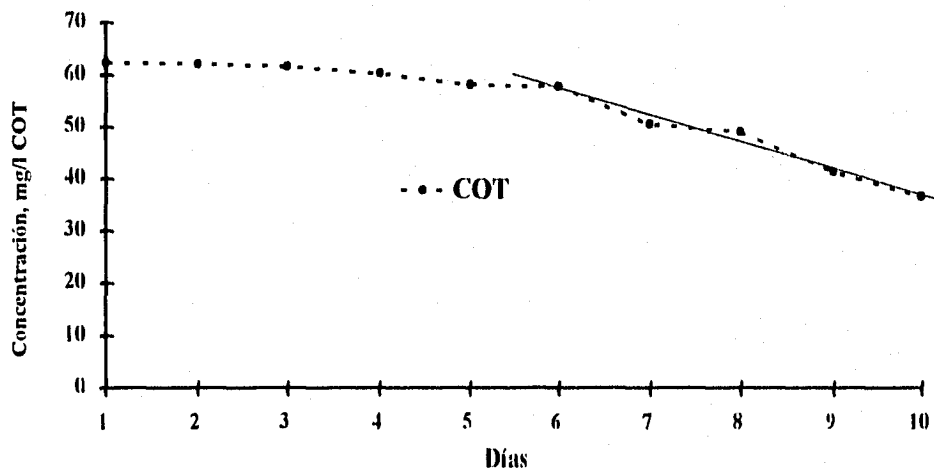


Figura IV.3.7 Cinética de degradación del COT por *Chryseomonas luteola*, modelo de orden cero

El estudio cinético practicado para *Aeromonas* sp. muestran la obtención de modelos de orden cero para el COT y los fenoles. En la figura IV.3.8 se muestra la cinética de degradación de fenoles por *Aeromonas* sp.

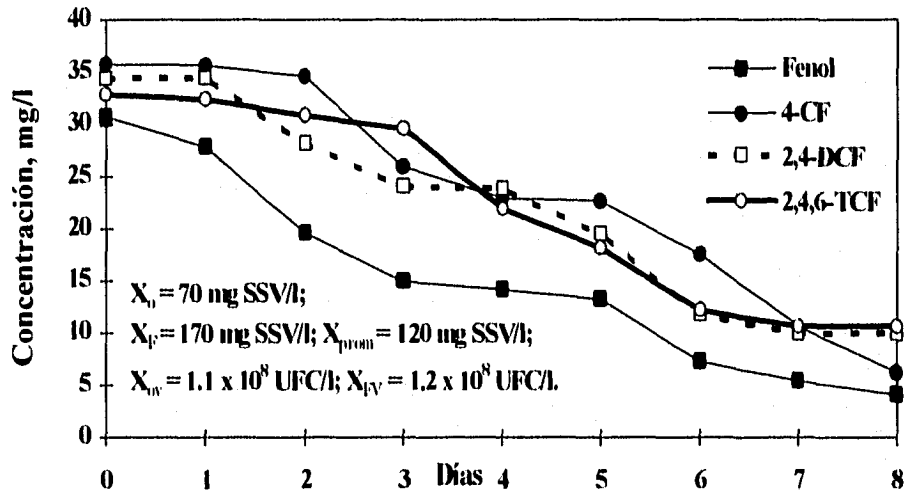


Figura IV.3.8 Patrones de degradación de los fenoles por *Aeromonas* sp.

En la figura IV.3.9 se muestra el modelo de Haldane para el COT por *Aeromonas* sp., y los coeficientes biocinéticos obtenidos (anexo 5).

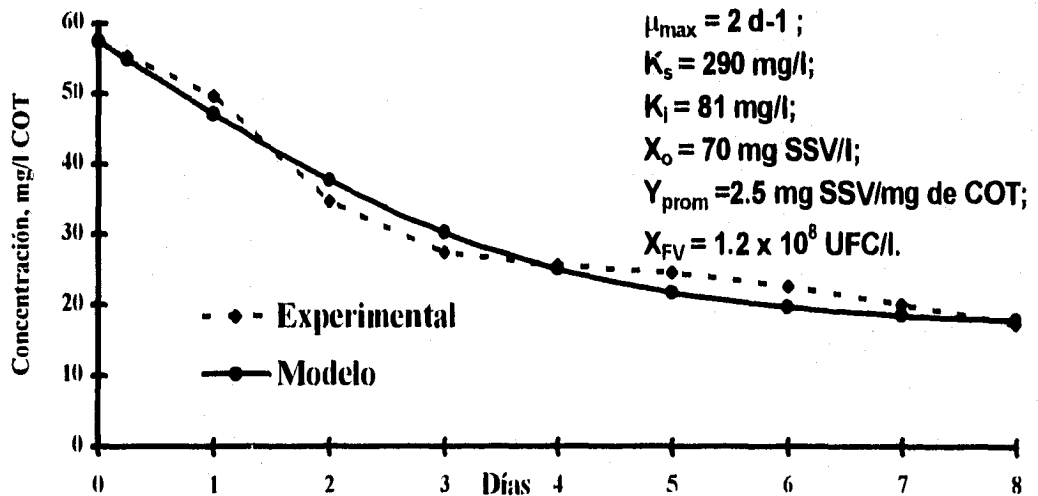


Figura IV.3.9 Modelo de Haldane para el COT obtenido por *Aeromonas* sp.

El resultado de la cinética de degradación por *Pseudomonas* sp. de los fenoles se muestran en la figura IV.3.10. La reacción que se presentan las fenoles y el COT es un modelo de orden cero. En la figura IV.3.11 se muestra el modelo de Haldane para el COT obtenido por *Pseudomonas* sp. y los coeficientes biocinéticos (anexo 6).

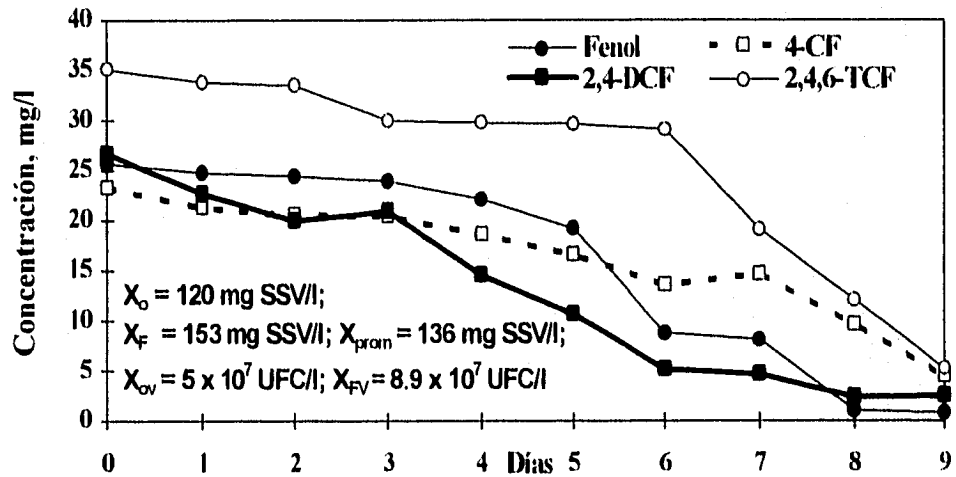


Figura IV.3.10 Patrones de degradación de los fenoles por *Pseudomonas* sp.

