

14  
201



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO DE TRATABILIDAD BIOLÓGICA DE LAS AGUAS RESIDUALES DEL ENSILADO Y Prensado DEL CEMPASÚCHIL (*Tagetes erecta*)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

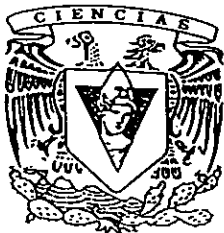
P R E S E N T A :

JESÚS FIDEL ARMENDÁRIZ GALVÁN

DIRECTOR DE TESIS: Dr. VÍCTOR MANUEL LUNA-PABELLO

MEXICO, D. F.

1998



FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR

257452

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

Todo el material contenido en esta tesis está 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule  
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: Estudio de tratabilidad biológica de las aguas residuales del ensilado y prensado del cempasúchil (Tagetes erecta).

realizado por Jesús Fidel Armendáriz Galván

con número de cuenta 8856165-3 , pasante de la carrera de Biología.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis Propietario Dr. Víctor Manuel Luna Pabello.

Propietario Biol. María Elena Chánez Cárdenas.

Propietario Biol. Martha Graciela Rocha Munive.

Suplente Biol. Vicente Castrejón Tellez.

Suplente Biol. Fernando García Vargas.

FACULTAD DE CIENCIAS  
U. N. A. M.

Consejo Departamental de Biología  
M. en C. Alejandro Martínez Mena



DEPARTAMENTO  
DE BIOLOGIA

## **Reconocimientos**

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 301 del Programa de Ingeniería Química Ambiental y Química Ambiental de la Facultad de Química de la UNAM y contó con el apoyo financiero de los proyectos UNAM-GTZ "Residuos Peligrosos 1995-1997" y DGAPA-UNAM IN505594 "Estudio de la degradación de contaminantes disueltos en aguas residuales usando comunidades microbianas en matrices sólido líquido-gas".

## **Agradecimientos**

Se agradece ampliamente la beca proporcionada por parte de la DGAPA-UNAM, en el marco del Proyecto IN505594 "Estudio de la degradación de contaminantes disueltos en aguas residuales usando comunidades microbianas en matrices sólido-líquido-gas", durante el período diciembre 1995 a marzo de 1996. También se hace patente el agradecimiento por la beca recibida, durante los meses julio a diciembre de 1997, a través del proyecto UNAM-GTZ "Residuos Peligrosos 1995-1997", para la culminación de la presente tesis experimental.

Dedico este trabajo con todo cariño a:

**A mis padres:**

**José de Jesús Armendáriz Meléndez y Catalina Galván Morales.**

Como una muestra de mi cariño y agradecimiento, por todo el amor y apoyo brindado y porque hoy veo llegar a su fin una de las metas de mi vida. Les agradezco la orientación que siempre me han otorgado.

**A mis hermanos:**

Verónica, Ramón, Nora y Víctor Armendáriz Galván por la confianza y apoyo brindado.

**A mi abuelita:**

Josefina Morales Jiménez. Por ser como una madre y quién siempre me llevo por el buen camino. Siempre vivirás en mi corazón.

**A mis cuñados:**

José Aguilar, Héctor Sotelo y Alejandra Suárez por ser parte de mi familia.

A mis mejores amigos

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Carmen Durán de Bazúa Coordinadora Global del Programa de Ingeniería Química Ambiental y Química Ambiental (PIQAYQA) por brindarme un lugar de trabajo en el laboratorio para la realización de la tesis y las facilidades brindadas en el uso de equipo, material y acervo bibliográfico.

Al Director del presente trabajo Dr. Víctor Manuel Luna-Pabello por su tiempo, confianza, paciencia, apoyo, motivación y total disposición para conmigo. Gracias por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo.

A los sinodales a la Biól. María Elena Chánez Cárdenas, a la Biól. Martha Graciela Rocha Munive, al Biól. Vicente Castrejón Tellez y al Biól. Fernando García Vargas, quienes revisaron esta tesis, por sus comentarios y aportaciones, que mejoraron este trabajo.

A mis compañeros del Laboratorio 301 del Programa de Ingeniería Química Ambiental y Química Ambiental (PIQAYQA) por su compañerismo. En especial a Rosario Rodríguez, Teresa Romero, Angélica Peralta, Tania Campos, Elias Granados, Xicotencatl López, Beatriz Morales, José Guadalupe Hernández, Anabel Caballero, Roberto Ríos, Francisco Damián, Nora Salinas, Patricia Severiano.

A Conchita y Linda Hernández por la gran amistad y confianza brindada. Espero sigamos siendo por siempre amigos.

A Karen Ambriz Rivas, por su amistad y ayuda en la preparación de medios de cultivo.

A la Biól. Araceli Farfan Sotelo, por su amistad y ayuda brindada en enseñarme Portugués.

A Ramón Montuy por haberme brindado su amistad y por haber compartido grandes pachangas. Espero sigamos siendo los mismos.

A Rosalba Hernández, Andrea Cordero y Enrique Cortés por la amistad que me brindan y por haberme dado la oportunidad de capturar e imprimir la tesis. Gracias.

A mis mejores amigos: Martha Graciela Rocha Munive, María Elena Chánez Cárdenas, Mireya Alcaraz, Teresa Contreras, Jorge Inés Calderón Vega, Daniel Navarro Santillán, Víctor Manuel Salcedo, José Manuel Linares, Alonso, Héctor. Gracias por su gran amistad.

A toda la familia Armendáriz y Galván, con especial cariño a Rosa Isela, Mari Carmen, Norma Angélica, Emma Elena, Linda, Rubén, Lourdes, Licha, Angélica y Lupe.

A toda la familia: Reyes Gabriel, con especial cariño a Rita, Margarita, Fernando, Lorena.

## ÍNDICE

|                                                                          | Pág |
|--------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>RESUMEN</b>                                                           | 1   |
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b>                                                   | 3   |
| <b>2. MARCO DE REFERENCIA</b>                                            | 4   |
| 2.1 Aspectos generales e importancia de la flor de muertos o cempasúchil | 4   |
| 2.2 Proceso de ensilado y prensado del cempasúchil                       | 5   |
| 2.3 Problemática ambiental                                               | 7   |
| 2.4 Propuesta de solución                                                | 8   |
| <b>3. FUNDAMENTACIÓN</b>                                                 | 10  |
| <b>3.1 Generalidades sobre tratamiento de aguas residuales</b>           | 10  |
| <b>3.2 Tratamientos secundarios o biológicos</b>                         | 10  |
| 3.2.1 Generalidades sobre tratamiento anaerobio                          | 11  |
| 3.2.1.1 Sistemas anaerobios convencionales                               | 12  |
| 3.2.2 Generalidades sobre tratamiento aerobio                            | 13  |
| 3.2.2.2 Sistemas aerobios convencionales                                 | 14  |
| <b>3.3 Reactores biológicos seleccionados</b>                            | 16  |
| 3.3.1 Selección del reactor anaerobio                                    | 16  |
| 3.3.1.1 Reactor anaerobio de lecho de lodos de flujo ascendente (RALLFA) | 16  |
| 3.3.2 Selección del reactor aerobio                                      | 17  |
| 3.3.2.1 Reactor biológico rotatorio (RBR) o de biodiscos                 | 17  |
| <b>3.4 Generalidades sobre biodegradación</b>                            | 20  |
| 3.4.1 Clasificación de pruebas de biodegradabilidad                      | 21  |
| 3.4.1.1 Prueba de biodegradabilidad rápida aerobia                       | 21  |
| <b>3.5 Aspectos generales sobre bacterias</b>                            | 22  |
| 3.5.1 Fisiología del crecimiento bacteriano                              | 23  |
| 3.5.2 Curva de crecimiento bacteriano                                    | 26  |
| 3.5.3 Metabolismo microbiano                                             | 27  |
| 3.5.4 Cuenta de microorganismos                                          | 30  |
| <b>4. ESTRATEGIA DE TRABAJO</b>                                          | 33  |
| <b>5. FASE EXPERIMENTAL I</b>                                            | 34  |
| <b>5.1 Objetivos</b>                                                     | 35  |
| <b>5.2 MATERIALES Y MÉTODOS</b>                                          | 35  |
| 5.2.1 Propuesta de tratamiento anaerobio-aerobio                         | 35  |
| 5.2.2 Aguas residuales en estudio                                        | 36  |
| 5.2.3 Tratamiento anaerobio                                              | 36  |
| 5.2.4 Tratamiento aerobio                                                | 38  |
| <b>5.3 Resultados y discusión</b>                                        | 42  |
| 5.3.1 Tratamiento anaerobio                                              | 42  |
| 5.3.2 Tratamiento aerobio                                                | 48  |
| 5.3.2.1 Análisis microbiológico                                          | 52  |
| 5.3.3 Evaluación global del tren de tratamiento anaerobio-aerobio        | 56  |
| <b>5.4 Conclusiones y recomendaciones de esta fase experimental</b>      | 58  |
| 5.4.1 Conclusiones                                                       | 58  |
| 5.4.2 Recomendaciones                                                    | 59  |

|                                                                          | <b>Pág</b> |
|--------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>6. FASE EXPERIMENTAL II</b>                                           | 61         |
| <b>6.1 Objetivos</b>                                                     | 62         |
| <b>6.2 MATERIALES Y MÉTODOS</b>                                          | 62         |
| 6.2.1 Prueba de biodegradabilidad aerobia rápida                         | 62         |
| 6.2.2 Elaboración del inóculo y preparación del agua residual en estudio | 63         |
| 6.2.3 Análisis fisicoquímico del agua a tratar                           | 64         |
| 6.2.4 Análisis bacteriológico                                            | 64         |
| <b>6.3 Resultados y discusión</b>                                        | 65         |
| <b>6.4 Conclusiones y recomendaciones de la fase experimental II</b>     | 75         |
| 6.4.1 Conclusiones                                                       | 75         |
| 6.4.2 Recomendaciones                                                    | 76         |
| <b>7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES GENERALES</b>                       | 77         |
| 7.1 Conclusiones                                                         | 77         |
| 7.2 Recomendaciones                                                      | 77         |
| <b>8. Bibliografía consultada</b>                                        | 78         |
| <b>9. ANEXOS</b>                                                         | 83         |
| Anexo A Parámetros fisicoquímicos                                        | 83         |
| Anexo B Técnicas para determinación de microorganismos                   | 89         |
| Anexo C Preparación de medios de cultivo y material estéril              | 91         |
| Anexo D Técnica para la cuenta de microorganismos (bacterias)            | 94         |



## RESUMEN

México es uno de los principales productores de harina de flor (cempasúchil), la cual actualmente está teniendo auge como una fuente inapreciable de pigmentos carotenoides naturales (xantofilas), los que son altamente apreciados en la industria alimentaria, farmacéutica, avícola, etc. Durante el proceso de obtención de harina de flor se producen aguas residuales pardas negruzcas de olor fétido, pH entre 4 y 5 unidades y con 90 a 95 g/L de materia orgánica (MO) medida como demanda química de oxígeno (DQO). Se plantea que una alternativa para la depuración de las aguas residuales de esta agroindustria, es mediante el uso secuencial de procesos de tratamiento biológico anaerobio-aerobio. En consecuencia, en el presente trabajo experimental se utilizó un tren de tratamiento integrado por un reactor anaerobio de lecho de lodos de flujo ascendente (RALLFA) y un reactor biológico rotatorio (RBR). Para la evaluación del comportamiento depurativo global de este tipo de sistemas se llevaron a cabo registros periódicos de pH, temperatura, alcalinidad, DQO y sólidos, así como la determinación y cuantificación del tipo de microorganismos involucrados presentes a lo largo del proceso, cabe mencionar que estos parámetros microbiológicos se realizaron sólo en el RBR. El RALLFA fue alimentado a diferentes concentraciones de materia orgánica y sus efluentes fueron suministrados directamente al RBR. Por otra parte, se aplicó la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida a 28 y 42 días, tomando como referencia la OECD 301 A, pero empleando un respirómetro Voith-Sapromat B-12. De manera general, la técnica consistió en incubar a 20°C las muestras inoculadas y en registrar, en períodos predeterminados, el consumo de oxígeno a consecuencia de la actividad metabólica de los microorganismos. Adicionalmente, se evaluó la DQO y se cuantificaron los principales grupos tróficos bacterianos existentes, empleando para ello medios de cultivo selectivos y la cuenta en placa por extensión superficial.

Los resultados obtenidos durante la fase experimental mostraron que este tipo de líquido residual puede ser tratado satisfactoriamente a través del sistema anaerobio-aerobio, alcanzando un porcentaje de remoción promedio en el RALLFA del 76% cuando se alimentó con 32,720; 34,810 y 48,850 mgDQO/L, mientras que para las concentraciones entre 11,550 a 23,830 y 33,330 mgDQO/L se observó que dicho porcentaje de remoción promedio fue de sólo 63%. En términos generales, se removió mayor porcentaje de materia orgánica disuelta cuando el influente era más concentrado. Lo anterior posiblemente se debió a que los microorganismos se encontraban más aclimatados debido al tiempo. En cuanto al RBR la remoción promedio lograda fue de 64% para las concentraciones de 6,900; 7,040; 7,340; 8,990; 11,470 y 16,230 mgDQO/L. En consecuencia puede decirse que de manera global el porcentaje promedio de MO removida, medida como DQO, en el tren de tratamiento anaerobio-aerobio fue del 91%, para concentraciones de 21,460; 32,720; 34,810 y 48,850 mgDQO/L y finalmente para las concentraciones de 20,670; 23,830 y 33,330 mgDQO/L se obtuvo una remoción promedio total del 82%. De manera general puede decirse que debido a las relativamente altas concentraciones de MO con las que se alimentó al RBR, se propiciaron condiciones anaerobias, anóxicas y microaerobias en

las diferentes etapas del reactor, lo que a su vez restringió el desarrollo de microorganismos aerobios en el RBR. Los microorganismos encontrados en el RBR fueron únicamente bacterias heterótrofas y escasos ciliados de los géneros *Epystilis* y *Opercularia*, por lo que se considera que la diversidad observada es baja y que los ciliados encontrados son altamente tolerantes a la ausencia de oxígeno molecular disuelto.

En cuanto a la prueba de biodegradabilidad, se observó que después de 5 días de incubación se notó un consumo de oxígeno (CO) de 1720 mg/L y una remoción de MO de 49.5%. A los 28 días, el CO fue de 4720 mg/L y la remoción fue de 78.9% y finalmente, a los 42 días, el CO fue de 8350 mg/L, removiéndose 85% de MO, medida en todos los casos como DQO. Por lo anterior, puede considerarse al tipo de agua residual estudiada como de rápida biodegradación aerobia ya que a los 28 días se removió más del 70% de MO.

Con relación a la cuenta de bacterias mesófilas aerobias y a los diferentes grupos tróficos evaluados, se detectó que del total de mesófilas aerobias (100%), aproximadamente 46% corresponden a bacterias proteolíticas, 28% amilolíticas, 23% sacarolíticas y 4% celulolíticas, presentándose estas últimas, tróficamente activas en la etapa final del estudio, lo cual muy probablemente se deba a la selectividad inicial de los sustratos disponibles de más fácil biodegradación.

Por último, de acuerdo con los resultados obtenidos, puede inferirse que los compuestos presentes en el agua residual tratada son biodegradables aerobiamente pero que ello no ocurrió en el RBR debido a que el diseño estructural del reactor, bajo las condiciones operativas empleadas, resultó insuficiente para realizar una adecuada transferencia de oxígeno existente en la atmósfera al líquido en tratamiento originando las condiciones microaerobias, anóxicas y/o anaerobias antes señaladas.

## 1. INTRODUCCIÓN

México enfrenta graves problemas de contaminación tanto de tipo industrial como urbana, ya sea en forma sólida (desechos sólidos), líquida (aguas residuales) ó como efluentes gaseosos. De manera particular, la contaminación del agua ha despertado especial interés en evaluar las distintas fuentes de contaminación, en virtud de que han ido apareciendo nuevos agentes contaminantes derivados del avance tecnológico, industrial y agropecuario. Todos los desechos industriales afectan en alguna forma la vida normal de las corrientes. Cuando los niveles de contaminantes rebasan determinados límites, hacen a estas aguas inadecuadas e inaceptables para ser aprovechadas, ocasionando tanto daños a la salud de la población como pérdidas económicas. Cuando las poblaciones eran pequeñas y no existía propiamente la industria, los cuerpos receptores (ríos, lagos, suelo, etc) eran capaces de asimilar estos desechos líquidos y sólidos, ya que los cuerpos de agua tienen la capacidad de autopurificarse, particularmente porque los residuos generados eran biodegradables. Sin embargo, con el aumento en el número de industrias y de los volúmenes de producción que son descargados hacia un cuerpo receptor, se han afectado en alguna forma los flujos y calidades de las corrientes. Debido a esto, el tratamiento del agua residual adquiere mayor importancia para evitar el deterioro de los ecosistemas acuáticos y el incremento del estado trófico de los mismos (Muñiz, 1987).