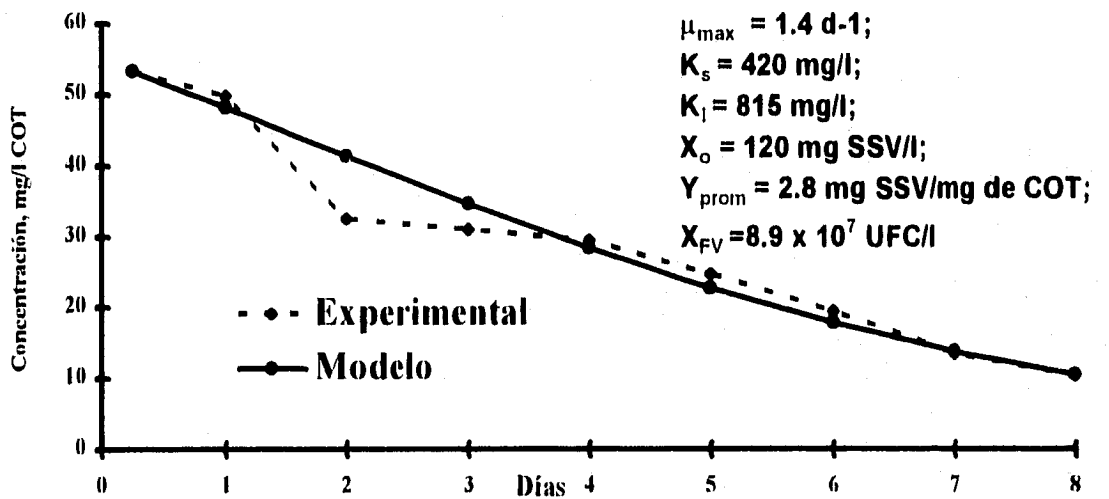


Figura IV.3.11 Modelo de Haldane para el COT obtenido por *Pseudomonas* sp.

El género de *Pseudomonas* sp. es la bacteria aerobia con la que se han hecho estudios de degradación de compuestos orgánicos. Puhakka *et al.* (1995) describen una proporción del 99 % para *Pseudomonas saccharophila*, a partir de la operación por dos años de un reactor de lecho fluidizado. El reactor fue alimentado con una mezcla de clorofenoles: fenol, 2,4,6-triclorofenol, 2,3,4,6-tetraclorofenol y pentaclorofenol como la única fuente de carbón y energía del sistema. Para el aislamiento se utilizó un medio de cultivo compuesto por triptona (0.5 g/l), extracto de levadura (0.25 g/l), glucosa (0.1g/l) y agar (15 g/l) con un suplemento de 10 mg/l de 2,3,4,6-tetraclorofenol ó pentaclorofenol. La identificación de esta especie se realizó por medio del método de ácidos grasos. El estudio presenta las características de los cultivos aerobios de biopelícula, para altas tasas de degradación de fenoles policlorados de 1500 g de clorofenoles/m³ por día.

La cinética de degradación de fenoles para *Flavimonas oryzihabitans* se muestran en la fig. IV.3.12. Se presenta modelos de orden cero para los fenoles y COT. La figura IV.3.13 muestra el modelo de Haldane para la cinética de degradación del COT por *F. oryzihabitans* y los coeficientes biocinéticos (anexo 7).

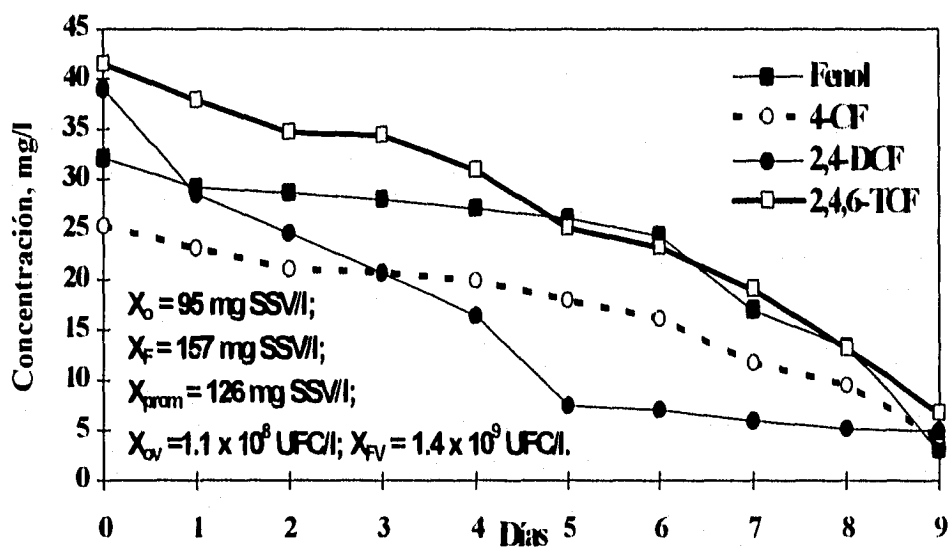


Figura IV.3.12 Patrones de degradación de los fenoles por *Flavimonas oryzihabitans*

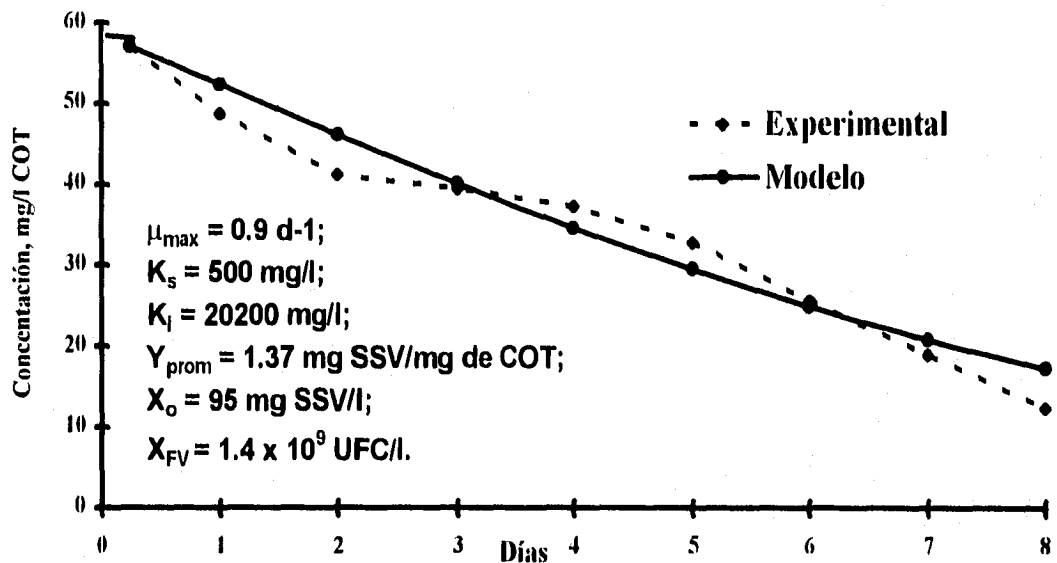


Figura IV.3.13 Modelo de Haldane para el COT obtenido por *Flaviomonas oryzihabitans*

Los resultados de las cinéticas de degradación para los LAA y las cepas puras se muestran en la tabla IV.3.2. La degradación del COT muestra que los coeficientes biocinéticos para los LAA son mejores en comparación con los coeficientes obtenidos para las cepas puras, μ_{\max} es 3 veces mayor que para la más eficiente de las cepas puras (*Aeromonas* sp.).

Tabla IV.3.2 Coeficientes biocinéticos obtenidos de las cinéticas de degradación del COT, con 40 mg/l de la mezcla de clorofenoles.

Consorcio microbiano	μ_{\max} d ⁻¹	K_s , mg/l	K_i , mg/l	X_o mgSSV/l	Y_{prom} mgSSV/mgCOT	X_{FV} UFC/l
Lodos activados aclimatados	6.2	217	3.9	183	0.94	1.2×10^8
<i>Aeromonas</i> sp.	2	290	81	70	2.5	1.2×10^8
<i>Pseudomonas</i> sp.	1.4	420	815	120	2.8	8.9×10^7
<i>Flaviomonas oryzihabitans</i>	0.9	500	20200	95	1.37	1.4×10^9

En general, la utilización simultánea de sustratos orgánicos en cultivos mixtos presenta eficientes tasas de eliminación, un crecimiento de microorganismos y la degradación del COT como única fuente de energía, atribuido a la alta producción de niveles de actividad catabólica de los microorganismos (Klecka y Maier, 1988).

En la figura IV.3.14 se muestran los resultados de cloruros libres durante las cinéticas de degradación a 40 mg/l de la mezcla de fenoles. Para las cepas de *Flaviomonas* y *Pseudomonas* presentaron la mayor concentración de cloruros libres, relacionados con la degradación del COT y de los fenoles.

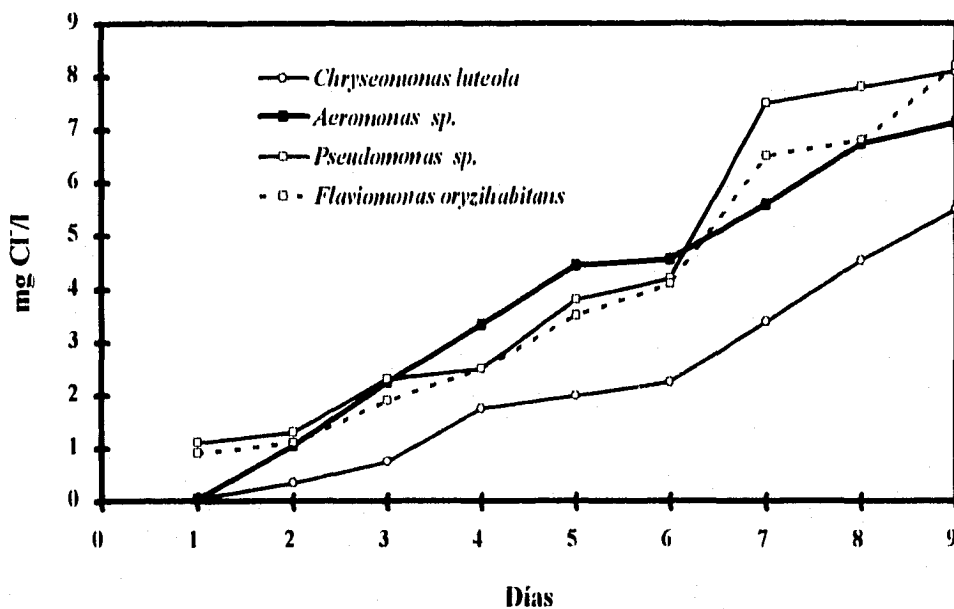


Figura IV.3.14 Determinación de cloruros

Los estudios cinéticos practicados sobre los LAA y cada una de las cepas aisladas del consorcio de los lodos activados demostraron que las tasas máximas de degradación fueron los de LAA. *Chryseomonas luteola* no presentó una biodegradación para los compuestos fenólicos del 2,4-DCF y el 2,4,6-TCF. En la tabla IV.3.3 se muestran las tasas máximas específicas para los compuestos fenólicos para los consorcios microbianos aclimatados a fenoles.

Tabla IV.3.3 Tasas de eliminación de sustrato obtenidas para los compuestos fenólicos.

$Q_v = \text{mg/l/d}$				
	Fenol	4-CF	2,4-DCF	2,4,6-TCF
Lodos activados aclimatados	82	158	123	92
<i>Chryseomonas luteola</i>	5	5	3	1
<i>Aeromonas</i> sp.	6	6	4	6
<i>Pseudomonas</i> sp.	3	5	5	8
<i>Flaviomonas oryzihabitans</i>	6	4	5	6
Lodos activados no aclimatados	3.5	3.5	1.5	0.5

$Q_x = \text{mg/g SSV/d}$				
	Fenol	4-CF	2,4-DCF	2,4,6-TCF
Lodos activados aclimatados	407	784	610	457
<i>Chryseomonas luteola</i>	39	39	26	8
<i>Aeromonas</i> sp.	54	47	33	47
<i>Pseudomonas</i> sp.	19	37	38	58
<i>Flaviomonas oryzihabitans</i>	44	30	40	44

$Q_x = \text{mg de fenoles/UFC/d/10}^{-9}$				
	Fenol	4-CF	2,4-DCF	2,4,6-TCF
Lodos activados aclimatados	820	1530	1235	920
<i>Chryseomonas luteola</i>	6.5	6.6	4.4	1.4
<i>Aeromonas</i> sp.	61	47.6	38.6	53
<i>Pseudomonas</i> sp.	86.3	101	101	156
<i>Flaviomonas oryzihabitans</i>	49	34	45	44

Los estudios cinéticos mostraron que las tasas de degradación fueron superiores para el caso de los lodos activados que para las cepas puras, para degradar la misma cantidad de sustrato (40 mg/l) y con concentraciones similares de biomasa viable. El consorcio de lodos activados degradó los fenoles en 25 h, mientras que cada una de las cepas puras lo hizo en 9 d. En la tabla IV.3.4 se muestran los coeficientes biocinéticos para el fenol, 4-CF, 2,4-DCF y 2,4,6-TCF utilizando diferentes consorcios microbianos para su biodegradación. Como se muestra en la tabla los coeficientes biocinéticos obtenidos para cepas puras y consorcios de microorganismos son semejantes entre sí, sin embargo las ventajas que presentan los consorcios mixtos de microorganismos son particularmente importantes cuando se busca la completa mineralización (hasta CO_2) de los tóxicos orgánicos.

Tabla IV.3.4 Coeficientes biocinéticos para fenoles utilizando diferentes consorcios microbianos.