Asimismo, se han desarrollado estudios que permiten reglamentar la calidad de las aguas residuales que desalojan principalmente las industrias, con la finalidad de prevenir problemas de contaminación ambiental, instalándose sistemas de tratamiento para tratar los desechos que inevitablemente se generan y recuperar la calidad del ambiente (Ottengraf, 1987).

Debido a las descargas de aguas residuales industriales, muchas fuentes de aguas naturales tienen un grado considerable de contaminación. Entre las diferentes industrias nacionales existentes, la productora de harina de flor así como de pigmentos naturales provenientes del proceso de cempasúchil, tal como la planta ubicada en Irimbo, Michoacán, genera aguas residuales durante el ensilado y prensado para la deshidratación de la flor. La mezcla de esas dos aguas residuales, resulta en un efluente de carácter ácido, con un elevado contenido de materia orgánica disuelta y sólidos sedimentables. Estos efluentes líquidos altamente contaminantes requieren tratarse antes de ser descargados a algún cuerpo receptor, el tratamiento de aguas residuales se presenta como una alternativa viable.

Antes de describir esa problemática, se abordarán primeramente aspectos generales relacionados con la flor de muertos (cempasúchil) y del proceso de obtención de harina.

## 2. MARCO DE REFERENCIA

### 2.1 Aspectos generales e importancia de la flor de muertos o cempasúchil

En México se tiene una flor indígena, conocida como flor de muertos, clavelón, copetuda, clavel de la india o cempasúchil (alteración de su antiguo nombre azteca Cempoalxóchitl, literalmente significa veinte flores, pero como ese número era ponderativo entre los indígenas, puede traducirse como flor de muchos pétalos de cempoalli= veinte, en el sentido de muchos y xóchitl= flor). Desde el punto de vista taxonómico se incluye dentro de la familia de las Compuestas, en la tribu Tageteae. Entre los géneros de esta tribu, destacan por su mayor diversidad y número de especies *Dyssodia* y *Tagetes*.

El género *Tagetes* consta de 43 especies americanas, algunas introducidas en Asia y Australia. En América se distribuyen desde las latitudes 36 N - 36 S, del sur de Estados Unidos hasta el sur de Argentina, en regiones montañosas, áridas y frecuentemente en hábitats méxicos desde moderadamente elevados hasta 4500 metros, siendo el Centro y Sur de México su área de mayor diversidad (Strother, 1977).

De las 20 variedades de *Tagetes*, la mexicana *Tagetes erecta*, es una planta herbácea, erecta y anual que alcanza de 50 a 60 cm de altura. Sus hojas son opuestas, divididas, dentadas y olorosas (aromáticas); con flores grandes (5 ó 6 cm de diámetro) de color anaranjadas, amarillento o rojizo y de olor penetrante.

Los floricultores siembran entre los meses de mayo y junio para florecer alrededor del mes de octubre y noviembre. Se cultiva en nuestro país para fines ornamentales, es decir son favoritas en ciertas ceremonias que se dedican en el mes de noviembre como ofrenda floral en los funerales y sepulcros así como materia prima en la industria alimentaria, particularmente en la producción de harinas para la industria avícola (para ser usadas como aditivo de alimentos balanceados de gallinas ponedoras y pollos de engorda). También es utilizada para obtener pigmentos (xantofilas) puros y emplearlos como colorantes para repostería, cosméticos, etcétera.

Los estudios químicos actuales del género se han enfocado principalmente al análisis de los pigmentos y aceites esenciales de especies cultivadas; la presencia de estos aceites probablemente se relaciona con la atracción de polinizadores, repulsión de depredadores y quizás tengan una función antiséptica (Rojo, 1989).

## **2.2 Proceso de ensilado y prensado del compasúchil**

En las plantas deshidratadoras de la flor, el proceso consiste en ensilar la flor para que, por descomposición natural (sujeto a procesos anaerobios) se rompan las paredes celulares y se libere parte del agua intracelular. Antes de enviar la flor a los equipos de secado que emplean aire caliente y que por convección la deshidrata, es prensada mecánicamente para extraer la mayor cantidad posible de agua. La torta deshidratada es enviada a molinos para homogenizar su tamaño de partícula y composición y envasada para su posterior venta o procesamiento.

Como parte integral del proceso de deshidratado en limbo se ha implementado la recuperación de los sólidos suspendidos presentes principalmente en el efluente de prensado de flor, con el fin de captar el pigmento presente en los sólidos (Chávez, 1995).

Por lo tanto, para la obtención de harina de flor se presentan dos operaciones generadoras de aguas residuales con elevados contenidos de material en suspensión y disuelto (aproximadamente 1.4 L/s de aguas residuales para 200 T/d flor): ensilado y prensado; el de ensilado es el de mayor aportación de carga contaminante, contribuyendo a casi la totalidad de los parámetros, excepto en el caso de sólidos suspendidos y sedimentables, los cuales son aportados por el efluente de prensado (figura 1).

El efluente global (ensilado+prensado) es de tipo ácido, con un elevado contenido de materia orgánica, reflejado por la alta concentración de sólidos suspendidos volátiles, grasas y aceites, alta concentración de nutrimentos y a la gran cantidad de sólidos sedimentables que rebasan ampliamente las condiciones particulares de descarga (CPD) y que las hacen potencialmente dañinas para los cuerpos receptores (agua y suelo) (tablas 1 y 2). El agua residual puede clasificarse como medianamente biodegradable.

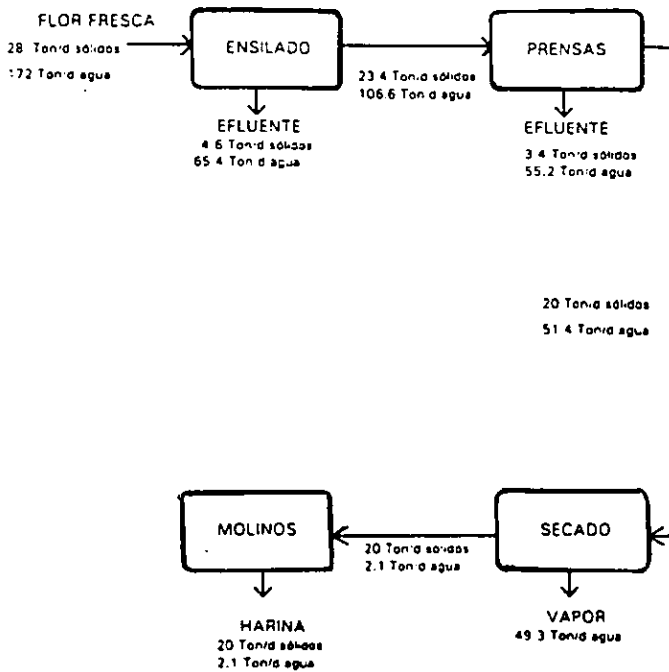


Figura 1. Diagrama de bloques y balances para una planta deshidratadora de cempasúchil en México (Casarrubias y Hernández, 1996)

Tabla 1. Características de las aguas de ensilado y prensado de cempasúchil en mg/L (Anónimo, 1990)

| PARÁMETROS                            | PRENSADO | ENSILADO |
|---------------------------------------|----------|----------|
| Sólidos suspendidos totales           | 24 000   | 3 150    |
| Sólidos suspendidos volátiles         | 19 700   | 2 900    |
| Sólidos disueltos totales             | 23 400   | 36 300   |
| Fosfatos                              | 1 500    | 1 580    |
| N – Amoniacal                         | 330      | 270      |
| N – Orgánico                          | 830      | 320      |
| Demanda química de oxígeno total      | 72 600   | 92 000   |
| Demanda química de oxígeno soluble    | 48 300   | 51 700   |
| Demanda bioquímica de oxígeno total   | 40 170   | 56 900   |
| Demanda bioquímica de oxígeno soluble | 28 900   | 29 900   |
| Grasas y aceites                      | 470      | 480      |
| Coliformes totales (NMP/100 mL)       | 0        | 0        |
| Sólidos sedimentables (mL/L)          | 600      | 0        |
| PH (unidades)                         | 4.1      | 4.7      |
| Caudal (L/s)                          | 0.5      | 0.9      |
| Relación DBO soluble a DQO soluble    | 0.598    | 0.578    |

**Tabla 2. Condiciones particulares de descarga (CPD) para el efluente de las deshidratadoras (Anónimo, 1990)**

| PARÁMETROS                             | CPD*   |
|----------------------------------------|--------|
| Demanda bioquímica de oxígeno, mg/L    | 350    |
| Demanda química de oxígeno, mg/L       | 400    |
| Sólidos suspendidos totales, mg/L      | 350    |
| Sólidos sedimentables, mL/L            | 1      |
| Grasas y aceites, mg/L                 | 15     |
| Fosfatos totales, mg/L                 | 10     |
| Nitrógeno orgánico, mg/L               | 3      |
| Potencial de hidrógeno (unidades)      | 6-9    |
| Temperatura, C (unidades)              | 30     |
| Material flotante (>3mm <sup>2</sup> ) | 0      |
| Conductividad umho/cm <sup>2</sup>     | 2 000  |
| Coliformes totales, NMP/100 mL         | 20 000 |
| Color (unidades Pt-Co)                 | 100    |

\* Referido al valor máximo permisible en muestras individuales según Oficio No. 410-2 437 del 18 de junio de 1986

De las cuatro plantas deshidratadoras de flor, únicamente la localizada en Amayuca, Morelos cuenta con condiciones particulares de descarga (CPD), fijadas por SEDESOL en junio de 1986, lo que significa que las autoridades fijarán límites muy semejantes a ellas.

### 2.3 Problemática ambiental

La contaminación del medio ambiente por efecto de las descargas de aguas residuales es una problemática que debe abordarse mediante acciones que permitan reducir o eliminar el desequilibrio en los sistemas naturales, incidiendo en el tratamiento de estas aguas residuales previo a su disposición en el medio ambiente.

Debido a las características de la materia orgánica disuelta biodegradable (tabla 1) que contienen estas aguas del proceso del cempasúchil para la producción de harinas de flor han dado origen a problemas de contaminación como:

- a) Emisión de malos olores.
- b) Creación de un ambiente propicio para la reproducción de moscas, mosquitos y otros insectos.

c) Aumento en la carga microbiana hacia los cuerpos receptores (agua y suelo), provocando que la autopurificación natural no pueda conservar condiciones aerobias.

d) Peligro de contaminación de acuíferos subterráneos por filtración, lixiviación, etc.

Esto implica, que al ser arrojados a corrientes y cuerpos receptores acuíferos causen deterioros ambientales por la presencia de compuestos químicos recalcitrantes o tóxicos que ocasionen daños ecológicos a la flora y fauna acuáticas al provocarse déficits de oxígeno disuelto en ellas, así como la inutilización del cuerpo de agua como fuente de abastecimiento para asentamientos humanos aledaños.

Actualmente, el tratamiento biológico más que el fisicoquímico se usa preferentemente en el tratamiento de efluentes de aguas residuales para que a través de microorganismos se remueva la materia orgánica biodegradable presente en estado coloidal y disuelta.

## **2.4 Propuesta de solución**

En áreas industrializadas se descargan grandes volúmenes de agua residual en ríos relativamente pequeños, por lo que la autodepuración natural no puede conservar condiciones aerobias. Por esa razón es esencial el tratamiento del agua residual, ya que la cantidad de materia orgánica que una corriente puede asimilar está limitada por la disponibilidad de oxígeno disuelto.

La integración de aspectos de prevención y control de la contaminación con la operación de las plantas deshidratadoras ha promovido la búsqueda de tecnología apropiada para el manejo y control de la descarga de los efluentes líquidos generados en el proceso de obtención de harina de flor.

Las aguas residuales provenientes del procesamiento del cempasúchil son por sus características fisicoquímicas y por sus volúmenes producidos, un problema de impacto ambiental que debe atenderse mediante un sistema de tratamiento basado en procesos de tipo biológico, que son una alternativa viable, debido a los bajos costos de funcionamiento y la efectividad de los sistemas (Durán-de-Bazúa, 1993; Durán-de-Bazúa y *et al.*, 1994). Mediante esta visión del tratamiento, se intenta lograr una disminución en la carga orgánica contaminante, de aquí el planteamiento de emplear una secuencia de tratamiento anaerobia-aerobia.



En la búsqueda de soluciones viables, técnicas y económicas se podría optar por un cambio de tecnología apropiada en las plantas deshidratadoras del cempasúchil para no generar aguas residuales con elevados contenidos de materia orgánica durante el proceso de obtención de harina de flor y por tanto no llevar a cabo un tratamiento de tipo biológico (Aguirre y Correa, 1997).

La alternativa para producir harina de flor, sin generar aguas residuales, es el secado de la flor por medio de un horno de charolas, donde se emplea aire caliente y que por convección la deshidrata, la cual puede ser directamente enviada a molinos para homogenizar su tamaño de partícula y envasarse para su posterior venta o procesamiento (Aguirre y Correa, 1997).

En la actualidad con la apertura del Tratado de Libre Comercio (TLC), se podría importar la harina de flor de países como Argentina, Colombia, Chile, Ecuador, El Salvador, España, Estados Unidos, Guatemala, Panamá, Perú, Suiza, y Tailandia, ya que las empresas harineras prefieren cerrar que modificar sus procesos, afectando a los agricultores que cultivan la flor. Esto es un problema que cae fuera del espectro de este trabajo.

A continuación, dada la importancia de los sistemas de tratamiento, se proporcionará mayor información al respecto, ya que es el objeto de este trabajo, el estudio microbiológico de los sistemas biológicos de tratamiento de aguas de proceso de cempasúchil a escala laboratorio.

### 3. FUNDAMENTACIÓN

#### 3.1 Generalidades sobre tratamiento de aguas residuales

En el tratamiento de aguas residuales, se combinan varios procesos dependiendo de la calidad del agua residual que se va a tratar y el grado que se desee alcanzar, para producir un efluente que pueda ser descargado a un cuerpo receptor, sin dañar el ambiente.

De manera general el tratamiento de los efluentes se clasifica en:

**Tratamiento primario:** Consiste en separar o eliminar los sólidos de mayor tamaño, así como los más fácilmente sedimentables a través de medios físicos y mecánicos. El propósito fundamental es, disminuir suficientemente la velocidad de las aguas para que puedan sedimentar los sólidos y separarlos.

**Tratamiento secundario o biológicos:** Tienen como fundamento eliminar la materia orgánica coloidal y disuelta con características de biodegradabilidad. Este proceso se basa en la asimilación de esas sustancias biodegradables disueltas en el agua residual a través de microorganismos para obtener compuestos inertes más estables.

**Tratamiento terciario:** Es empleado principalmente para la eliminación de contaminantes que no son eliminados por los tratamientos secundarios convencionales, es decir los que no fueron eliminados por los microorganismos (porque son tóxicos o porque estos no pueden metabolizarlos).

Este tipo de tratamiento se lleva a cabo para obtener agua de mejor calidad del efluente, existiendo la posibilidad de reusar directamente esta agua si cumple con los estándares de calidad.

#### 3.2 Tratamientos secundarios o biológicos

Un agua residual con compuestos biodegradables como la obtenida de la deshidratación del campesúchil con contaminantes en forma soluble, puede ser tratada por vía biológica. También es posible tratar aguas residuales domésticas y municipales así como una diversidad de aguas residuales industriales.

Los organismos responsables en los procesos biológicos de depuración, tales como: bacterias, algas, hongos y protozoos entre otros, remueven la materia

orgánica biodegradable en estado coloidal y disuelta que se encuentra en el agua residual, la cual no fue removida con el tratamiento primario.

El tratamiento biológico comparte su efecto con la autopurificación de las aguas receptoras, es decir, se efectúan las mismas reacciones en la remoción de materia orgánica soluble y coloidal, en la que los sólidos suspendidos se depositan en el fondo de las corrientes para descomponerse lentamente en el medio, mientras que las sustancias disueltas son oxidadas en el agua sobrenadante.

Los procesos biológicos para el tratamiento de aguas residuales, pueden dividirse en función del tipo de metabolismo empleado por los microorganismos, considerando el nivel de oxígeno en solución presente en el líquido bajo tratamiento en:

- a) Sistemas anaerobios
- b) Sistemas aerobios
- c) Sistemas biológicos mixtos o facultativos: Consiste en una combinación de los dos procesos anteriores, intervienen microorganismos aerobios, microaerofílicos, anaerobios y de tipo facultativo, como ejemplo de este proceso están las lagunas facultativas (Escárcega y Pulido, 1986).

Esta división genera sistemas biológicos muy diferentes entre sí, tanto en su microbiología, aplicaciones, ingeniería y control.

A continuación se hace una breve descripción preferentemente de los sistemas anaerobio y aerobio.