μ_{max} h^{-1}	K_s mg/l	K_i mg/l	Y_{obs} mg/mg	Autores	Consortio microbiano
Fenol					
0.16-1.01	10-160	14-661	0.545	Pawloswski y Howell (1973)	Sistema sin filamentosas
0.20-0.60	2-86	34-1564	0.616	""	Sistema con filamentosas
0.13-0.36	5-266	142-1199	---	D'Adamo <i>et al.</i> (1984)	Filamentosas pero no predominantes
0.18-0.20	35-62	62-175	1.020	Rozich y Gaudy (1983)	Lodos activados aclimatados
0.50-1.80	0.5-1.6	7.1-14.2	---	Sokol (1988)	
0.12	5.3	377	0.550	Kotturi <i>et al.</i> (1991)	<i>Pseudomonas putida</i> (30 °C)
0.39	1.06	903	0.780	Hutchinson y Robinson (1988)	<i>Pseudomonas putida</i> (10 °C)
0.17-0.37	---	---	0.15-0.28	Lallai <i>et al.</i> (1988)	<i>Pseudomonas putida</i>
0.18-0.47	2, 4-3, 4	---	0.03-0.48	Cooper-B <i>et al.</i> (1990)	Biomasa comercial
0.11-0.33	8, 2-8, 9	170-200	0.805	Okaygun y Akgerman (1992)	Lodos activados aclimatados
4-Clorofenol					
0.16-0.20	100-600	---	---	Templeton y Grady (1988)	Lodos activados aclimatados
0.29-0.77	12-26	1; 1-1.7	---	Gaudy <i>et al.</i> (1988)	Lodos activados aclimatados
0.25-0.29	2, 6-7, 6	48-114	0.31-0.41	Cooper-B <i>et al.</i> (1990)	Lodos activados aclimatados
1.358	126	4	0.39	Kennedy <i>et al.</i> (1990)	<i>Arthrobacter sp.</i> (29 °C)
2,4-Diclorofenol					
0.024	80	345	0.14	Klecka y Maier (1988)	Lodos activados aclimatados
2,4,6-Triclorofenol					
0.038	160	5675	---	Klecka y Maier (1988)	Lodos activados aclimatados

Uno de los aspectos importantes en la utilización de cultivos mixtos y comunidades de microorganismos para la biodegradación de compuestos xenobióticos, son las interacciones entre diferentes especies con respecto a la capacidad degradativa, acerca de los compuestos químicos tóxicos. La información generada al respecto es importante para establecer la secuencias de reacciones catabólicas de compuestos tóxicos para facilitar la biodegradación de compuestos xenobióticos.

Muchos estudios con cepas puras han sido probados con resultados positivos para la degradación de un sustrato específico. Sin embargo, el empleo de cepas puras principalmente de bacterias y hongos han mostrado que algunos intermediarios tóxicos se acumulan durante la biodegradación debido a que un sólo organismo no posee la habilidad para mineralizar completamente el xenobiótico (Westmeier y Rehum, 1987).

La biodegradación de varios compuestos ha sido investigada en sistemas en lote con biomasa suspendida como los trabajos de Fan *et al.* (1987) y Sokol (1988). La combinación de ciertos sustratos como las mezclas de fenoles causan efectos de auto inhibición, aunque junto al efecto de inhibición, muestran un crecimiento los consorcios mixtos expuestos a clorofenoles.

IV.4 Aislamiento de micobacterias

Hägglom *et al.* (1988) aislaron de aguas residuales de la industria del papel a *Rhodococcus* sp., y *Mycobacterium* sp. A estas micobacterias las colocaron en dos columnas empacadas. Las pruebas demostraron que las micobacterias fueron capaces de degradar compuestos fenólicos.

Kamala *et al.* (1994) evalúan los procedimientos existentes y medios de cultivo empleados para el aislamiento de micobacterias de agua y suelo. El método para aislamiento de micobacterias que resultó más eficiente fue el descrito por Engbaek *et al.* (1967), el cual se basa en la utilización de lauril sulfato de sodio al 3 % (LSS) combinado con 1 % de NaOH. Este método es eficiente para obtener un mayor número de especies de micobacterias y por la utilización de un agente descontaminante (LSS) para limpiar las muestras de otras especies de bacterias y hongos que se desarrollan en el medio.

El aislamiento de micobacterias se realizó a partir de los lodos activados aclimatados a 40 mg/l de fenoles después de 120 días de operación del reactor. El inóculo fue de la planta de tratamiento de aguas residuales de Ecatepec, Estado de México. El método de aislamiento que se utilizó fue el de Kamala *et al.* (1994) con el medio de cultivo de Lowenstein modificado por Jensen. Los resultados de las características morfológicas del crecimiento de colonias de *Mycobacterium* sp. sobre el medio de cultivo fueron las siguientes: forma ameboide, bordes ondulados, elevación rugosa y color amarillo-naranja. La incubación duró 4 semanas a una temperatura constante de 35°C.

Para el crecimiento y desarrollo de micobacterias se necesita un medio de cultivo enriquecido especial. El uso del medio de cultivo Lowenstein modificado por Jensen, contiene una base de huevo para aislamiento primario de los géneros de *Mycobacterium* sp. este medio de cultivo presenta dos ventajas:

- 1.- El medio Lowenstein soporta una amplia variedad de micobacterias.
- 2.- El crecimiento de micobacterias en huevo es satisfactorio para la prueba de niacina.

La modificación de Jensen al medio de Lowenstein emplea una concentración moderada de verde de malaquita para evitar el crecimiento de la mayoría de contaminantes, a la vez que satisface los requerimientos metabólicos de las micobacterias, para su posible y rápido crecimiento. Este medio de cultivo con huevo coagulado es empleado para el aislamiento de *Mycobacterium tuberculosis* (el bacilo de la tuberculosis) y *Mycobacterium kansasii* en depósitos de agua (Engel *et al.* 1980).

La continuación del estudio sobre las poblaciones de micobacterias no pudo ser finalizada ya que se requiere un laboratorio especial (Nivel II de seguridad biológica) para poder aumentar la concentración de biomasa viable de micobacterias en condiciones controladas de seguridad y poder realizar los estudios cinéticos de degradación que comprueben su capacidad de biodegradación de compuestos fenólicos.

CONCLUSIONES

En este trabajo se describió cualitativamente la dinámica de poblaciones del proceso de lodos activados durante el periodo de aclimatación a una mezcla en partes iguales de: fenol, 4-clorofenol, 2,4-diclorofenol y 2,4,6-triclorofenol para una concentración de 40 mg de fenoles totales/l. Se estableció una técnica para cuantificar e identificar bacterias aerobias aclimatadas a compuestos fenólicos y se estudió las cinéticas de degradación de las bacterias responsables de la degradación de compuestos fenólicos.

El medio de cultivo seleccionado para realizar las CHP y aislamientos de bacterias aerobias aclimatadas a fenoles fue el de peptona de caseína adicionado con 0.1 mg/l de la mezcla de fenoles. La peptona de caseína presentó las mayores CHP (13.7×10^5 UFC/ml) y la mayor diversidad de colonias.

El periodo de aclimatación a fenoles se estableció a los 63 días (15 ciclos) de operación del reactor. La mezcla de los fenoles produjo alteraciones sobre la morfología del flóculo, en cuanto al color, tamaño, apariencia y tipo de agregaciones de microorganismos que lo constituyen.

La dinámica de poblaciones de los lodos activados ocurrida durante el periodo de aclimatación a 40 mg/l de la mezcla de fenoles, se caracterizó por presentar una disminución en las poblaciones de bacterias, hongos, algas, nemátodos, protozoarios y rotíferos. Las poblaciones de protozoarios y rotíferos se observó hasta el día 63 de operación del reactor, representadas por *Vorticella convallaria* y *Proales* sp. respectivamente. Los diferentes géneros de vorticelados al final del periodo de aclimatación a fenoles, indica que la población bacteriana fue lo suficientemente abundante para satisfacer las necesidades alimenticias y mantener vivos a los ciliados durante este periodo. La presencia del depredador *Proales* sp. indica que la cadena alimenticia de los lodos activados se mantuvo hasta final del periodo de aclimatación. Las diversas poblaciones de microorganismos que constituyen los lodos activados fueron afectadas por la presencia del compuesto orgánico tóxico. Estas poblaciones reaccionan de manera diferente dependiendo de su capacidad metabólica para lograr su permanencia dentro del sistema y de las interacciones entre los demás microorganismos del proceso de lodos activados.

En este estudio la biodegradación de los compuestos fenólicos se efectuó como la mineralización hasta CO_2 y agua. Los porcentajes de degradación de los clorofenoles fueron superiores al 55 %. La eliminación de fenoles por factores abióticos como son la volatilización y adsorción es mínima, la biodegradación fue el proceso principal de la eliminación de los compuestos fenólicos.

A partir de los lodos activados aclimatados a 40 mg/l de fenoles, después de 120 días de operación del reactor, se identificaron cuatro géneros de bacterias Gram negativas: *Aeromonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Flavimonas oryzihabitans* y *Chriseomonas luteola*. También, se logró el aislamiento de micobacterias. Sin embargo, la continuación del estudio sobre las poblaciones de micobacterias no pudo ser finalizada ya que se requiere un laboratorio especial para poder aumentar la concentración de biomasa viable de micobacterias en condiciones controladas de seguridad y poder realizar los estudios cinéticos de degradación que comprueben su capacidad de biodegradación de compuestos fenólicos.

Como resultado de los estudios cinéticos practicados sobre los lodos activados, se encontró que la degradación de los fenoles fue secuencial: el fenol y el 4-CF fueron los primeros en ser degradados por presentar una estructura menos compleja y más fácilmente biodegradable por las bacterias, seguidos del 2,4-DCF y finalmente 2,4,6-TCF.

Los estudios cinéticos practicados sobre cada una de las cepas aisladas del consorcio de lodos activados, demostraron que éstos últimos fueron más eficientes que cada una de las cepas por separado. Las tasas de degradación fueron dos ordenes de magnitud más grandes para el caso de los lodos activados que para las cepas puras. Para degradar la misma cantidad de sustrato, y con concentraciones similares de biomasa viable, el consorcio degradó los fenoles en 25 horas, mientras que cada una de las cepas puras lo hizo en 9 días.

Los resultados obtenidos apoyan la hipótesis del trabajo de un consorcio de microorganismos iniciales, que al verse sometidos al proceso de aclimatación, varía en cuanto al tipo de microorganismos de tal modo que únicamente los microorganismos capaces de degradar los tóxicos permanecerán.

Este trabajo sirve para conocer el sistema de lodos activados desde un punto de vista biológico que muestra la importancia de las interacciones entre las diferentes poblaciones que constituyen los lodos activados. Las técnicas de observaciones microscópicas de la microfauna del proceso de lodos activados sirven para poder establecer las condiciones de operación del sistema.

Se debe comprobar la eficiencia de cada una de las cepas puras y en su conjunto para poder lograr formar los lodos activados aclimatados y poder así ratificar los resultados obtenidos por el consorcio de los lodos activados aclimatados.

Estos resultados remarcan la importancia de la utilización de consorcios microbianos para la degradación de efluentes conteniendo compuestos tóxicos ó xenobióticos.

Bibliografía

- Anselmo, A., Cabral, J. y Novais, J. (1989). The adsorption of *Fusarium flocciferum* spores on particles and their use in the degradation of phenol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **(31)**: 200-203.
- Anselmo, A. y Novais, J. (1991). Biological treatment of phenolic wastes: comparison between free and immobilized cell systems. *Int. Symp. Environ. Biotechnol.*, **(1)**: 200-203.
- APHA. AWWA. WPC.F. (1992). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. Washington, D. C. **18**: 10-137 pp.
- API (1990). Systeme d'identification des bacilles gram négatif non enterobactéries. **20 NE. Notice technique**, Bio Mérieux, S. A.
- API 20E (1994). *Analytical profile index*. Bio Mérieux, S. A. **3**: 443 pp.
- Armenante, P., Kafkewitz, D., Lewandowski, G. y Kung, C. M. (1992). Integrated anaerobic-aerobic process for the biodegradation of chlorinated aromatic compounds. *Environmental Progress*. **11 (2)**: 113-121.
- Balfanz, J. y Rehm, H. (1991). Biodegradation of 4-chlorophenol by adsorptive immobilized *Alcaligenes* sp A 7-2 in soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **(35)**: 662-668.
- Banerjee, S., Howard, P. H., Rosenberg, A. M., Dombrowski, A. E., Sikka, H. y Tullis, D. L. (1984). Development of a general kinetic model for biodegradation and its application to chlorophenols and related compounds. *Environ. Sci. Technol.* **18**: 416-422.
- Beltrame, P. Luigi, P.B., Carniti, P., Guardione, D. y Lanzetta, C. (1988). Inhibiting action of chlorophenols on biodegradation of phenol and its correlation with structural properties of inhibitors. *Biotechnology and Bioengineering*. **31**: 821-828.
- Blackall, L. (1993). Molecular identification of activated sludge foaming bacteria. *First international Specialized Conference on Microorganisms in Activated Sludge and Biofilm Processes. September 27-28 Paris, Francia*. 39-59.
- Buitrón, G. (1993). Biodégradation de composés xénobiotiques par un procédé discontinu de type SBR. Tesis de Doctorado, Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, Francia. 240 pp.
- Buitrón, G. y Capdeville, B. (1993). Uptake rate and mineralization of hexadecane and naphthalene by a mixed aerobic culture. *Wat. Res.* **27**: 847-853.
- Buitrón, G., Capdeville, B. y Honry, P. (1994). Improvement and control of the microbial activity of a mixed population for degradation of xenobiotic compounds. *Wat. Sci. Tech.* **29 (7)**: 317-329.
- Cardinal, L. y Stenstrom, M. (1994). Enhanced biodegradation of polyaromatic hydrocarbons in the activated sludge process. *Research Journal WPCF*. Vol. **63 (7)**: 950-957.