### **3.2.1 Generalidades sobre tratamiento anaerobio**

El tratamiento anaerobio (desde el punto de vista bacteriano) de las aguas residuales, es un proceso mediante el cual la materia orgánica y/o inorgánica es degradada por medio de microorganismos que no requieren oxígeno molecular libre en solución, solo aprovechan para síntesis celular y funciones vitales de una pequeña fracción (alrededor del 10%) de la energía contenida en su alimento o sustrato y el 90% restante, se dirige a la producción de gas metano.

La digestión o depuración anaerobia es un proceso mediante el cual la materia orgánica es transformada a bióxido de carbono (30-40%) y metano (90%). Estos gases escapan a la atmósfera después de que el agua se ha saturado de ellos. El metano producido durante la descomposición anaerobia es un subproducto que puede ser utilizado como fuente de energía para plantas de tratamiento de aguas de desecho y la tasa de producción depende de la

temperatura. La producción óptima de gas ocurre a 35°C (digestión mesofílica) y a 55°C (digestión termofílica).

En la degradación anaerobia de la materia orgánica, los substratos a partir de los cuales se inicia la degradación son moléculas poliméricas que pueden ser agrupadas en tres grandes grupos: carbohidratos, proteínas y lípidos. Con ellos, los microorganismos podrán desarrollar su máxima capacidad, con lo cual se alcanzarán las más altas eficiencias de remoción de la materia orgánica.

Una de las ventajas de la digestión o tratamiento anaerobio es su relativa facilidad de operación y costos reducidos. Es de hecho, una alternativa de tratamiento seria, confiable y eficiente que en muchos casos es superior a los procesos aerobios.

### **3.2.1.1 Sistemas anaerobios convencionales**

Los sistemas anaerobios se subdividen en tres generaciones (Maciel-Luna, 1997):

#### **A. Procesos con biomasa suspendida (1ª Generación)**

Son los procesos donde la biomasa se encuentra en suspensión o sedimentada sin recirculación de sólidos. Entre estos se encuentran la fosa séptica y el tanque Imhoff, el uso de estos reactores se ha limitado a tratar aguas de desechos residenciales, con un tiempo de residencia de cuatro hasta más de 300 días, dependiendo del destino final del efluente.

#### **Lagunas anaerobias**

Se han empleado para tratar aguas residuales industriales con temperaturas superiores a la del ambiente y con cierto contenido de sólidos suspendidos sedimentables. Los tiempos de residencia hidráulica reportados en la literatura son muy variables (1.2 a 160 días, con cinco días como valor recomendado).

#### **Digestores convencionales**

Estos sistemas se han aplicado principalmente para la estabilización de los lodos de desecho que provienen del proceso de lodos activados. Están contruidos como un solo recipiente cerrado, sin agitación y sin calentamiento, en donde el desecho a tratar se estratifica en zonas definidas. Presenta tiempos de residencia hidráulica mayores a 30 días.

Estos reactores pueden subdividirse en digestores de alta y baja tasa, tomando como criterios básicos de diferenciación la carga orgánica y los tiempos de residencia hidráulica (TRH) y tiempo de retención celular (TRC) con los que se opere.

## **B. Procesos con biomasa fija (2ª Generación)**

En estos procesos los microorganismos son retenidos en el reactor ya sea por medio de un soporte o por sedimentación de flóculos microbianos. Se logran menores tiempos de residencia hidráulica de 0.5 a tres días, lo que da como resultado volúmenes de reactores menores y en una mayor estabilidad y facilidad en su operación. La primera versión es el **reactor empacado**; después se desarrolló el **reactor tubular de película fija**, con la variante de un soporte tubular. De entre ellos destaca uno, descrito a continuación.

### **Reactor anaerobio de lechos de lodos de flujo ascendente (RALLFA o UASB por sus siglas en inglés "Upflow Anaerobic Sludge Blanket" reactor)**

Su funcionamiento se basa en una buena sedimentación y actividad de la biomasa producida, la cual forma gránulos dentro del reactor. El punto débil del proceso consiste en la lentitud en la que se forman los gránulos. Los granos presentan una elevada actividad metanogénica, es decir un alto potencial de depuración del proceso.

## **C. Procesos con biomasa expandida o fluidificada (3ª Generación)**

Estos reactores se encuentran a nivel de desarrollo, aunque ya existen instalaciones a escala industrial. Son también de película fija, pero el soporte es lo suficientemente pequeño y ligero para que pueda ser fluidificado con la recirculación del efluente.

En estos sistemas se requiere de energía para la recirculación, además su operación y arranque son delicados. Las cargas orgánicas alimentadas a este sistema sobrepasan los 40 kgDQO/m<sup>3</sup> día.

### **3.2.2 Generalidades sobre tratamiento aerobio**

En estos sistemas, intervienen microorganismos que requieren para su desarrollo de suficiente oxígeno molecular libre en solución de cuando menos 2 mg/L (Luna-Pabello, 1990). Si se sitúa una población grande de microorganismos en forma de légamo o lodo, es posible que la remoción de la materia orgánica presente en la solución sea rápida. Una superficie microbiana amplia permite la adsorción inicial de sustancias coloidales y orgánicas solubles junto con la

síntesis de nuevas células, de modo que después de un periodo de contacto relativamente corto, la fase líquida contiene poca materia orgánica residual, ya que la materia orgánica adsorbida se oxida para formar productos aerobios finales (bióxido de carbono y agua).

El oxígeno molecular libre, es un factor importante para los procesos aerobios, ya que los organismos aerobios cuando utilizan los nutrimentos orgánicos, consumen al mismo tiempo el oxígeno disuelto, si este oxígeno no se repone pueden continuar procesos anaerobios que son más lentos y mal olientes (generan metano, amoníaco y ácido sulfhídrico).

Los organismos poseen la habilidad de descomponer compuestos orgánicos complejos y utilizar la energía liberada en sus funciones corporales, tales como: reproducción, crecimiento, locomoción, etc.

### **3.2.2.2 Sistemas aerobios convencionales**

Los sistemas aerobios más conocidos se describen brevemente a continuación:

Estos pueden subdividirse en dos grandes grupos, el primero conocido como de flóculos suspendidos y constituido por el sistema de lodos activados, las lagunas aireadas, lagunas de estabilización y el segundo llamado de película adherida, formado por el sistema de biodiscos y el "filtro" biológico (Sánchez et al., 1991).

#### **Lodos activados**

El sistema de lodos activados, consiste de dos equipos básicos, un tanque de aireación agitado donde se lleva a cabo la remoción de la materia orgánica disuelta en el agua residual a través de su transformación a microorganismos suspendidos en el líquido y, el segundo, un sedimentador secundario donde la biomasa será separada de la fase líquida para ser parcialmente recirculada al tanque de aireación, mientras que el agua residual tratada es descargada a un cuerpo de agua receptor o enviada hacia el tratamiento terciario.

La remoción de la materia orgánica por este sistema es de 55-95% de DBO, 50-80% de DQO y 55-95% en sólidos suspendidos, dependiendo del tipo de aguas residuales que se trate.

Las ventajas de este tipo de tratamiento son: obtención de un efluente final claro, ausencia de olores durante el proceso y altos rendimientos en remoción de materia orgánica.

## **Lagunas aireadas**

Estos sistemas tienen como principal aplicación, el tratamiento de aguas residuales industriales de relativa biodegradación, el oxígeno se suministra a través de aireadores de superficie pero no tienen una intensa agitación y la concentración de microorganismos por lo general se encuentra entre 200 y 500 mg/L.

## **Lagunas de estabilización**

Son los más simples en este tipo de tratamiento, con depósitos naturales o artificiales de tierra, abiertos en contacto con el sol y aire, donde se lleva a cabo la biodegradación de la materia orgánica mediante la actividad metabólica de bacterias y algas.

## **Reactores biológicos empacados (Biofiltros)**

Estos sistemas están empacados (reellenos) de un material biológicamente inerte (grava, piedra volcánica, bloques de material sintético, etcétera), de baja densidad específica y de gran área superficial donde los microorganismos se irán adhiriendo y reproduciendo, hasta formar la biopelícula activa donde ocurre la degradación de la materia orgánica en el agua residual.

La remoción del material contaminante se lleva a cabo en la medida que el agua residual desciende a lo largo del reactor.

## **Reactores biológicos rotatorios (RBR) o de biodiscos**

La ventaja fundamental que presentan estos sistemas es el aumento en el tiempo de retención celular (TRC) sin recurrir a la recirculación de la biomasa, obteniendo lodos con buena sedimentación. Puede alcanzar eficiencias del 90 al 95% en remoción de DBO en suspensión.

Básicamente se refiere a un tratamiento combinado de crecimiento estacionario de biomasa (biopelícula) y de lodos activados y flóculos.

Tienen la desventaja de que no pueden tratar flujos muy grandes de agua residual ya que resultarían imprácticos por el diámetro necesario de los discos y por las dimensiones de la flecha y del sistema motriz.

En el siguiente inciso, se describirán las razones que motivaron la selección de los sistemas de tratamiento empleados en la fase experimental I.

### 3.3 REACTORES BIOLÓGICOS SELECCIONADOS

#### 3.3.1 Selección del reactor anaerobio

##### 3.3.1.1 Reactor anaerobio de lechos de lodos de flujo ascendente (RALLFA)

Entre los diversos sistemas de tratamiento anaerobios anteriormente descritos, se seleccionó el RALLFA por las diversas ventajas que ofrece respecto de los otros tratamientos disponibles.

La tecnología anaerobia ha alcanzado una sólida madurez y confiabilidad en el tratamiento de aguas residuales señalando a los reactores anaerobios de segunda generación como alternativas atractivas de tratamiento.

El RALLFA es el que más se ha aplicado y el que parece ser más atractivo, ya que soporta altas cargas orgánicas y requiere menor inversión al no necesitar material de soporte para la fijación de la biopelícula.

En cuanto a los costos de operación y mantenimiento, el RALLFA y el filtro anaerobio se muestran como los más económicos.

El RALLFA es un reactor que fue desarrollado en Holanda por Lettinga *et al.* (1980). Se les conoce por sus siglas en inglés como reactores UASB (Upflow anaerobic sludge blanket reactor).

Su funcionamiento se basa en la buena sedimentabilidad de la biomasa producida dentro del reactor, la cual se aglomera en forma de granos hasta de 5 mm de diámetro, evitando de esta forma ser arrastrados por el flujo ascendente del agua residual. Los granos presentan una elevada actividad metanogénica (alto potencial de depuración del proceso).

Cuando la distribución de la entrada de agua residual al reactor no es la adecuada, da lugar a zonas inactivas en la cama o lecho de lodos, provocando un bajo porcentaje de remoción. El agua atraviesa el manto de lodos en donde la materia orgánica es transformada en nuevos microorganismos y en compuestos químicos (mezcla gaseosa de metano y bióxido de carbono fundamentalmente).

Esta mezcla gaseosa, conocida como biogás, provoca a su vez una turbulencia en la cama de lodos que contribuye a una mejor distribución del agua alimentada e incrementa la transferencia de masa entre el medio líquido y los lodos.



El éxito de este proceso se debe a la constitución del lodo en pequeñas partículas muy activas y densas que evitan el taponamiento. Es importante utilizar lodos adecuados, de preferencia con un inóculo adaptado previamente al sustrato al cual se va a tratar, ya que si se utilizan otros inóculos no adaptados, la formación de granos es lenta, y por tanto el proceso no es aplicable.

Las cargas orgánicas alimentadas a este reactor pueden llegar hasta 30 kgDQO/m<sup>3</sup> día.

### **3.3.2 Selección del reactor aerobio**

#### **3.3.2.1 Reactor biológico rotatorio (RBR) o de biodiscos**

Entre los diversos sistemas de tratamiento aerobio anteriormente descritos, se seleccionó el reactor biológico rotatorio (RBR) por las diversas ventajas que ofrece respecto de los otros tratamientos disponibles.

En el desarrollo de procesos de tratamiento aerobio se ha encontrado que el reactor biológico rotatorio (RBR) o de biodiscos, debido a su bajo requerimiento energético, así como a sus necesidades mínimas de operación y mantenimiento en comparación con otros sistemas es una opción viable.

Es recomendable trabajar con aguas de bajo o mediano contenido de materia orgánica para que el oxígeno provisto por la rotación de los discos sea suficiente (transferencia de masa entre la biopelícula y el agua en tratamiento).

Este proceso consiste en un tanque longitudinal (conjunto de "tinajas" semicilíndricas), donde se alojan una serie de discos paralelos y planos de material plástico unidos entre sí, soportados en su centro por una flecha de acero inoxidable que corre a lo largo del conjunto. Los discos están sumergidos en un 40% de su superficie. La superficie de los discos se cubre con una flora microbiana (biopelícula) y adsorbe la materia orgánica coloidal y disuelta biodegradable presente en las aguas residuales. La acción de girar los discos hace que la biopelícula entre en contacto con el agua residual y con el aire en forma alterna. Cuando los discos salen del agua del tanque arrastran una capa líquida sobre la superficie de la película biológica, lo cual permite la oxigenación del agua y de los microorganismos.

Los microorganismos presentes en la película de lama crecen y según se engruesa, las regiones cercanas a la superficie sólida de soporte y más alejadas de la película de líquido se vuelven anaerobias, provocando un proceso de desprendimiento, donde el exceso de microorganismos que al metabolizar más

lentamente los nutrimentos, mueren y se desprenden gradualmente en el líquido mezclado, separándose posteriormente en un sedimentador secundario, constituyendo los lodos de purga del sistema (principalmente biomasa microbiana generada) y que hay que tratar antes de su disposición final. También el exceso de microorganismos se desprende de los discos debido a las fuerzas cortantes originados por la rotación de los discos al pasar por la superficie del agua (la capa líquida se renueva constantemente).

Una parte indispensable para la operación del reactor es la formación de la biopelícula y se divide en tres fases: inducción, acumulación y estabilización o "plateau" (Luna-Pabello, 1990).

La comunidad biológica que se desarrolla en este tipo de sistemas está compuesta por bacterias, algas, hongos, protozoos, rotíferos, nemátodos, crustáceos, larvas de insectos, arácnidos, entre otros.

Desde el punto de vista bacteriano, la bacteria aerobia, en presencia de oxígeno molecular libre en solución, emplea de 60 a 65% de la energía del sustrato en la síntesis de nuevas células,  $H_2O$ ,  $CO_2$  y en energía disipada en forma de calor.

Los microorganismos presentes dependen: de la naturaleza del material orgánico, del tipo de desecho, de la aireación del sistema y de las condiciones ambientales.

En la tabla 3 se presenta de manera resumida las principales ventajas y desventajas de un RBR y de un RALLFA.

En este trabajo experimental se detectaron deficiencias operativas en el reactor biológico rotatorio (RBR), debidas principalmente a las cargas orgánicas provenientes del sistema anaerobio, propiciando condiciones anaerobias, anóxicas y microaerobias. Por ello en la fase experimental II se llevó a cabo la prueba de biodegradabilidad rápida aerobia. Por medio de esta prueba se obtuvo información del grado de biodegradabilidad máxima de las aguas residuales del proceso de cempasúchil bajo condiciones aerobias.

Considerando lo anterior, se proporcionará mayor información al respecto en el siguiente inciso.

**Tabla 3. Ventajas y desventajas de un RBR y un RALLFA**

| Tipo de Reactor | Ventajas                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Desventajas                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| RBR             | <ul style="list-style-type: none"> <li>-Proveen una área para el desarrollo de los microorganismos adheridos</li> <li>-Proveen un contacto vigoroso de los microorganismos con las aguas residuales</li> <li>-Alta eficiencia de aireación de las aguas residuales con menor consumo energético</li> <li>-Permiten la agitación del licor mezclado para mantener los sólidos en suspensión</li> <li>-Alta concentración de microorganismos activos que permiten dar un tratamiento efectivo</li> <li>-Costos de operación y mantenimiento bajos</li> <li>-Necesitan tiempos de residencia hidráulicos cortos debido a la gran área superficial expuesta</li> <li>-No requieren recirculación de lodos</li> <li>-Puede tener mejor empleo en plantas pequeñas</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>-No pueden tratar flujos muy grandes de agua residual</li> <li>-Es posible conectarlos en serie y/o en paralelo, pero un número excesivo de unidades crearía problemas de mantenimiento</li> <li>-Requieren períodos largos para alcanzar la estabilidad</li> <li>-Medio positivo de continuo desprendimiento de biomasa en exceso</li> <li>-Para aguas residuales con alto contenido de materia orgánica el oxígeno provisto por la rotación de los discos no es suficiente</li> <li>-En algunos casos, los discos pueden presentar fracturas en su estructura y la ruptura de las flechas de soporte (fallas por fatiga)</li> </ul> |
| RALLFA          | <ul style="list-style-type: none"> <li>-Soporta altas cargas (&gt;20 ó 40 kgDQO/m<sup>3</sup>.d)</li> <li>-Bajos requerimientos de energía</li> <li>-No requiere medio de soporte</li> <li>-Construcción relativamente simple</li> <li>-Con inóculo apropiado puede arrancar de forma inmediata</li> <li>-Aplicable a pequeña y gran escala</li> <li>-Operación comparativamente simple</li> <li>-Proceso ampliamente probado</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | <ul style="list-style-type: none"> <li>-La granulación es lenta y no necesariamente controlable</li> <li>-No todas las aguas residuales favorecen la granulación</li> <li>-Requerimientos de inóculo de determinadas características</li> <li>-Sensible a sólidos suspendidos, grasas y aceites en el influente</li> <li>-Sensible a aguas que forman precipitados</li> <li>-Riesgo de flotación de los granos durante re arranques</li> <li>-Arranque lento si no se cuenta con inóculo adecuado</li> </ul>                                                                                                                                                                 |

Fuente: Casarrubias y Hernández, 1996

### 3.4 Generalidades sobre biodegradación

Se denomina biodegradabilidad a la descomposición de la materia orgánica natural o sintética por la acción de microorganismos del suelo o agua para la obtención de compuestos más simples (Albert *et al.*, 1995).