-
- Comisión Nacional de Ecología, CONADE (1992). Informe Nacional del Ambiente (1989-1991), para la conferencia de las Naciones Unidas sobre medio ambiente y desarrollo. Secretaría de Desarrollo Social, México.
- Cooper-Brown, S., Grady, C. P. y Tabak, H. H. (1990). Biodegradation kinetics of substituted phenolics: demonstration of a protocol based on electrolytic respirometry. *Wat. Res.* (24): 853-861.
- Curds, C. R. (1975). Protozoa. in ecological aspects of used water treatment. *Academic Press*, Londres. 203-268.
- D'Adamo, P. D., Rozich, A. F. y Gaudy, A. F. (1984). Analysis of growth data with inhibitory carbon sources. *Biotechnol. Bioeng.* (26): 397-402.
- Duchene y Cotteux, E. D. (1993). Les éléments les plus significatifs de la microfaune des boues activées. *Cemagref.* 2: 471-477.
- Eckenfelder, W.W. (1982). Gestion des eaux usées urbaines et industrielles. *Technique et Documentation*, Lavoisier, Paris. 135 pp.
- Ehrhard, M. y Rehm, H. (1985). Phenol degradation by microorganisms adsorbed on activated carbon. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (21): 32-36.
- Engbaek, H. C., Vergmann, B. y Weis Bentzon, B. (1967). The sodium lauryl sulphate method in culturing sputum for mycobacteria. *Scand. J. Respir. Dis.* 48: 268-284.
- Engel, H. W. B., Berwald, L. y Havelaar, H. (1980). The occurrence of *Mycobacterium kansasii* in tapwater. *Tubercle.* (61): 21-26.
- Esteban, G. y Tellez, C. (1992). The influence of detergents on the development of ciliate communities in activated sludge. *Wat. Air Soil Pollut.* 61: 185-190.
- Estrella, Ma. R., Brusseau, M., Maier, R., Pepper, J., Wierenga, P. y Miller, R. (1993). Biodegradation, sorption, and transport of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in saturated and unsaturated soils. *Applied and Environmental Microbiology.* 12: 4266-4273.
- Fan, L. S., Fujie, K., Long, T. R. y Tang, W. T. (1987). Characteristic of draft tube gas-liquid-soil fluidized-bed bioreactor with immobilized living cells for phenol degradation. *Biotech. Bioeng.* 30: 498-504.
- Field, J., Jong, E., Feijoo, C. y Bont, J.A.M. (1993). Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. *Trends Biotechnol.* 11: 44-47.
- Gaiek, L. R., Clifford, R., Lange, A. y Weber, S. (1994). The effects of freeze-drying and storage on phenol degradation. *Water Environment Research.* 66 (5): 698-706.
- Gaudy, A. y Gaudy, E. (1981). *Microbiology for Environmental Scientists and Engineers.* McGraw Hill. NY. E.U.A. 236 pp.
- Gaudy, A., Rozich, A. F., Garniewski, S., Morgan, N. R. y Ekambaram, A. (1988). Methodology for utilizing respirometric data to assess biodegradation kinetics. *Proc. 42nd Ind. Waste. Conf.* 5: 573-584.

-
- Gschlöbl, T., Schleypen, P. y Bühl, R. (1993). Systematic training and instruction of technical staff of wastewater treatment plants in bavaria. *First international Specialized Conference on Microorganisms in Activated Sludge and Biofilm Processes. Paris, Francia.* 535-541.
- Hägglblom, M., Nohynek, L., y Salkinoja-Salonen, M. (1988). Degradation and o-methylation of chlorinated phenolic compounds by *Rhodococcus* and *Mycobacterium* strains. *Applied and Environmental Microbiology.* **4**: 3043-3052.
- Haugland, R. A., Schlem, D. J., Lyons, R., Sferra P. R. y Chakrabarty, A. M. (1990). Degradation of the chlorinated phenoxyacetate herbicides 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2,4,5-trichloro-phenoxyacetic acid by pure and mixed bacterial cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **(56)**: 1357-1362.
- Hill, G. A. y Robinson, C. W. (1975). Substrate inhibition Kinetics: phenol degradation by *Pseudomona putida*. *Biotechnol. Bioeng.* **17**: 1599-1601.
- Holmes, B., Willcox, R. y Lapage, S. (1978). Identification of *Enterobacteriaceae* by the API 20E system. *Journal of Clinical Pathology.* **(30)**: 22-30.
- Howard, P., Boethling, R., Jarvis, W., Meylan, W. y Michelenko, E. (1991). *Environmental Degradation Rates.* Lewis Publishers, INC. 725 pp.
- Hutchinson, D. H. y Robinson, C. W. (1988). Kinetics of the simultaneous batch degradation of p-cresol and phenol by *Pseudomonas putida*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **(29)**: 599-604.
- Ibarra, M. y Rodríguez, R. (1993). Biodegradación de compuestos clorofenólicos por *Pseudomona* sp RA2. Biotecnología. *Revista de la sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería A. C.* **(3)**: 119-122.
- Irvine, R. L. y Ketchum, L. H. (1989). Sequencing batch reactors for biological wastewater treatment. *CRC Critical reviews in environmental control.* **(18)**: 225-294.
- Kamala, T., Paramasivan, C., Herbert, D., Venkatesan, P. y Prabhakar, R. (1994). Evaluation of procedures for isolation of nontuberculous micobacteria from soil and water. *Applied and Enviromental Microbiology.* 1021-1024.
- Kavanaugh, R. y Randall, C. W. (1993). Bacterium populations in a biological nutrient removal plant. *First international Specialized Conference on Microorganisms in Activated Sludge and Biofilm Processes.* pags. 29-38.
- Kennedy, M. S., Grammas, J. y Arbuckle, W. B. (1990). Parachlorophenol degradation using bioaugmentation. *Res. J.W.P.C.F.* **(62)**: 227-233.
- Kewelo, H., Heipierper, H. y Rehm, H. (1989). Protection of bacteria against toxicity of phenol by immobilization in calcium alginate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **(31)**: 383-389.
- Kinner, N. E. y Curds, C. R. (1987). Development of protozoan and metazoan communities in rotating biological contactor biofilms. *Wat. Res.* **(21)**: 480-490.
- Klecka, M. G. y Maier, W. (1988). Kinetics of microbial growth on mixtures of pentachlorophenol and chlorinated aromatic compounds. *Biotechnol. Bioeng.* **(31)**: 328-335.