Si la molécula es biológicamente transformada de una forma orgánica a otra, no importando el grado en que esta transformación sea llevada a cabo, se dice que la molécula es biodegradable. Existen dos procesos de biodegradación de acuerdo al tipo de atmósfera en que se lleve a cabo: anaerobia y aerobia (Tortora *et al.*, 1992).

La biotransformación de contaminantes es facilitada por enzimas durante las funciones metabólicas normales de los microorganismos. Las poblaciones microbianas son capaces de asimilar el carbono orgánico presente en el sustrato y convertirlo a productos inorgánicos, durante esta transformación hay liberación de energía que permitirá elevar la capacidad biosintética y la incorporación de carbono como constituyente celular, observándose un incremento en número y biomasa de la población (Alexander, 1981).

Todas las pruebas de biodegradabilidad se basan en técnicas de cultivo de enriquecimiento donde la población inicial está compuesta por variedades de microorganismos tolerantes a un medio ambiente en particular, con el fin de disponer de varias rutas metabólicas para llevar a cabo la biodegradación del compuesto de interés (OECD, 1993).

Si una comunidad de microorganismos está expuesta a un sustrato determinado, bajo el cual está desarrollándose, en un momento dado, ese sustrato será metabolizado por los microorganismos, principalmente bacterias (Sánchez *et al.*, 1991).

De los diferentes microorganismos presentes en las aguas residuales, entre los que se encuentran bacterias (principalmente), algas, hongos, protozoos, rotíferos, nemátodos, crustáceos, larvas de insectos, arácnidos, entre otros. Se eligió trabajar con el grupo de bacterias ya que son muy abundantes y además se les atribuye entre el 50 y 80% de remoción de la materia orgánica disuelta presente en las aguas residuales.

Dado que este será el grupo de microorganismos sobre el cual está centrado el trabajo, más adelante serán incluidas sus características generales.

### 3.4.1 Clasificación de pruebas de biodegradabilidad

- **Pruebas de biodegradabilidad rápida:** Son pruebas con oportunidad limitada de que ocurran tanto aclimatación como biodegradación. Un resultado positivo de estas pruebas permite suponer que la sustancia evaluada podrá ser biodegradada rápida y completamente en el medio ambiente. Deben considerarse los efectos de factores abióticos del medio ambiente y el flujo de la sustancia dentro del ecosistema, ya que pueden generarse depósitos de sustancias más peligrosas.
- **Pruebas de biodegradación intrínseca:** Son pruebas que permiten la exposición prolongada de la sustancia de prueba con los microorganismos. Un compuesto que da un resultado positivo en esta prueba indica que la sustancia no permanecerá indefinidamente en el medio ambiente, pero como se utilizan condiciones favorables, no puede suponerse que la biodegradación se llevará a cabo de la misma manera en el sitio contaminado.
- **Pruebas de simulación:** Estas pruebas proveen de información acerca de la velocidad de biodegradación bajo condiciones ambientales relevantes. Con esta información se pueden calcular las concentraciones en el ecosistema. Se debe conocer la distribución de la sustancia en el medio ambiente así como toxicidad potencial de la misma. Debido a que estas pruebas buscan predecir el comportamiento de una sustancia en el medio ambiente, las pruebas se pueden subdividir de acuerdo al lugar que simulan ser en: tratamiento biológico anaerobio y aerobio, río, lago, estuario, etc (OECD, 1987, 1993 a, b).

#### 3.4.1.1 Prueba de biodegradabilidad rápida aerobia

El Grupo de expertos de la OECD recomienda una serie de pruebas para evaluar la biodegradabilidad rápida aerobia de compuestos orgánicos. Entre las pruebas clasificadas como OECD 301 se encuentra una conocida como prueba de AFNOR modificada, que se considera como positiva cuando hay una reducción del 70% de carbono orgánico disuelto (materia orgánica disuelta) después de un período estandarizado de 28 días.

El método clásico para demostrar la biodegradabilidad rápida consiste en incubar una solución o suspensión de la sustancia de prueba en un medio mineral con un inóculo bacteriano, bajo condiciones controladas durante un período de tiempo determinado de 28 días. La degradación es cuantificada mediante técnicas analíticas que miden la desaparición del compuesto de prueba como carbón orgánico disuelto (COD) o la actividad metabólica de las bacterias como producción de CO<sub>2</sub> o demanda bioquímica de oxígeno (DBO). Se ha concluido que

se reduce significativamente al mismo tiempo el número de microorganismos presentes en el sistema. Un inóculo mixto es recomendado para asegurar una amplia variedad de microorganismos.

Se recomienda un tiempo de prueba estandarizado de 28 días para obtener reproducibilidad de resultados, en caso de que la biodegradación haya comenzado, pero aún no se haya alcanzado una meseta después de 28 días, se recomienda continuar con la prueba hasta 42 días.

Existen similitudes en todas las pruebas, una de ellas es que la sustancia de prueba es la única fuente de carbono disponible para el desarrollo microbiano, el sustrato es expuesto a biomasa relativamente baja. Presentan como ventaja el hecho de ser aplicables a una amplia variedad de compuestos orgánicos.

Un resultado positivo de esta prueba permite suponer que la sustancia evaluada podrá ser biodegradada rápida y completamente en el ambiente (OECD, 1987, 1993 a, b).

En el siguiente inciso se hablará de las bacterias que son las principales responsables de la metabolización de la materia orgánica en los sistemas biológicos.

### **3.5 Aspectos generales sobre bacterias**

En la escala biológica universal, los organismos unicelulares han sido agrupados en dos tipos considerando las características del núcleo (estructura celular): los procariontes carecen de un núcleo definido, son organismos unicelulares de tamaño muy pequeño, que en general va de 1 a 10  $\mu\text{m}$ . Su DNA se encuentra en un nucleóide que no está rodeado por una membrana, la división celular es directa, principalmente por fisión binaria. El otro grupo son los eucariontes con un núcleo definido por una membrana. Estos organismos requieren de estructuras como los centriolos, microtúbulos o el huso mitótico que son esenciales para llevar a cabo la división celular (Sonea y Panisset, 1983; Margulis y Schwartz, 1985).

Desde 1968 las bacterias están oficialmente incluidas en el Reino Procarionta, debido a que carecen de un núcleo definido junto con las cianobacterias y las arqueobacterias. La gran mayoría de éstas son de vida libre y sólo unas pocas especies son parásitas pudiendo causar lesiones que se traduzcan en enfermedades (Rodier, 1989; Quentin y Russel, 1991; Romero, 1993).

Las bacterias juegan un papel esencial en muchos procesos relacionados con el hombre, tales como en la salud, la agricultura y la industria. Es en estas áreas donde la investigación ha sido más intensa. Sin embargo, recientemente se ha empezado a trabajar con las bacterias de vida libre debido a su importancia ecológica como el primer eslabón en las cadenas alimentarias, degradan los organismos muertos, y también sirven de alimento a otros organismos (Margulis y Schwartz, 1985; Postgate, 1992).

Las bacterias son los primeros pobladores e invasores de nuevos hábitats, pueden encontrarse casi en cualquier parte del planeta, ya que poseen un alto grado de especialización y pueden obtener la energía y los compuestos que necesitan de muy diversas fuentes. Las bacterias no sólo son muy diversas sino que también son muy abundantes. Se ha calculado que en cada gramo de tierra fértil o mL de agua residual se encuentran  $10^7$  bacterias (Hodgson, 1989; Postgate, 1992).

### **Forma y agrupación**

La gran mayoría de las bacterias miden de 1 a 10 micras de longitud, pero existen bacterias de mayor tamaño que pueden medir hasta 40 o 50 micras como los filamentos o los espirilos. Se observan en forma esférica, de bastón, de espirilos y se agrupan en forma muy característica para cada familia, género y especie.

### **Estructura**

Las estructuras de las células bacterianas son: la cápsula, la pared celular, la membrana citoplásmica, los flagelos, los pili, las fimbrias, y el citoplasma, no hay núcleo y no siempre tienen esporas. Algunas de estas estructuras son vitales para la bacteria (membrana citoplasmática y citoplasma) y existen otras estructuras (cápsulas, flagelos, pili y fimbrias, esporas) que se encuentran en algunas especies pero no en otras y que la pared que es una estructura que por regla se encuentra en todas las bacterias, tiene su excepción en los micoplasmas.

#### **3.5.1 Fisiología del crecimiento bacteriano**

El crecimiento bacteriano de mayor trascendencia es el que se refiere al aumento de la población, al número de bacterias y a la masa total de todo el conjunto de la población. Considerando así el crecimiento bacteriano, se deben definir los dos conceptos con los que se puede medir el crecimiento bacteriano. La concentración bacteriana es el número de células que se encuentran en un volumen determinado del medio de cultivo y densidad bacteriana, que es la masa total del conjunto de la población sin que importe el número de bacterias.

La concentración bacteriana, se mide por cuenta total, el cual es un procedimiento generalmente utilizado para determinar el número de bacterias viables en una muestra, se basa en diluirla y sembrar alícuotas en la superficie de un medio adecuado de agar. La muestra debe diluirse hasta un punto en que las colonias que crecen en superficie estén suficientemente separadas para que se pueda contarlas. El número de colonias refleja el número de bacterias vivas (por mL) en la muestra original de agua o, en forma más precisa, el número de unidades formadoras de colonia por mL, ya que es frecuente la producción de agregados. También se pueden hacer cuentas diferenciales mezclando el cultivo con un colorante como rojo neutro o rojo vital que tiñe las bacterias inactivadas, pero deja incoloras las bacterias viables. De esta manera puede conocerse en una cuenta el número de células vivas y el número de células muertas.

La densidad bacteriana puede medirse por varios métodos, como el peso seco de la masa total del crecimiento bacteriano, el volumen relativo de la masa celular con relación al volumen del medio de cultivo. También se puede medir la turbidez del medio de crecimiento en un fotocolorímetro o bien dosificar el nitrógeno proteínico que aumenta con el crecimiento de la masa celular.

Como todo organismo biológico, las bacterias tienen requerimientos para su metabolismo que pueden distinguirse como requerimientos nutritivos y requerimientos físicos ambientales.

### **Requerimientos nutritivos**

**Carbono:** Existen bacterias autótrofas o litótrofas que requieren de agua, sales inorgánicas y  $\text{CO}_2$  para su metabolismo, son bacterias que tienen un equipo metabólico muy complejo para la síntesis de compuestos orgánicos a partir de sales inorgánicas. Estas bacterias no necesitan parasitar organismos superiores, generalmente se encuentran en el suelo, en el agua y son de vida libre.

Las bacterias heterótrofas u organótrofas, requieren de compuestos orgánicos como fuente de carbono para su crecimiento, generalmente estas bacterias se encuentran sobre organismos superiores de donde obtienen los compuestos orgánicos o bien se encuentran en lugares donde existen materiales orgánicos en descomposición.

**Nitrógeno:** En la gran mayoría de las bacterias, el nitrógeno lo toman de la atmósfera y lo combinan con hidrógeno para formar  $\text{NH}_4^+$  el cual se utiliza para transferir N a los aminoácidos por la vía glutamato-glutamina que es la forma básica de aprovechamiento del nitrógeno.

**Iones inorgánicos:** Los elementos necesarios para el metabolismo de las bacterias son: azufre, fósforo, potasio, magnesio, calcio, hierro, manganeso, zinc,



cobre, cobalto, selenio y molibdeno, otros elementos pueden ser requeridos en forma particular por alguna especie o cepa bacteriana.

**Factores de crecimiento:** Son un grupo de sustancias que se encuentran íntimamente ligadas a las funciones de multiplicación bacteriana como son: las vitaminas del complejo B, los aminoácidos, las purinas y las pirimidinas.

**Oxígeno:** Es un elemento que juega un papel muy importante en el crecimiento bacteriano, a tal grado que su presencia puede inhibir el crecimiento de unas bacterias o también su ausencia puede inhibir el crecimiento de otras. En función de la necesidad del oxígeno, existen cinco grupos bacterianos:

a) Anaerobios estrictos, son aquellas que no pueden sobrevivir en presencia de oxígeno, debido a que se forman compuestos tóxicos que no pueden degradar como  $H_2O_2$ . La respiración anaerobia es una oxidación biológica en la cual sustancias inorgánicas distintas del oxígeno son utilizadas como últimos aceptores de electrones (hidrógenos).

b) Anaerobios aerotolerantes, son aquellos que viven en ausencia de oxígeno, pero que pueden adaptarse a la presencia de éste. En estos dos grupos, el metabolismo es esencialmente fermentativo.

c) Anaerobios facultativos, son aquellas que pueden crecer en presencia y en ausencia de oxígeno.

d) Aerobios estrictos, son aquellos que solo pueden utilizar el oxígeno como último aceptor de electrones.

e) Microaerofílicas, son las que necesitan tensiones bajas de oxígeno, generalmente éstas requieren de concentraciones mayores de  $CO_2$  de los que se encuentran en la atmósfera (0.03%), la mayoría necesita entre 5 y 10% en el medio ambiente ya que sus enzimas tienen baja afinidad por el  $CO_2$ .

### **Requerimientos físicos**

**Temperatura:** Es un factor importante en el crecimiento de las bacterias, ya que existen grupos bacterianos que crecen mejor a diferentes temperaturas, de esta manera podemos distinguir tres grupos:

a) Criófilos o sicrófilos, son las que crecen mejor a temperaturas bajas, el intervalo va desde  $-5^{\circ}C$  hasta  $20^{\circ}C$  con una media alrededor de los  $10^{\circ}C$ . Estas bacterias se encuentran en aguas frías, en el fondo del mar, en climas fríos, son de vida libre y no parasitan organismos superiores.

b) Mesófilos, son las que crecen a temperaturas medias, éstas son las que parasitan a organismos superiores, su mayor velocidad de crecimiento está en el intervalo de 20 a 40°C.

c) Termófilos, son los que crecen mejor a temperaturas altas, su intervalo de crecimiento va desde los 45 hasta los 60°C, éstas tampoco son parásitos, viven en aguas termales o en climas cálidos.

**Potencial de hidrógeno:** El pH es también un factor importante en el metabolismo y la reproducción de las bacterias, ya que la variación en éste puede llegar a inactivar el sistema metabólico y destruir a la bacteria, de esta forma tenemos tres tipos de bacterias:

a) Acidófilas, que crecen mejor a pH menor de 7.

b) Neutrófilas, que crecen a un pH alrededor de 7 con ligeras variantes y pueden parasitar organismos superiores.

c) Alcalófilas o basófilas, que son las que crecen mejor a un pH alto, mayor de 7.8.

**Potencial oxidorreducción:** Es un factor que influye en forma muy importante en todas las bacterias, en algunas de ellas, favorece el metabolismo y en otras lo inhibe.

En el medio ambiente, el  $E\lambda$  es de aproximadamente +0.2 a 0.4 V a un pH de 7, las bacterias aerobias crecen solamente con un mínimo de -0.2 V, las bacterias anaerobias crecen en un intervalo menor de  $E\lambda$  a -0.2 V.

### 3.5.2 Curva de crecimiento bacteriano

Cuando se han satisfecho los requerimientos nutricios y las condiciones ambientales cubren los requerimientos físicos, podemos medir la velocidad de multiplicación de las células bacterianas. La curva de crecimiento bacteriano muestra varias etapas (Rodier, 1989; Quentin y Russel, 1991; Romero, 1993):

1) **Fase de adaptación:** Es la etapa inicial del crecimiento de una población bacteriana en la que no se observa aumento en el número de bacterias (crecimiento lento); sin embargo, en esta etapa hay una acelerada actividad metabólica con formación de productos intermedios, se acumula una alta concentración de DNA y otros productos para el metabolismo.

2) **Fase logarítmica:** En esta fase, se observa un trazo recto en la gráfica en forma ascendente; significa un fenómeno logarítmico en la multiplicación bacteriana, es la máxima velocidad de multiplicación de esa especie, es en esta fase en la que podemos calcular el tiempo de generación.