-
- Knoll, G. y Winter, J. (1989). Degradation of phenol via carboxylation to benzoato by defined obligate syntrophic consortium of anaerobic bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **(30)**: 318-324.
- Kottury, G., Robinson, C. W. y Innis, W. C. (1991). Phenol degradation by a psychrotrophic strain of *Pseudomonas putida*. *Appl. Microbiol.* **(34)**: 539-543.
- Kostman, J., Solomon, F. y Fekete, T. (1991). Infections with *Chryseomona luteola* (CDC group VE-1) and *Flavimonas orzihabitans* (CDC group VE-2) in neurosurgical patients. *Journal Reviews of Infections Diseases.* **13 (2)**: 233-236.
- Lallai, A., Mura, G., Miliddi, R. y Mastinu, C. (1988). Effect of pH on growth of mixed cultures in batch reactor. *Biotechnol. Bioeng.* **(31)**: 130-134.
- Lee, J. J., Hunter, H. y Bovee, E. C. (1985). An illustrated guide to the protozoa. Society of Protozoologists, Lawrence, Kansas. 629 pp.
- Lema, J. M., Moreira, M. T., Feijoo, G. y Palma, C. (1995). Producción y empleo de enzimas ligninolíticos para la degradación de compuestos xenobióticos. Fronteras en biotecnología y bioingeniería. *Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería*. (en prensa).
- Lewandoski, G. A. (1990). Batch biodegradation of industrial organic compounds using mixed liquor from different POTWs. *Research Journal WPCF.* **62 (6)**: 803-809.
- Lin, J., Wang, H. y Hickey, R. (1990). Degradation kinetics of pentachlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnol. Bioeng.* **(35)**: 1125-1134.
- Lu, C. J. y Chen, S.J. (1992). The effects of the secondary carbon source on the biodegradation of chlorinated phenols in biofilm reactors. *Wat. Sci. Tech.* **26 (9-11)**: 2113-2116.
- Madoni, P., Ghetti, P. F. y Antonietti, R. (1979). Analisi delle caratteristiche biologiche di un impianto pilota a tamburo rotante. 2. Dinamica di colonizzazione di ciliati e altri gruppi. *Inquinamento.* **(21)**: 49-51.
- Madoni, P. (1994). A sludge biotic index (SBI) for the evaluation of biological performance of activated sludge plants based on the microfauna analysis. *Wat. Res.* **28 (1)**: 67-75.
- Matsui, Y., Yamaguchi, F., Suwa, Y. y Urushigawa, Y. (1994). Growth characteristics of activated sludges acclimated to para-nitrophenol in batch and continuous modes. *Wat. Sci. Tech.* **29 (7)**: 327-333.
- Morsen, A. y Rehm, H. (1987). Degradation of phenol by a mixed culture of *Pseudomona* and *Cryptococcus elinovii* adsorbed on activated carbon. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **(26)**: 283-288.
- Mulder, E. G., Antheunisse, J. y Crombach, J. (1971). Microbial aspects of pollution in the food and dairy industries. *Microbial Aspects of Pollution.* Academic Press, pags. 71-89.
- Okaygun, M. y Akgerman, A. (1992). Microbial dynamics in a continuously stirred tank reactor with 100 % cell recycle. *Res Wat. Environ.* **(64)**: 811-816.
- Papanastasiou, A. C. y Maier, W. J. (1982). Kinetics of biodegradation of 2,4-DCF in the presence of glucose. *Biotechnol. Bioeng.* **(24)**: 2001-2011.
-

-
- Papanastasiou, A. C. y Maier, W. J. (1983). Dynamics of biodegradation of 2,4-DCF in the presence of glucose. *Biotechnol. Bioeng.* (25): 2337-2346.
- Pawlowski, U. y Howell, J. A. (1973). Mixed culture biooxidation of phenol. I determination of kinetics parameters. *Biotechnol. Bioeng.* (15): 889-896.
- Pitter, P. y Chudoba, J. (1990). *Biodegradability of organic substances in the aquatic environment*. CRC Press, Florida. 306 pp.
- Puhakka, A. J., Shieh, W., Järvinen, K. y Melin, E. (1992). Chlorophenol degradation under oxic and anoxic conditions. *Wat. Sci. Tech.* 25 (1): 147-152.
- Puhakka, A. J. y Järvinen, K. (1992). Aerobic fluidized-bed treatment of polychlorinated phenolic wood preservative constituents. *Wat. Sci. Tech.* 26 (6): 765-770.
- Puhakka, A. J., Herwig, R. P., Koro, P. M., Wolfe, G. V. y Ferguson, J. F. (1995). Biodegradation of chlorophenols by mixed and pure cultures from a fluidized - bed reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42: 951-957.
- Ramírez-Gama, R., Millan, L., Chavéz, M., Madrazo, O., Reyes, G., García, L. y Müggenburg, Y. (1995). *Manual de prácticas de microbiología general*. Ed. Laboratorio de microbiología experimental. Facultad de Química, UNAM. México, D.F. pp. 296.
- Reddy, M. P., Pagilla, K. R., Senthilnathan, P. R. y Johnson, P. S. (1993). Estimation of biomass concentration and pollution dynamics in a captor activated sludge system. *First international Specialized Conference on Microorganisms in Activated Sludge and Biofilm Processes, September 27-28 1993, Paris, Francia*. 443-446.
- Robertson, A., Macks, G. y Maclowry, J. (1976). Analysis of cost and accuracy of alternative strategies for *Enterobacteriaceae* identification. *Journal of Clinical Microbiol.* 3 (4): 426-432.
- Rozich, A. F. y Gaudy, A. F. Jr. (1983). Critical point for toxic waste treatment. *J. Environ. Eng. ASCE*. 110: 562-572.
- Sáez, P. y Rittmann, E. (1991). Biodegradation kinetics of 4-chlorophenol an inhibitory co-metabolite. *Res. JWPCF*. 63 (3): 838-847.
- Secretaría de Desarrollo Social (SEDESOL, 1994). Gaceta Ecológica. VI (26, 27 y 28): 4, 34, 37, 56.
- Silverstein, J., Hess, T. F., Al Mutaari, N. y Brown, R. (1994). Enumeration of toxic compound degrading bacteria in a multi-species activated sludge biomass. *Wat. Sci. Tech.* 29 (7): 309-316.
- Smith, B., Tomfohrde, M., Rhoden, L. y Balows, A. (1972). API system: a multitube micromethod for identification of *Enterobacteriaceae*. *Appl. Microbiol.* 24 (3): 449-452.
- Sokol, W. (1988). Uptaked rate of phenol by *Pseudomonas putida* grown in unsteady state. *Biotechnol. Bioeng.* (32): 1097-1103.
- Spokes, J. y Walter, N. (1974). Chlorophenol and chlorobenzoic acid co-metabolism by different genera of soil bacteria. *Arch. Microbiol.* (96): 125-128.

-
- Templeton, L. L. y Grady, C. P. (1988). Effect of culture history on the determination of biodegradation kinetics by batch and fed-batch techniques. *J.W.P.C.F.* **(60)**: 651-658.
- Verdy, B. (1977). *L'Analyse ecologique des boues activées*. Ed. Christian Brucher Segetec (France), 125 pp.
- Wanner, J. (1992). Comparison of biocenoses from continuous and sequencing batch reactors. *Wat. Sci. Tech.* **25 (6)**: 239-249.
- Wanner, J. (1994). Activated sludge population dynamics. *Wat. Sci. Tech.* **30 (11)**: 159-169.
- Westmeier, F. y Rehum, H.J. (1987). Degradation of 4-clorophenol in minicipal wastewater by adsorptive immobilized *Alcaligenes* sp. A 7-2. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **(26)**: 78-83.
- Zache, G. y Rhem, H. (1989). Degradation of phenol by coimmobilized entrapped mixed culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **(30)**: 426-432.