3) **Fase estacionaria máxima:** En esta etapa, el trazo de la gráfica es horizontal, ya no aumenta el número de bacterias vivas como en la fase logarítmica. El número de bacterias viables y el número de bacterias inactivadas, se equilibra por un corto tiempo; esto se debe a que los nutrientes se están agotando, se acumulan productos tóxicos de desecho del metabolismo y el pH vira hacia la acidez, lo cual hace un ambiente nocivo para la vida bacteriana y sólo las bacterias más resistentes a estos factores logran sobrevivir y multiplicarse.

4) **Fase de declinación:** En esta fase que también se llama de muerte logarítmica, observamos un trazo recto descendiente en la gráfica de la curva debido a que un número mucho mayor de bacterias muere en relación con las que sobreviven, es decir que solamente las más resistentes pueden multiplicarse en las condiciones que se han generado en esta etapa, como son: la falta de nutrientes, la concentración crítica de productos tóxicos del metabolismo y el viraje de pH.

### 3.5.3 Metabolismo microbiano

Todas las bacterias organótrofas (heterótrofas), además de las enzimas propias de su metabolismo o endoenzimas, poseen varias exoenzimas que necesitan para degradar material orgánico de su entorno y que les servirá como nutrientes, de éstas, existen exoenzimas para polisacáridos, celulosa, almidón, pectinas, mucopolisacáridos como la quitina, ácido hialurónico y el condroitinsulfato, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Algunas de éstas son enzimas constitutivas pero la mayoría son enzimas inducidas que se producen cuando el sustrato se encuentra presente y se inhibe la producción cuando la concentración de los productos del sustrato se encuentran elevados.

Cuando los productos del sustrato se encuentran disponibles, se hace el transporte de membrana en forma activa, es una translocación que conduce a los productos al interior del citoplasma bacteriano. El transporte también se lleva a cabo por difusión facilitada por una proteína asociada a la membrana y sólo en casos excepcionales se hace por gradiente de concentración de solutos (Rodier, 1989; Ramírez-Gama *et al.*, 1992).

## Polisacáridos (Bacterias que degradan el almidón y la celulosa)

Muchos polisacáridos desempeñan el papel de elementos estructurales en las paredes celulares de los microorganismos unicelulares, en las plantas superiores y en las superficies exteriores de las células animales. Los polisacáridos estructurales proporcionan protección, forma y soporte a las células, a los tejidos o a los órganos.

La celulosa y el almidón son dos compuestos muy frecuentes en la naturaleza, ambos son polímeros de la glucosa, pero sus unidades se encuentran enlazadas de manera diferente, lo que afecta profundamente sus propiedades respectivas y determina que diferentes sistemas enzimáticos (celulasa y amilasa), y diferentes microorganismos intervengan en su degradación.

El **almidón** es característico de las células de las plantas, aparece intracelularmente, en forma de agrupaciones grandes o gránulos. Las moléculas de almidón se encuentran muy hidratadas ya que poseen muchos grupos hidroxilo expuestos. A consecuencia de ello, cuando el almidón se extrae de los gránulos con agua caliente forman disoluciones coloidales turbias o dispersiones. Abunda especialmente en los tubérculos, tales como la patata y en las semillas, especialmente en el maíz, pero la capacidad de sintetizar almidón la poseen las células de muchas plantas.

El almidón está formado por dos fracciones: amilosa y amilopectina. La amilosa es una cadena lineal formada por monómeros de glucosa unidos entre sí por enlaces  $\alpha$  1-4 glucosídicos. En la amilopectina, las unidades de glucosa están igualmente unidas por enlaces  $\alpha$  1-4 glucosídicos, pero la molécula está ramificada y las cadenas laterales están unidas por enlaces  $\alpha$  1-6 glucosídicos.

La hidrólisis del almidón es catalizada por tres tipos de enzimas: las amilasas  $\alpha$  y  $\beta$ , que actúan sobre las uniones  $\alpha$  1-4 de la amilosa y la amilopectina; la  $\beta$  amilasa hidroliza el segundo enlace del exterior liberando maltosa y dextrinas, la  $\alpha$  amilasa hidroliza enlaces al azar generando dextrinas, maltosa y glucosa. Las dextrinas u oligosacáridos lineales de bajo peso molecular, la maltotriosa y la maltosa son convertidos a glucosa por medio de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa.

En el laboratorio la presencia de almidón se hace evidente al agregar lugol con el que la amilosa forma un complejo de color azul, cuando el almidón ha sido transformado a dextrinas algunas de éstas reaccionan con el lugol y forman un color rojo, finalmente la lactosa y la glucosa no producen ninguna coloración.

La **celulosa** es una sustancia fibrosa, resistente, insoluble en el agua; se encuentra en las paredes celulares protectoras de las plantas, particularmente en los tallos, troncos y en todas las porciones leñosas de los tejidos de las plantas.

La celulosa es un homopolisacárido lineal, no ramificado, constituido por 10,000 o más unidades de D-glucosa unidas por enlaces 1-4 glucosídicos. En la celulosa los enlaces 1-4 se hallan en configuración  $\beta$ , debido a esto, las cadenas de D-glucosa de la célula adoptan una conformación extendida y experimentan una agregación lateral constituyendo fibrillas insolubles. La madera, el algodón, el papel y el cartón son, en su mayor parte, celulosa.

### **Proteínas (Bacterias proteolíticas)**

Las proteínas al igual que otros compuestos de peso molecular elevado, son convertidas en el exterior de la célula en fragmentos más pequeños.

La caseína es la principal proteína de la leche, ésta como la mayoría de los coloides no permite el paso de la luz. Para demostrar la producción de caseinasa se pueden utilizar tubos con leche estéril o agar nutritivo adicionado de una pequeña cantidad de leche. Los medios son inoculados, procediéndose a la incubación para favorecer el desarrollo del microorganismo, la síntesis de la enzima, su difusión al exterior y su actividad sobre el sustrato; la pérdida de opacidad en el contenido del tubo o alrededor de las colonias desarrolladas en la superficie del agar, constituyen una prueba inequívoca, de que los microorganismos produjeron caseinasa e hidrolizaron la caseína.

### **Disacáridos (Bacterias sacarolíticas)**

La posibilidad de que un microorganismo utilice estos compuestos como fuente de energía depende de la presencia y especificidad de enzimas apropiadas. Muchos microorganismos utilizan disacáridos para desarrollarse; en general, estos son convertidos antes en los monosacáridos que los forman por acción de enzimas específicas.

La sacarosa o azúcar de caña, es un disacárido constituido por glucosa y fructosa. Lo forman muchas plantas pero no aparece en los animales superiores. No contienen ningún átomo de carbono anomérico libre, ya que los carbonos anoméricos de sus dos unidades monosacáridas constituyentes se hallan unidos entre sí. Por esta razón la sacarosa no es un azúcar reductor. Aunque la D-glucosa es el sillar predominante del almidón y de la celulosa, la sacarosa constituye un producto intermediario principal de la fotosíntesis. En muchas plantas es la forma principal de transporte del azúcar desde las hojas a otras porciones de las plantas a través de sus sistemas vasculares. La ventaja de la sacarosa sobre la D-glucosa como forma de transporte del azúcar puede ser que sus átomos de carbono anoméricos se hallan unidos, con lo que la sacarosa está protegida de la oxidación o del ataque hidrolítico por las enzimas de las plantas hasta que alcanza su destino final en la planta.

La sacarosa es el más dulce de los tres disacáridos (sacarosa, lactosa y maltosa) comunes. En el laboratorio, cuando se quiere demostrar la capacidad de un organismo para utilizar la sacarosa como única fuente de carbono, es necesario emplear medios de cultivo desprovistos de cualquier otro tipo de fuente de carbono. El punto final de este ensayo es dado por la presencia o ausencia de colonias desarrolladas después de la inoculación e incubación del organismo en estudio ( Avilés et al., 1983; Leningher, 1990; Ramírez-Gama et al., 1992).

### 3.5.4 Cuenta de microorganismos

Para determinar si un suministro de agua es o no apto para el consumo, se requiere de cuatro tipos de análisis: (1) el análisis químico que determina la cantidad de materia orgánica presente, los sólidos totales, la dureza, etc y que descubre cualquier compuesto químico nocivo, como sales de plomo o zinc que son venenosos; (2) el examen físico determina si el agua tiene turbidez, color, sabor y olor inconvenientes; (3) el análisis biológico descubre algas, hongos, protozoos, gusanos nemátodos, las especies más pequeñas de crustáceos y larvas de insectos acuáticos; (4) el análisis bacteriológico, es el examen de más valor y de vital importancia en la prevención de epidemias resultantes de la contaminación del agua (Bryan, 1974; Bradshaw, 1976).

Existen numerosos métodos que permiten establecer el número de microorganismos en una muestra dada. El fundamento y el procedimiento de los diferentes métodos varía con los objetivos y aplicación que se pretenda dar a los resultados.

En general, los ensayos de cuenta microbiana se agrupan en: métodos directos y métodos indirectos; con los primeros se determina la cantidad total de microorganismos (vivos y muertos), en tanto que con los segundos se cuantifica únicamente a los microorganismos vivos (viables) (Avilés et al., 1983; Ramírez-Gama et al., 1992).

**Métodos indirectos:** El postulado básico en que se fundamentan, indica que cualquier célula viable inoculada en un medio de cultivo se multiplica y produce datos de fácil identificación tales como: la formación de colonias en placas de agar o la producción de turbidez, gas, o cambios de pH en los cultivos líquidos. Los métodos indirectos no ofrecen una confiabilidad absoluta para efectuar la estimación de todos los grupos microbianos existentes en una muestra. Esto se debe a que no existe ningún medio de cultivo o grupo de condiciones de incubación que permitan el desarrollo de todos los grupos microbianos. Lo anterior indica que el estudio de muestras con poblaciones heterogéneas, involucra el recuento de cada grupo microbiano o fisiológico por separado, en donde el microbiólogo empleará tantos medios de cultivo y

condiciones de incubación como grupos microbianos le interese cuantificar. A este grupo pertenecen las técnicas de recuento en placa.

**Método de dilución y vaciado en placa:** En esta técnica el producto líquido o una suspensión si fuera sólido se diluye de acuerdo con una progresión y de cada dilución se inoculan alícuotas en cajas de Petri, sobre éstas se adiciona un medio de cultivo solidificable y se llevan a incubación en condiciones definidas. Al cabo del período de incubación se cuentan las colonias que interesa estudiar, calculándose el número presente en la muestra original de acuerdo con la magnitud de la dilución practicada. Los errores más frecuentes en este método son dados por:

- a) La destreza del operador.
- b) La composición y el efecto bactericida del diluyente utilizado.
- c) El tiempo transcurrido desde la preparación de las diluciones y la adición del medio de cultivo a las cajas.
- d) El tiempo y la temperatura de incubación.
- e) La desigual distribución de los microorganismos en la muestra.
- f) Las condiciones de agitación de los frascos o tubos que contengan las diluciones.
- g) El tamaño de la alícuota original.
- h) La pureza de los medios de cultivo utilizados.
- i) La presencia de residuos en el material de laboratorio.
- j) La formación de colonias extendidas en el medio. La aparición ocasional de colonias mal definidas o escasamente visibles.
- k) Las variaciones en la temperatura en diferentes regiones dentro de la incubadora.
- l) Condiciones de stress en algunos microorganismos.

**Método de extensión superficial:** En este caso se emplean placas con el medio adecuado, el cual debe estar bien seco. Sobre éstas, se coloca un pequeño volumen de la muestra, el que se mide con una asa calibrada o con una microjeringa y se extiende sobre la superficie con la misma asa o con un extendedor. Esta técnica es menos exacta que la de placa vertida y frecuentemente durante el recuento, se producen dificultades ocasionadas por la carencia de uniformidad en la extensión de los microorganismos.

Cuando se ejecuta correctamente por un técnico adiestrado se logra un grado aceptable de precisión; sin embargo, es necesario disponer de las pipetas Pasteur calibradas con exactitud y en número suficiente para establecer la rutina dentro de un laboratorio. En la técnica por extensión en superficie, expertos señalan, que es suficiente una pipeta para el inóculo de todas las diluciones, aunque obviamente, es necesaria una varilla para extender el inóculo en cada caja.

Al desarrollar las técnicas en superficie para la cuenta de microorganismos, especial cuidado debe ponerse en la preparación de las placas previo a su inoculación; la superficie de la placa ha de encontrarse libre de humedad excesiva para evitar o limitar la confluencia y extensión del desarrollo bacteriano y permitir una definición clara de las colonias.

**Recuento por filtro de membrana:** Este procedimiento es muy útil para establecer el número de microorganismos en muestras que contienen una población muy reducida de microorganismos. En este caso, volúmenes grandes de aire o líquido se filtran a través de una membrana porosa con poros lo suficientemente pequeños (0.45 micras) para detener las bacterias. Luego el filtro se coloca sobre una almohadilla absorbente (en una placa Petri) saturada de un medio de cultivo adecuado. La caja Petri que contiene el filtro y la almohadilla es incubada en posición invertida durante 24 horas a la temperatura apropiada. Las colonias que se han desarrollado después de la incubación son contadas bajo una lupa iluminada o bajo un microscopio estereoscópico.

La técnica de filtración por membrana es esencialmente una técnica aséptica, es decir un procedimiento por el que el analista excluye de su cultivo todos los microbios del ambiente que puedan contaminar, previene la infección de su propio organismo. Por lo que crea para sí mismo en su lugar de trabajo un medio aséptico (campana de flujo laminar).

#### **Ventajas:**

- a) Tiene mayor grado de precisión que la técnica de tubos múltiples, proporcionando mayor grado de reproducibilidad de resultados.
- b) Se pueden examinar volúmenes mayores de muestra.
- c) El tiempo para la obtención de resultados numéricos es rápido.
- d) Reducción del tiempo requerido para la preparación de los medios de cultivo y de la vidriería.
- e) Economía de espacio en la incubadora.
- f) Reduce el tiempo requerido para las operaciones de inoculación, lectura y replicas de cultivos.
- g) Permite llevar a cabo filtración de muestras en el campo o en localidades distantes del laboratorio.
- h) Resulta útil para controlar posibles situaciones de urgencia en relación con el agua potable, así como para el estudio de distintos tipos de aguas naturales, pero no es oficialmente recomendable para ser empleada en la evaluación de aguas residuales.

A continuación, en el siguiente capítulo, se describe brevemente la estrategia de trabajo planteada para llevar a cabo el trabajo de investigación.



#### 4. ESTRATEGIA DE TRABAJO

El trabajo de investigación se dividió en dos fases experimentales.

La primera de ellas consistente en la evaluación del comportamiento depurativo de un reactor anaerobio tipo RALLFA conectado en serie con un reactor biológico rotatorio (RBR). La segunda fase experimental se enfocó a la biodegradación aerobia del agua residual pretratada anaerobiamente.

Cabe hacer mención que para la conceptualización de la fase experimental II, no se tomó como punto de referencia la concentración del efluente anaerobio como tal sino una concentración que eventualmente pudiera ser tratada por el RBR de manera aerobia. En consecuencia se optó por hacer una dilución con agua de la llave a una concentración preestablecida de aproximadamente 6000 mgDQO/L la cual en un principio puede ser factible de ser tratada aerobiamente en el RBR. Evidentemente, la adición de agua de la llave modificará significativamente la calidad inicial del efluente anaerobio, lo cual debe tenerse en cuenta para el uso que se pretenda dar a los resultados obtenidos de esta fase experimental.

En términos generales la primera fase experimental comprende el arranque y operación de un reactor anaerobio de lecho de lodos de flujo ascendente (RALLFA), al que se le aumentara progresivamente la concentración de materia orgánica disuelta alimentada y cuyo efluente será tratado mediante un RBR. El propósito de esta secuencia de tratamiento es aumentar el nivel de depuración logrado. Cabe señalar que de manera particular se efectuara la cuantificación de los principales microorganismos eucariontes tróficamente activos que se encuentran presentes en las diferentes cámaras del RBR.

En la segunda fase experimental se plantea evaluar la biodegradabilidad aerobia rápida del efluente anaerobio procedente del RALLFA a una concentración superior a 6000 mgDQO/L bajo condiciones aerobias. Para ello, se tomó como referencia la norma OECD 301 A, la cual permite determinar la biodegradabilidad aerobia rápida de compuestos solubles en agua bajo condiciones aerobias. En la realización de esta prueba se empleara un respirómetro automático Voith-Sapromat B-12, el cual regula la temperatura de los matraces a 20°C, permite una agitación constante y proporciona un aporte de oxígeno vía electroquímica acorde al requerimiento de la muestra.

De manera complementaria, durante la segunda fase experimental, se cuantificara la abundancia poblacional de los principales grupos bacterianos tróficamente activos, empleando para ello el método de extensión superficial y medios de cultivo selectivos.

Una descripción detallada de las metodologías empleadas en ambas fases experimentales se presentan en los capítulos siguientes.