Anexos

Anexo 1.- Resultados a partir de los cuales se obtuvieron los coeficientes biocinéticos para la degradación del fenol por los lodos activados aclimatados.

Tiempo (horas)	Experimental (Y)	Modelo (Y _{Estimada})	Desviación (%)
0	26.5	26.5	0
0.25	25.6	26.038	-1.7
3	19.9	20.335	-2.2
6	12.5	11.887	4.9
8	3.35	3.526	-5.3
8.30	2.2	2.359	-7.2
9	0.94	0.735	21.8
10	0.11	0.117	-5.9

Coefficientes biocinéticos: $\mu_{\max} = 0.094 \text{ h}^{-1}$; $K_s = 29 \text{ mg/l}$; $K_i = 1 \text{ mg/l}$;
 $X_0 = 183 \text{ mg SSV/l}$; $Y_{\text{prom}} = 0.33 \text{ mg SSV/mg de fenoles}$;
suma de mínimos cuadrados (SMC) = 8.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Anexo 2.- Resultados a partir de los cuales se obtuvieron los coeficientes biocinéticos para la degradación del 4-clorofenol por los lodos activados aclimatados.

Tiempo (horas)	Experimental (Y)	Modelo (Y_{Estimada})	Desviación (%)
0	28.7	28.7	0
0.25	26.4	28.217	-6.9
3	20	22.305	-11.5
6	17.4	13.757	20.9
8	4.6	5.444	-18.3
8.30	2.9	4.051	-39.7
9	1.9	1.525	19.7
10	0.45	0.257	42.8
11	0.22	0.040	81.9

Coefficientes biocinéticos: $\mu_{\max} = 0.066 \text{ h}^{-1}$; $K_s = 20.5 \text{ mg/l}$; $K_i = 1.65 \text{ mg/l}$;
 $X_0 = 183 \text{ mg SSV/l}$; $Y_{\text{prom}} = 0.33 \text{ mg SSV/mg de fenoles}$; $\text{SMC} = 2$.

Anexo 3.- Resultados a partir de los cuales se obtuvieron los coeficientes biocinéticos para la degradación del 2,4-diclorofenol por los lodos activados aclimatados.

Tiempo (horas)	Experimental (Y)	Modelo (Y_{Estimada})	Desviación (%)
6	19.5	19.5	0
8	17.2	14.366	16.5
8.30	16.5	13.483	18.3
9	12.1	11.268	6.9
10	6.3	7.665	-21.7
11	2.2	3.753	-70.6
12	1.1	1.085	1.4
13	0.05	0.24	-379.9
20	0.05	0	100
21	0.04	0	100

Coefficientes biocinéticos: $\mu_{max} = 0.052 \text{ h}^{-1}$; $K_s = 19 \text{ mg/l}$; $K_i = 1.85 \text{ mg/l}$;
 $X_o = 183 \text{ mg SSV/l}$; $Y_{prom} = 0.33 \text{ mg SSV/mg de fenoles}$; $SMC = 2$.

Anexo 4.- Resultados a partir de los cuales se obtuvieron los Coeficientes biocinéticos para la degradación del COT por los lodos activados aclimatados.

Tiempo (horas)	Experimental (Y)	Modelo (Y _{Estimada})	Desviación (%)
2	46	46	0
3	43.2	42.591	1.4
4	37.3	39.093	-4.8
5	36.4	35.542	2.4
6	32.9	31.999	2.7
7	26.5	28.548	-7.8
8	23.7	25.291	-6.7
9	22.9	22.330	2.5
10	22.7	19.746	13
11	17.8	16.645	6.5
12	17.3	15.812	8.6
13	12.7	14.417	13.5
14	12.5	13.334	-6.7
15	11.5	12.504	-8.7
16	10.8	11.875	-9.9
17	10.7	11.4	-6.5
18	10.7	11.044	-3.2
19	10.4	10.778	-3.6

Coefficientes biocinéticos: $\mu_{max} = 0.26 \text{ h}^{-1}$; $K_s = 217 \text{ mg/l}$; $K_i = 3.9 \text{ mg/l}$;
 $X_o = 183 \text{ mg SSV/l}$; $Y_{prom} = 0.94 \text{ mg SSV/mg de COT}$; $SMC = 3$.

Anexo 5.- Resultados a partir de los cuales se obtuvieron los coeficientes biocinéticos para la degradación del COT por *Aeromonas* sp.

Tiempo (días)	Experimental (Y)	Modelo (Y_{Estimada})	Desviación (%)
0	57.4	57.4	0
0.25	55.3	54.8	0.9
1	49.7	47.078	5.2
2	34.7	37.728	-8.7
3	27.5	30.324	-10.2
4	25.6	25.114	1.9
5	24.6	21.762	11.5
6	22.7	19.729	13
7	20.1	18.543	7.7
8	17.4	17.865	-2.7

Coefficientes biocinéticos: $\mu_{max} = 2 \text{ d}^{-1}$; $K_s = 290 \text{ mg/l}$; $K_i = 81 \text{ mg/l}$;
 $X_o = 70 \text{ mg SSV/l}$; $Y_{prom} = 2.5 \text{ mg SSV/mg de COT}$; $SMC = 4$.

Anexo 6.- Resultados a partir de los cuales se obtuvieron los coeficientes biocinéticos para la degradación del COT por *Pseudomonas* sp.

Tiempo (días)	Experimental (Y)	Modelo (Y_{Estimada})	Desviación (%)
0	53.3	53.3	0
1	49.81	48.199	3.2
2	32.5	41.318	-27.1
3	31	34.603	-11.6
4	29.4	28.323	3.7
5	24.7	22.687	8.1
6	19.4	17.822	8.1
7	13.5	13.766	-1.9
8	1.04	10.484	-0.8

Coefficientes biocinéticos: $\mu_{\max} = 1.4 \text{ d}^{-1}$; $K_s = 420 \text{ mg/l}$; $K_i = 815 \text{ mg/l}$;
 $X_0 = 120 \text{ mg SSV/l}$; $Y_{\text{prom}} = 2.8 \text{ mg SSV/mg de COT}$; $\text{SMC} = 1$.

Anexo 7.- Resultados a partir de los cuales se obtuvieron los coeficientes biocinéticos obtenidos para la degradación del COT por *Flavimonas oryzihabitans*.

Tiempo (días)	Experimental (Y)	Modelo (Y_{Estimada})	Desviación (%)
0	57.1	57.100	0
1	48.7	52.328	-7.4
2	41.2	46.107	-11.9
3	39.5	40.160	-1.7
4	37.3	34.593	7.3
5	32.8	29.485	10.1
6	25.6	24.887	2.8
7	19	20.821	-9.6
8	12.4	17.282	-39.4

Coefficientes biocinéticos: $\mu_{\max} = 0.9 \text{ d}^{-1}$; $K_s = 500 \text{ mg/l}$; $K_i = 20200 \text{ mg/l}$;
 $X_o = 95 \text{ mg SSV/l}$; $Y_{\text{prom}} = 1.37 \text{ mg SSV/mg de COT}$; $\text{SMC} = 8$.