## **5. FASE EXPERIMENTAL I**

### **TREN DE TRATAMIENTO BIOLÓGICO ANAEROBIO-AEROBIO**

## 5.1 OBJETIVOS

Los objetivos del presente trabajo experimental son los siguientes:

- Llevar a cabo el estudio de degradación biológica de las aguas residuales del proceso de cempasúchil empleando un sistema de tratamiento anaerobio-aerobio.
- Registrar los parámetros fisicoquímicos elegidos para conocer el perfil depurativo del sistema de tratamiento anaerobio-aerobio.
- Registrar a lo largo del RBR, la abundancia de los principales microorganismos eucariontes involucrados en la degradación de las aguas residuales de cempasúchil y asociarlos con los parámetros fisicoquímicos monitoreados.

## 5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.2.1 Propuesta de tratamiento anaerobio-aerobio

Con base en la fundamentación y justificación de los reactores empleados para el tratamiento de las aguas residuales del proceso de cempasúchil, a continuación se presenta el estudio de degradación biológica en un sistema de tratamiento anaerobio-aerobio.

La mayoría de los efluentes tratados por vía anaerobia pueden requerir un postratamiento (estará determinado por las condiciones particulares de descarga que le hayan sido fijadas a la empresa), ya que la remoción de materia orgánica disuelta en el agua residual no es del todo satisfactorio, no tienen oxígeno disuelto y las bacterias formadas no flocculan bien, encontrándose en forma coloidal en el seno del líquido tratado.

En la mayoría de los casos, el postratamiento se lleva a cabo mediante un proceso de tipo aerobio (reactor biológico rotatorio o de biodiscos), donde los microorganismos requieren de oxígeno molecular libre en solución para llevar a cabo sus funciones metabólicas.

El uso de reactores anaerobios cuando opera con lodos adaptados al agua residual para la remoción de materia orgánica presente en aguas residuales de tipo agroindustrial (con material biodegradable) tiene una capacidad degradativa

entre 60 y 90%, mientras que en un reactor biológico rotatorio (RBR) o de biodiscos es del 20 al 30% del contenido de material disuelto medido como demanda química de oxígeno.

### **5.2.2 Aguas residuales en estudio**

El agua residual empleada en estos experimentos provenía de la planta ubicada en Irimbo, Michoacán y se encontraban almacenadas en un cuarto frío a 4°C en el laboratorio del Programa de Ingeniería Química Ambiental y Química Ambiental (PIQAYQA), Facultad de Química. Estas aguas residuales fueron previamente tratadas en un reactor RALLFA y posteriormente en un reactor biológico rotatorio (RBR) a escala laboratorio.

### **5.2.3 Tratamiento anaerobio**

Para el tratamiento anaerobio se trabajó con un reactor de lecho de lodos de flujo ascendente (RALLFA). Está formado de un tubo cilíndrico de acrílico de 10.16 cm de diámetro interno y 128.75 cm de longitud. Consta además de una chaqueta envolvente de acrílico de 15.24 cm de diámetro interno y 65 cm de longitud, por donde se recircula el agua caliente para mantener la temperatura de operación fijada de (35°C), temperatura en la cual se favorece la metanogénesis (figura 2).

En la parte superior el reactor cuenta con un separador sólido-líquido-gas, construido con un embudo y una mampara de plástico, donde el efluente es separado del biogás y de la biomasa arrastrada por la generación de burbujas de gas.

Los lodos utilizados para operar el reactor se obtuvieron del Instituto de Ingeniería de la UNAM. Estos lodos estaban previamente adaptados para tratar vinazas.

Un requisito indispensable para iniciar dichos experimentos era lograr la estabilización del sistema de tratamiento anaerobio, verificando el parámetro de alcalinidad. Sin embargo si no se tiene una buena capacidad amortiguadora en el reactor, este puede acidificarse fácilmente, provocando inmediatamente una acidificación en el reactor de biodiscos.

El agua residual es alimentada por la parte inferior del reactor por medio de una bomba peristáltica marca Masterflex de 6-600 RPM, siendo succionada de un tanque de almacenamiento de 4 L de capacidad que contiene el agua en

tratamiento a temperatura ambiente. Se trabajó a un flujo volumétrico de 3.33 litros por día, equivalente a 2.73 mL por minuto lo que dió un tiempo de residencia hidráulico de tres días.

El reactor RALLFA fue alimentado gradualmente a diferentes cargas orgánicas (medida como DQO) de agua residual de cempasúchil (desde 5% hasta 50%). Era importante vigilar constantemente el funcionamiento del sistema anaerobio para mantener constante la salida de agua tratada (efluente anaerobio) hacia el sistema RBR (primera cámara), ya que esto permitía garantizar que las cámaras recibieran permanentemente y de manera secuencial agua residual (enviada a través de un sistema de manguera látex como tubería). La alimentación del reactor biológico rotatorio dependía de la carga orgánica (medida como DQO) del efluente anaerobio.

Las técnicas de análisis para evaluar tanto el influente como el efluente anaerobio se realizaron de acuerdo a los métodos estándar (APHA, 1981). Los análisis fisicoquímicos efectuados fueron:

pH.- Se midió con un potenciómetro Orión modelo 720 A, 5 veces por semana.

Temperatura (°C).- Se midió con un termómetro de mercurio, 5 veces por semana.

Demanda química de oxígeno (DQO).- Este análisis se realizó con una frecuencia de tres veces por semana, previa toma y centrifugación de las muestras (anexo A).

Sólidos.- La definición usual de los sólidos se refiere a la materia remanente después de que una solución acuosa ha sido sometida a evaporación y secado. Se efectuaron dos veces por semana (anexo A).

Alcalinidad y relación alfa, " $\alpha$ ".- La alcalinidad se define como la capacidad amortiguadora o "buffer" de un medio acuoso. Jenkins *et al.* (1991), propusieron una titulación de alcalinidad con un punto intermedio de pH a 5.75 (capacidad amortiguadora debida a bicarbonatos), además del común a pH de 4.3 (capacidad amortiguadora de los ácidos grasos volátiles). En el mismo sentido, Rojas (1988) propuso una relación alfa " $\alpha$ " entre ambas alcalinidades ( $\alpha = (\text{alc. } 4.3 - \text{alc. } 5.75) / \text{alc. } 4.3$ ), por lo que un sistema anaerobio tendrá una excelente capacidad amortiguadora cuando esta relación se aproxime entre 0.2 y 0.4 como máximo, que representará un 60% en capacidad amortiguadora. Este parámetro se registró diariamente.

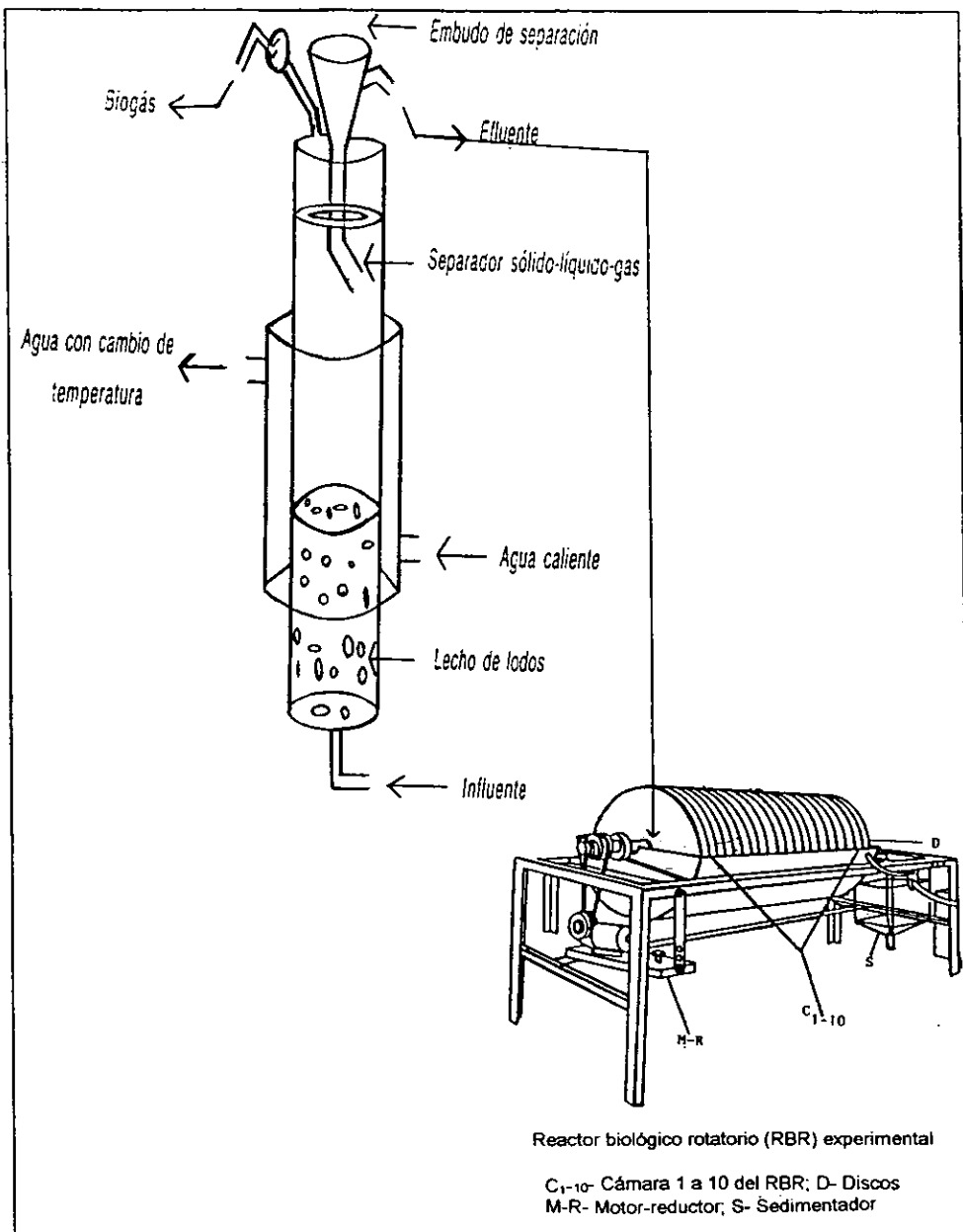
## 5.2.4 Tratamiento aerobio

Para el tratamiento aerobio se trabajó con un reactor biológico rotatorio (RBR) o de biodiscos con las siguientes características:

- 1.- Una base de lámina galvanizada y de forma semicilíndrica, subdividida en 10 compartimentos de igual tamaño, separados por mamparas de lámina galvanizada. Cada cámara intercomunicada mediante un par de ranuras laterales localizadas en la parte superior extrema de cada mampara, para permitir el paso del líquido residual a la siguiente cámara.
- 2.- Cada una de las cámaras tiene un volumen aproximado de 2 litros y 2 discos de 0.3 m de diámetro, los cuales se encuentran sujetos a un eje de acero inoxidable y el cual es movido a partir de poleas acopladas a un motor eléctrico con una velocidad de rotación de los discos de 28-30 rpm y con el 40% de su área total sumergida en el agua (tabla 4 y figura 2).
- 3.- Un sedimentador secundario de acrílico, donde se recogerá el líquido en tratamiento y se separará la biomasa microbiana generada (Luna-Pabello, 1987; 1990).
- 4.- Inclinación aproximada del reactor biológico rotatorio de 1.5 a 2° para que el líquido residual pase por las diferentes cámaras.

Tabla 4. Sumario de las dimensiones del reactor biológico rotatorio (RBR) experimental

| Característica                                   | Valor  |
|--------------------------------------------------|--------|
| Número de etapas                                 | 5      |
| Número de discos por etapa                       | 2      |
| Diámetro de los discos, cm                       | 30     |
| Espesor de los discos, cm                        | 0.3    |
| Área superficial total por etapa, m <sup>2</sup> | 0.2827 |
| Volumen de agua por etapa, m <sup>3</sup>        | 0.002  |
| Porcentaje sumergido                             | 40     |
| Velocidad de rotación de discos, rpm             | 28-30  |



**Fig 2. Representación esquemática del sistema de tratamiento anaerobio-aerobio conectados en serie (Luna-Pabello, 1990; Chávez, 1995)**

Antes de poner a funcionar el RBR que anteriormente se utilizó para tratar agua residual de cempasúchil, se procedió a limpiarlo de restos de biomasa seca, lavarlo, recubrirlo con pintura anticorrosiva, cambiar y ajustar correctamente algunos discos sobre el eje, dándoles una separación adecuada entre sí para evitar el rozamiento al formarse la biopelícula y tensar la banda de la polea del eje de discos.

El arranque del reactor se hizo con agua de la llave para detectar posibles fugas en el contenedor y entre mamparas, medir el volumen real de trabajo de cada cámara y total (solamente se utilizaron las primeras cinco cámaras), así como detectar posibles fallas en el motor y en el control de velocidad de rotación de los discos.

Para favorecer la formación de la biopelícula activa en el reactor, se elaboró un inóculo utilizando un matraz Erlenmeyer de 500 mL en el cual se mezclaron agua de la llave, agua de estanque y agua residual de cempasúchil. El inóculo se realizó bajo oxigenación constante con la finalidad de obtener la mayor diversidad posible de microorganismos aerobios. Este inóculo era diariamente adicionado a cada una de las cámaras del RBR, sin medir una cantidad definida.

Se mantuvo la rotación de los discos de 28-30 rpm durante toda la fase del experimento, con la finalidad de facilitar la adsorción de los compuestos orgánicos, la adhesión de los microorganismos al soporte, aumentar la eficiencia en la transferencia de oxígeno y lograr un mejor mezclado.

Los parámetros fisicoquímicos para evaluar el influente aerobio fueron: pH, temperatura (°C), demanda química de oxígeno (DQO) y sólidos (anexo A).

### **Determinación de la diversidad**

Con el propósito de determinar la diversidad de protozoos ciliados, flagelados, bacterias y micrometazoos establecidos en el reactor biológico rotatorio (RBR) desde el arranque hasta su estabilización se procedió de la siguiente manera:

Se hicieron observaciones al microscopio con contraste de fases (marca Olympus LHS con cámara fotográfica acoplada y de video integrado) del licor mezclado (agua en tratamiento) y de la biopelícula de cada cámara. Las observaciones llevadas a cabo al microscopio óptico se hicieron tres veces por semana.



Para la determinación de los ciliados, es necesario la elaboración de preparaciones tanto temporales (con y sin colorantes) como permanentes ya que de esta manera se distinguen estructuras que son de utilidad para la identificación.

En las preparaciones temporales, para retardar el movimiento ciliar se empleó metilcelulosa al 10%, se utilizaron colorantes vitales en solución acuosa, como azul de metileno y nigrosina, los que ayudan a resaltar estructuras citoplasmáticas, nucleares y ciliares, respectivamente (Kudo, 1969).

Para la elaboración de preparaciones permanentes fue necesario elaborar primero medios de cultivo con agua residual en tratamiento y de tres a cinco mL de infusión de chícharo o granos de arroz. Estos medios permiten la proliferación de bacterias y propician la multiplicación de los ciliados que se alimentan de éstas (Kudo, 1969). Esto no fue muy necesario ya que de la tercera a la quinta cámaras la abundancia de ciliados era adecuada (muy abundantes). De este modo, se elaboraron preparaciones permanentes. La técnica empleada fue la de Klein (1958). La técnica se describe en el anexo B.

Para la determinación de los ciliados observados a nivel de género se hicieron esquemas y se tomaron fotografías. La identificación se efectuó con ayuda de la literatura siguiente: Kudo (1969), Lee *et al.* (1985) y descripciones de Luna-Pabello (1987, 1990, 1993).

Para la determinación de la especie de cianofita, la literatura consultada fue la siguiente: Desikachary (1959) y Starmach (1966).

Para estimar la cantidad de microorganismos en un volumen de muestra conocido, se recurrió a la metodología propuesta por Lackey (APHA, 1990) modificada, debido a que ésta permite analizar volúmenes de muestra pequeños que van desde 0.01 a 0.1 mL. Se observaron 16 muestras al microscopio para aportar datos representativos. La descripción más amplia de la metodología de cuenta se encuentra en el anexo B.

## 5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.3.1 Tratamiento anaerobio

Los resultados obtenidos del tratamiento anaerobio de las aguas residuales de campasúchil se presentan en la tabla 5, donde se muestran los resultados promedio alcanzados para cada una de las concentraciones.

Es necesario utilizar un lodo previamente adaptado a condiciones anaerobias y al sustrato a depurar (agua residual) para lograr un mejor y rápido funcionamiento y estabilización del reactor, verificando el parámetro de alcalinidad. Sin embargo, si no se tiene una buena capacidad amortiguadora, el reactor puede acidificarse. El lodo utilizado como inóculo alcanzó una actividad estable en 10 días, lográndose la estabilidad y disminución en la demanda química de oxígeno.

El reactor fue alimentado a partir de 5.3 kgDQO/m<sup>3</sup>d (15800 mgDQO/L) hasta 17.4 kgDQO/m<sup>3</sup>d (52100 mgDQO/L) de carga orgánica de agua residual y a un TRH de tres días. La relación de alcalinidad siempre se mantuvo dentro de lo propuesto por Rojas (1988), es decir, dentro de 0.2 a 0.4 para que se considere como un buen sistema amortiguador. De este modo la relación de alcalinidades varió entre 0.12 y 0.32 con un promedio de 0.26 (tabla 5 y figura 3).

La figura 4 muestra como el pH del influente anaerobio fue controlado mediante la adición de bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>), primero en cantidades mayores para incrementar el valor de pH a 5.3 y, a partir de la concentración de 35%, se disminuyó la cantidad hasta alcanzar un valor de pH de 4.5 unidades, ya que el sistema trabajaba en buenas condiciones. En esta misma gráfica se aprecia cómo durante este período de estabilidad el valor de pH del efluente anaerobio se mantuvo siempre por arriba de un valor de pH de 7.70, con pequeñas variaciones y, en promedio, con un valor de pH de 7.80.

En este mismo período, los valores de alcalinidad se mantuvieron a 2487 mgCaCO<sub>3</sub>/L, a pH de 5.75 y de 3013 mgCaCO<sub>3</sub>/L, a pH de 4.30, con una relación de alcalinidad de 0.20 durante el período más estable (figura 5). En las figuras 6a, 6b, 6c, 7a, 7b y 7c se observa el comportamiento presentado por los sólidos totales (STT), totales volátiles (STV) y totales fijos (STF) así como de los sólidos suspendidos totales (SST), suspendidos volátiles (SSV) y suspendidos fijos (SSF) durante esta etapa.

El porcentaje de remoción promedio total de la DQO soluble alcanzado en el reactor es del 76% para las concentraciones de 32,720; 34,810 y 48,850 mgDQO/L, mientras que para las concentraciones entre 11,550 a 23,830 y 33,330 mgDQO/L fue del 63%. Este comportamiento se observa claramente en la tabla 5 y figuras 8a y 8b, en las cuales puede apreciarse la remoción de materia orgánica del efluente anaerobio con respecto del influente.

Tabla 5. Resultados promedio alcanzados de la operación del reactor RALLFA durante las diferentes etapas de alimentación

| Parámetro      | Unidades                | Concentración 15% |        | Concentración 20% |        | Concentración 25% |        | Concentración 30% |        | Concentración 35% |        | Concentración 40% |        | Concentración 45% |        | Concentración 50% |        |         |        |
|----------------|-------------------------|-------------------|--------|-------------------|--------|-------------------|--------|-------------------|--------|-------------------|--------|-------------------|--------|-------------------|--------|-------------------|--------|---------|--------|
|                |                         | Entrada           | Salida | Entrada           | Salida | Entrada           | Salida | Entrada           | Salida | Entrada           | Salida | Entrada           | Salida | Entrada           | Salida | Entrada           | Salida | Entrada | Salida |
| pH             |                         | 5.31              | 7.71   | 5.39              | 7.81   | 5.17              | 7.83   | 5.21              | 7.94   | 4.84              | 8.04   | 4.43              | 7.91   | 4.47              | 7.88   | 4.44              | 7.91   |         |        |
| Alc. 5.75      | mgCaCO <sub>3</sub> /L  |                   | 4544   |                   | 4105   |                   | 4893   |                   | —      |                   | 2487   |                   | 1997   |                   | 2573   |                   | 3439   |         |        |
| Alc. 4.3       | mgCaCO <sub>3</sub> /L  |                   | 5149   |                   | 6127   |                   | 6995   |                   | —      |                   | 3013   |                   | 2934   |                   | 3831   |                   | 5178   |         |        |
| Relac. alcal.  |                         |                   | 0.12   |                   | 0.32   |                   | 0.30   |                   | 0.30   |                   | 0.20   |                   | 0.28   |                   | 0.32   |                   | 0.29   |         |        |
| DQO t          | mg/L                    | 15800             | 6310   | 23950             | 10790  | 23280             | 8320   | 26810             | 8980   | 35470             | 9230   | 37260             | 10360  | 37400             | 19310  | 52100             | 14300  |         |        |
| DQO s          | mg/L                    | 11550             | 4010   | 20670             | 8200   | 21460             | 6900   | 23830             | 7040   | 32720             | 7340   | 34810             | 8990   | 33330             | 16230  | 48850             | 11470  |         |        |
| STT            | mg/L                    | 24280             | 7180   | 23260             | 10810  | 22970             | 10280  | 25750             | 10850  | 35650             | 15240  | 35920             | 13340  | 36330             | 24030  | 47510             | 25890  |         |        |
| STV            | mg/L                    | 17200             | 2360   | 14200             | 5260   | 15090             | 4180   | 16200             | 4940   | 26020             | 7090   | 27190             | 6740   | 25360             | 10550  | 25420             | 13460  |         |        |
| STF            | mg/L                    | 7080              | 4920   | 9060              | 5550   | 7880              | 6100   | 9550              | 5910   | 9620              | 7320   | 8730              | 6600   | 10970             | 13480  | 22090             | 12430  |         |        |
| Rem DQOt       | %                       |                   | 60     |                   | 55     |                   | 64     |                   | 67     |                   | 74     |                   | 72     |                   | 48     |                   | 73     |         |        |
| Rem DQOs       | %                       |                   | 65     |                   | 60     |                   | 68     |                   | 70     |                   | 78     |                   | 74     |                   | 51     |                   | 77     |         |        |
| Prod. biogás   | L/d                     |                   | 28.15  |                   | 62.32  |                   | 95.07  |                   | nd     |                   | nd     |                   | nd     |                   | nd     |                   | nd     |         |        |
| Carga orgánica | kgDQOs/m <sup>3</sup> d | 5.3               |        | 8.0               |        | 7.8               |        | 8.9               |        | 11.8              |        | 12.4              |        | 12.5              |        | 17.4              |        |         |        |
| (TRF)          | días                    |                   | 3      |                   | 3      |                   | 3      |                   | 3      |                   | 3      |                   | 3      |                   | 3      |                   | 3      |         | 3      |

nd= no determinado

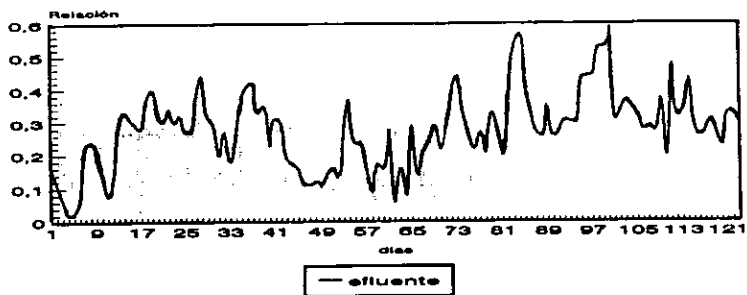


Figura 3. Relación de alcalinidad en el reactor anaerobio (RALLFA) con pH=5.75 y 4.30

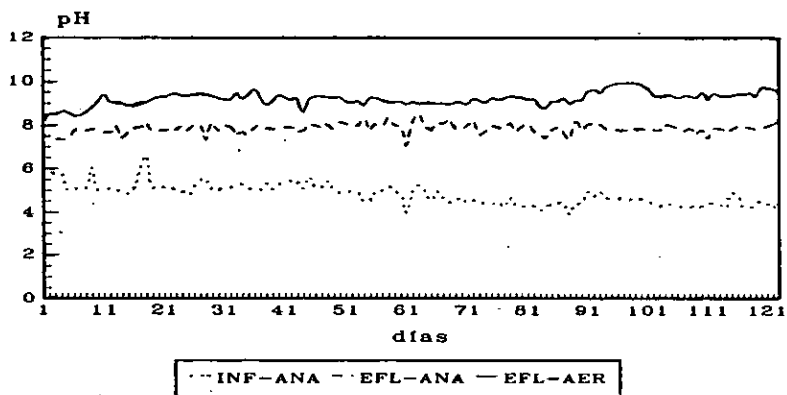


Figura 4. Comportamiento del pH registrado durante toda la fase de experimentación

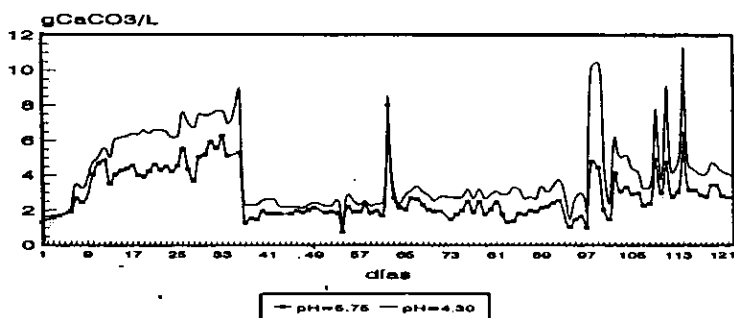


Figura 5. Comportamiento de la alcalinidad en el reactor anaerobio de lecho de lodos de flujo ascendente (RALLFA)

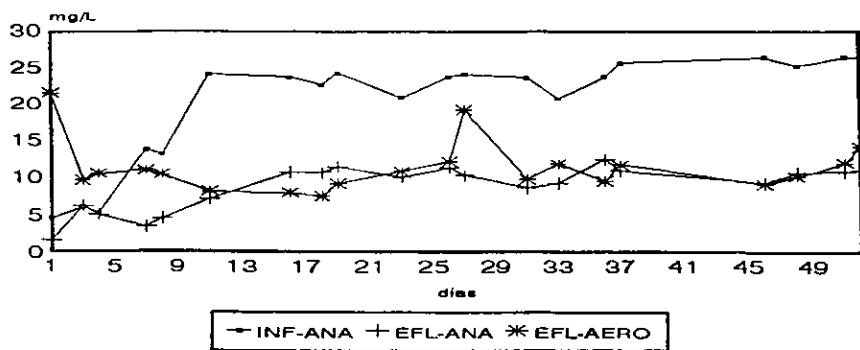


Figura 6a. Comportamiento de los sólidos totales (STT) registrados durante toda la fase de experimentación

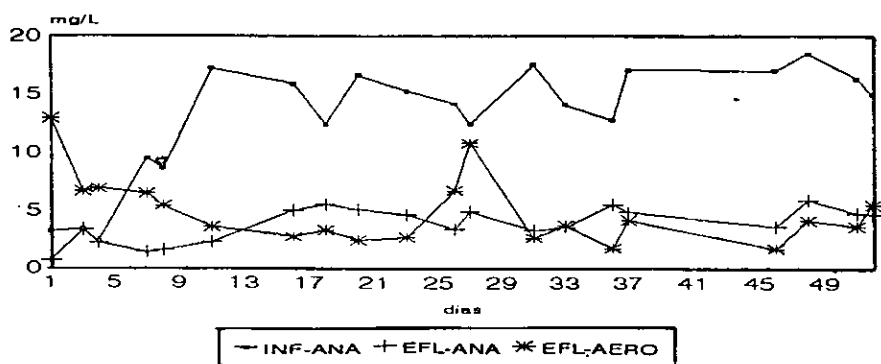


Figura 6b. Comportamiento de los sólidos totales volátiles (STV) registrados durante toda la fase de experimentación

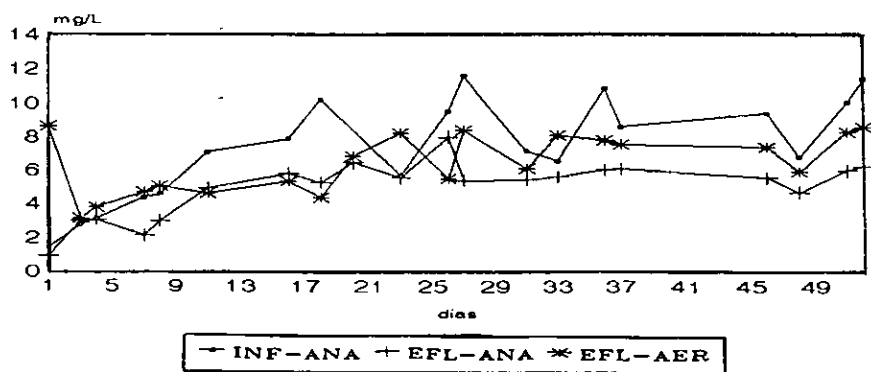


Figura 6c. Comportamiento de los sólidos totales fijos (STF) registrados durante toda la fase de experimentación

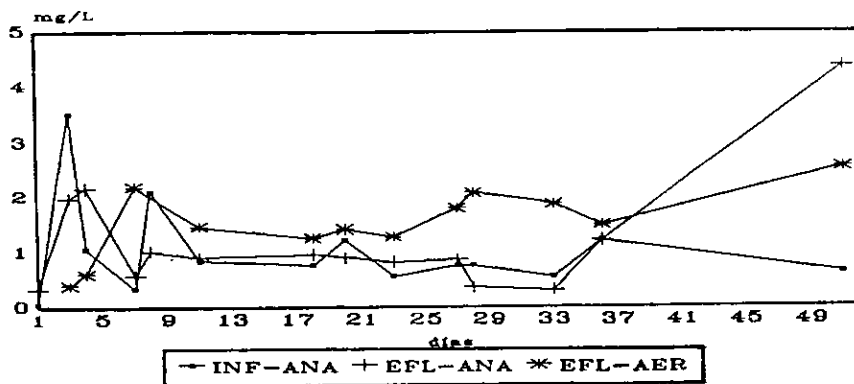


Figura 7a. Comportamiento de los sólidos suspendidos totales (SST) registrados durante toda la fase de experimentación

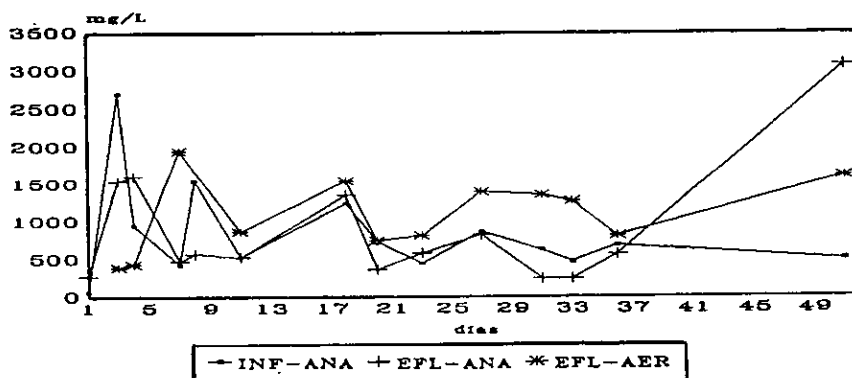


Figura 7b. Comportamiento de los sólidos suspendidos volátiles (SSV) registrados durante toda la fase de experimentación

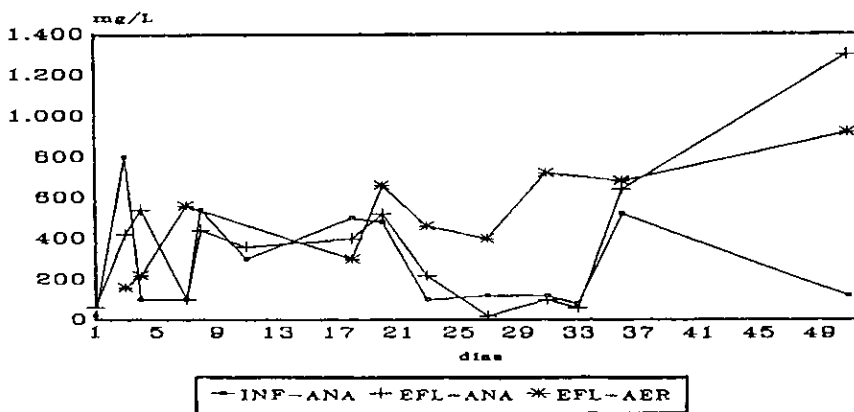


Figura 7c. Comportamiento de los sólidos suspendidos fijos (SSF) registrados durante toda la fase de experimentación

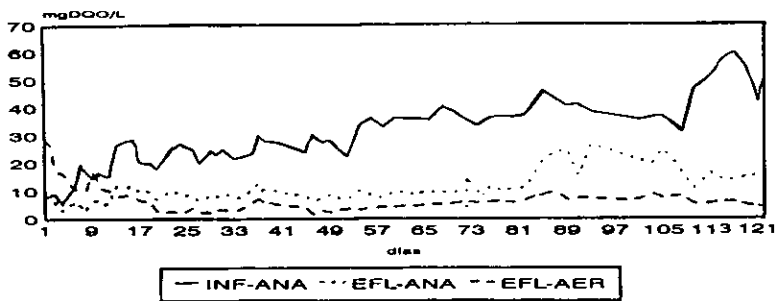


Fig 8 a. Comportamiento de la DQO total en el tren de tratamiento anaerobio-aerobio

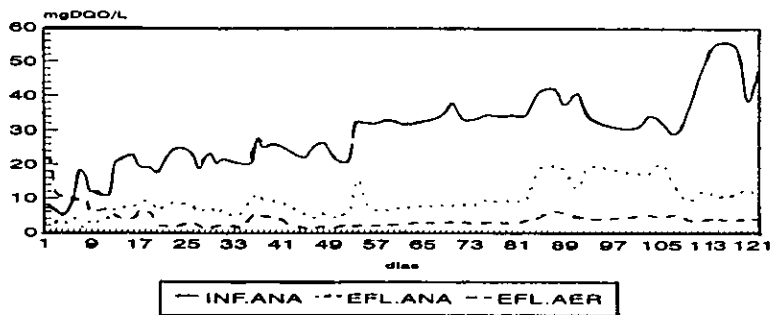


Fig 8 b. Comportamiento de la DQO soluble en el tren de tratamiento anaerobio-aerobio

### 5.3.2 Tratamiento aerobio

Los resultados obtenidos del tratamiento aerobio se presentan en la tabla 6, donde se muestran los resultados promedio alcanzados para cada una de las concentraciones.

El reactor aerobio fue alimentado a partir de 2.1 kgDQO/m<sup>3</sup>d (6310 mgDQO/L) hasta 4.7 kgDQO/m<sup>3</sup>d (14300 mgDQO/L) de carga orgánica de agua residual y a un THR de tres días.

Como puede observarse (tabla 6 y figura 4), el valor de pH promedio del efluente anaerobio llegaba a la primera cámara de pH=7.8 unidades, incrementándose hasta un pH=8.8. Esto es debido a los propios sistemas microbianos que, en la primera cámara, de manera activa, producen un amortiguamiento del valor de pH mediante el aumento en la cantidad de carbonatos y bicarbonatos producidos por el CO<sub>2</sub> generado principalmente por las bacterias y, a su vez, es en donde se tiene una mayor rapidez de reacción. Durante todo el tratamiento los valores de pH de las cámaras siempre se mantuvieron ligeramente básicos, oscilando entre 8.8 hasta 9.24 unidades (figura 9).

De acuerdo con los registros de temperatura promedio se detectó que ésta se mantuvo constante a 16°C con pequeñas variaciones. Esta variación se debió probablemente a la influencia de las oscilaciones de la temperatura ambiental ya que no se cuenta con una temperatura controlada en el laboratorio y ésta también depende de la época del año.

El porcentaje de remoción promedio total de materia orgánica medido como demanda química de oxígeno soluble (DQOs) fue del 64% para las concentraciones de 6,900; 7,040; 7,340; 8990; 11,470 y 16,230 mgDQO/L. Considerando los valores de DQO (tabla 6 y figuras 8a y 8b), se observa que existe una clara tendencia a disminuir sus concentraciones conforme el líquido avanza hasta la última cámara (efluente aerobio), presentándose en las dos primeras cámaras un alto porcentaje de remoción. Esto se debe a que, como la primera cámara y paulatinamente la segunda cámara, son alimentadas con el efluente anaerobio existe una alta concentración de materia orgánica, presentándose una alta abundancia de bacterias (se les atribuye entre el 50 y 80% de remoción de la materia orgánica disuelta) y protozoos flagelados.

Es importante resaltar que debe registrarse frecuentemente la cantidad de oxígeno disuelto en cada una de las cámaras para asegurar condiciones aerobias (mayor de 2 mg/L). En el laboratorio existe un medidor de oxígeno manual; solamente en algunas ocasiones se registró el oxígeno disuelto en cada una de las cámaras y se pudo observar que el RBR no alcanza la aerobiosis total, presentando condiciones anaerobias en las dos primeras cámaras, anóxicas y microaerobias hacia las últimas cámaras del reactor.



Tabla 6. Resultados promedio alcanzados de la operación del reactor biológico rotatorio (RBR) durante las diferentes etapas de alimentación

| Parámetro      | Unidades                 | Concentración 15% |        | Concentración 20% |        | Concentración 25% |        | Concentración 30% |        | Concentración 35% |        | Concentración 40% |        | Concentración 45% |        | Concentración 50% |        |
|----------------|--------------------------|-------------------|--------|-------------------|--------|-------------------|--------|-------------------|--------|-------------------|--------|-------------------|--------|-------------------|--------|-------------------|--------|
|                |                          | Entrada           | Salida | Entrada           | Salida | Entrada           | Salida | Entrada           | Salida | Entrada           | Salida | Entrada           | Salida | Entrada           | Salida | Entrada           | Salida |
| pH             |                          | 7.71              | 9.09   | 7.81              | 9.03   | 7.83              | 9.33   | 7.94              | 9.23   | 8.04              | 9.10   | 7.91              | 9.15   | 7.88              | 9.37   | 7.91              | 9.48   |
| DOO t          | mg/L                     | 6310              | 12710  | 10790             | 7520   | 8320              | 2910   | 8980              | 4270   | 9230              | 5720   | 10360             | 6310   | 19310             | 8660   | 14300             | 5590   |
| DOO s          | mg/L                     | 4010              | 6550   | 8200              | 5130   | 6900              | 1960   | 7040              | 2810   | 7340              | 3000   | 8990              | 3090   | 16230             | 6100   | 11470             | 4080   |
| STT            | mg/L                     | 7180              | 8200   | 10810             | 7850   | 10280             | 12250  | 10850             | 11140  | 15240             | 15210  | 13340             | 15210  | 24030             | 17970  | 25890             | 16210  |
| STV            | mg/L                     | 2260              | 3600   | 5260              | 2990   | 4180              | 4860   | 4940              | 3530   | 7090              | 6250   | 6740              | 6430   | 10550             | 7810   | 13460             | 13090  |
| STF            | mg/L                     | 4920              | 4620   | 550               | 4860   | 6100              | 7380   | 5910              | 7610   | 7320              | 8390   | 6600              | 8780   | 13480             | 10160  | 12430             | 3130   |
| Rem DOO:       | %                        |                   | --     |                   | 30     |                   | 65     |                   | 52     |                   | 38     |                   | 39     |                   | 55     |                   | 59     |
| Rem DOOs       | %                        |                   | --     |                   | 37     |                   | 72     |                   | 60     |                   | 59     |                   | 66     |                   | 62     |                   | 64     |
| Carga orgánica | kg DQO/m <sup>3</sup> ·d | 2.1               |        | 3.6               |        | 2.8               |        | 3.0               |        | 3.0               |        | 3.4               |        | 6.4               |        | 4.7               |        |
| (TRH)          | días                     |                   | 3      |                   | 3      |                   | 3      |                   | 3      |                   | 3      |                   | 3      |                   | 3      |                   | 3      |

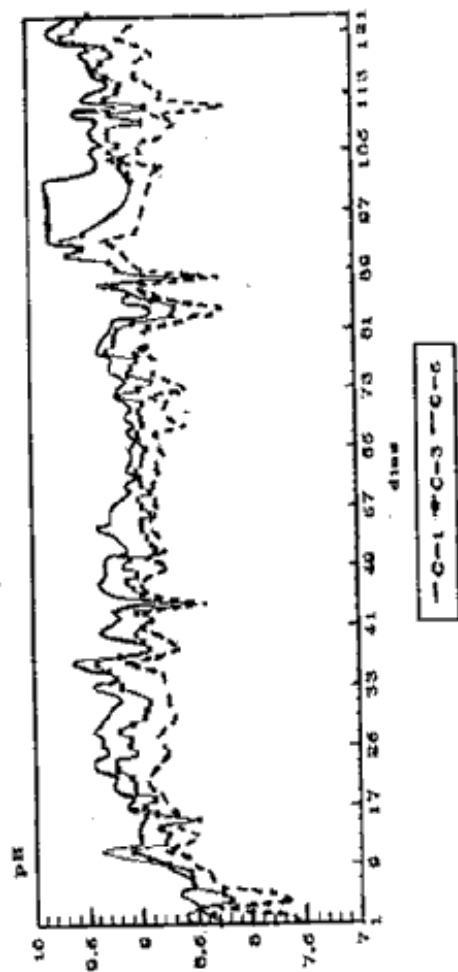


Figura 9. Comportamiento del pH registrado en cada una de las cámaras del RBR durante toda la fase de experimentación

Se recomienda operar el RBR a concentraciones moderadas de material orgánico biodegradable con un tiempo de residencia hidráulico largo para que presente eficiencias de remoción mayores que las alcanzadas a un tiempo de residencia hidráulico corto. Cuando se operaba a altas concentraciones (cambios bruscos de la carga orgánica en la alimentación) se provocó una acidificación del reactor, disminuyendo la eficiencia de remoción, aumentando la concentración de materia orgánica en el sistema (agua de color más oscuro), generando alta producción de espuma, provocando la desaparición de los protozoos ciliados y el desarrollo de gran cantidad de hongos (ya que el medio empezaba a presentar valores de pH ácidos), sobre los discos del eje como entre las mamparas, provocando que las regiones cercanas a la superficie sólida de soporte y más alejadas de la película de líquido se volvieran anaerobias, iniciándose un proceso de desprendimiento excesivo de la biopelícula biológica activa. La biomasa (principalmente biomasa microbiana generada) se depositó gradualmente en el líquido mezclado, separándose posteriormente en un sedimentador secundario.

En las figuras 6a, 6b y 6c, pueden observarse los resultados obtenidos del comportamiento de los sólidos totales durante la etapa experimental. Se observa que tanto los sólidos totales y como los totales volátiles presentan un decremento en su valor al pasar por el reactor anaerobio pero se mantienen constantes cuando pasan por el RBR. Sin embargo, los valores de los sólidos totales fijos se mantienen casi iguales; esto quiere decir que las sustancias inorgánicas propias del agua residual de cempasúchil no sufren ningún cambio al pasar por el sistema de tratamiento biológico en serie.

Por otra parte, se puede observar que los sólidos suspendidos (figuras 7a, 7b y 7c) del efluente aerobio se incrementaron; esto se debe a que en el reactor biológico rotatorio (RBR) se formaban a través del proceso, flóculos de biomasa que se encontraban suspendidos en cada una de las etapas. Esta producción de biomasa eran conglomerados de microorganismos como bacterias, flagelados, algas, protozoos y nemátodos. Al comparar estos resultados con los sólidos suspendidos del efluente anaerobio, los cuales no presentaron mayores cambios (se mantuvieron iguales que los del influente anaerobio), fue posible corroborar que los reactores anaerobios prácticamente no generan biomasa.

La importancia de la biomasa radica en que, tanto la biomasa adherida a la superficie de los discos como la biomasa generada durante el proceso, que se encuentra homogéneamente distribuida en las cámaras del RBR en forma de flóculos suspendidos (biomasa microbiana), llevan al aumento en el consumo de los compuestos biodegradables disueltos y, consecuentemente, a la disminución de los mismos. El agua tratada sale del reactor RBR y pasa a un sedimentador secundario, en donde la biomasa y el líquido tratado se separan por gravedad.

Es importante recuperar la biomasa producida y plantear la posibilidad de analizar su contenido de humedad, proteína, sustancias potencialmente tóxicas, etc, con objeto de saber si puede ser utilizada como fertilizante o para la alimentación de animales o, en tal caso, tratarlos para su disposición final.

Después de haber llegado a la etapa de experimentación en el reactor anaerobio a una carga orgánica de agua residual de cempasúchil de 52,100 mgDQO/L (50%), se presentó una acidificación en el reactor, debido a que se aumentó la carga orgánica de alimentación (70%-80%), repercutiendo inmediatamente en el reactor biológico rotatorio. Se tomaron algunas medidas para "recuperar" el RALLFA acidificado. El período de recuperación de un reactor anaerobio después de una acidificación es largo, por lo que este trabajo termina hasta estos experimentos (Casarrubias y Hernández, 1996).

### 5.3.2.1 Análisis microbiológico

Los valores promedio de los parámetros fisicoquímicos durante la etapa experimental no fueron limitantes para la presencia y proliferación de microorganismos (tabla 7).

Tabla 7. Valores promedio de los parámetros fisicoquímicos registrados durante la etapa de experimentación aerobia

| Parámetro          | 15%  | 20%  | 25%  | 30%  | 35%  | 40%  | 45%   | 50%   |
|--------------------|------|------|------|------|------|------|-------|-------|
| PH                 | 8.78 | 8.98 | 9.05 | 9.17 | 9.26 | 9.22 | 9.24  | 9.24  |
| Temperatura (°C)   | 16.4 | 16.3 | 16.4 | 16.5 | 16.3 | 16.4 | 16.3  | 16.3  |
| DQOs entrada, mg/L | 4010 | 8200 | 6900 | 7040 | 7340 | 8990 | 16230 | 11470 |
| DQOs salida, mg/L  | 6550 | 5130 | 1960 | 2810 | 3000 | 3090 | 6100  | 4080  |
| % Remoción         | —    | 37   | 72   | 60   | 59   | 66   | 62    | 64    |

Con respecto a los microorganismos que intervienen durante el proceso depurativo, se observaron principalmente los registrados en la tabla 8.

Tabla 8. Microorganismos que intervienen durante el proceso de degradación en el RBR

| Microorganismos |
|-----------------|
| Bacterias       |
| Flagelados      |
| Ciliados        |
| Algas           |
| Nemátodos       |

Los géneros registrados de protozoos ciliados durante el experimento fueron *Epistylis* y *Opercularia* y la especie de alga *Merismopedia tenuissima*. Estos solamente se determinaron a nivel de género pero no se llevó a cabo la cuenta de microorganismos.

De acuerdo con los registros de pH a lo largo del proceso depurativo (8.8 a 9.24 unidades) se puede afirmar, en general, que estos valores no representan un factor limitante para la presencia de ciliados.

La temperatura es constante (con pequeñas variaciones), pero de acuerdo con Kudo (1969), la temperatura óptima para la vida de los protozoos es de 16 a 25°C, por lo que tampoco representa un factor limitante.

En cuanto a los valores máximos y mínimos del contenido de materia orgánica medida como DQO durante el periodo de experimentación, tampoco fue un factor limitante para la presencia de ciliados (solamente dos géneros), pero si se opera a altas concentraciones de materia orgánica ésta puede ser una limitante para la presencia de protozoos ciliados.

El protozoo ciliado que se presentó con mayor abundancia durante la experimentación fué *Epistylis* y posteriormente *Opercularia*, aunque puede mencionarse que se presentaron de manera abundante formas móviles de peritricos. Estas formas se presentan con mayor frecuencia como respuesta a condiciones ambientales poco propicias para su establecimiento como colonias o como individuos solitarios. Durante el periodo de experimentación a una concentración de 35% (7340 a 3000 mgDQO/L) apareció repentinamente otro ciliado (*Oxytricha*) que solamente permaneció por unos pocos días.

Se podría considerar a *Epistylis* y *Opercularia* como organismos indicadores de saprobiedad (nivel de contaminación del agua) ya que toleran altas concentraciones de materia orgánica. No se presentaron especies de protozoos ciliados con características de indicador de una mejor calidad del agua. Se pueden considerar estos dos géneros, como importantes durante el tratamiento de depuración, ya que permanecen tróficamente activos (consumo de bacterias), lo cual redundaría en la obtención de un líquido más tratado.

Posiblemente durante todo el experimento sólo estos dos géneros se pudieron adecuar fisiológicamente al agua en tratamiento, para después desarrollarse y reproducirse, ya que datos recientes demuestran que este tipo de agua contiene compuestos tóxicos y poco biodegradables (Granados y López, 1996). Por esta razón se puede inferir que posiblemente no hubo proliferación de otras especies de protozoos ciliados que pudieran adecuarse a estas condiciones (Luna-Pabello, 1987, 1990, 1993).

Los microorganismos que intervienen durante el proceso depurativo experimental, se encuentran representados por ejemplares tanto del tipo procarionte (bacterias), como eucariontes (protozoos y nemátodos). Es importante recordar que las bacterias constituyen un alimento importante de los protozoos, además de que se les atribuye entre el 50 y 80% de remoción de la materia orgánica disuelta (Madoni, 1981). Referente a los protozoos (figuras 10 y 11), fue posible observar tróficamente activos, flagelados, ciliados y de manera abundante formas móviles de peritricos. Se llevó a cabo la cuenta de microorganismos solamente de los microorganismos que se observaron durante el proceso de degradación en el RBR (flagelados, ciliados y nemátodos).

Los resultados de la cuenta de microorganismos registrados en el equivalente a 1 mL de muestra a una concentración del 50% (11470 a 4080 mgDQOs/L) en el RBR, pueden observarse en la tabla 9. El número de organismos presentes por mililitro, de acuerdo con la técnica de Lackey (en APHA, 1990) descrita en el anexo B, se obtienen de multiplicar el valor de cada cifra individual por diez. Por otra parte, al transformar los resultados de la cuenta a porcentajes relativos (tabla 10 y figura 10), se observa que los flagelados se presentaron en mayor abundancia (64.78%) durante todo el tratamiento del líquido. En cuanto a los ciliados, estos fueron poco abundantes para las tres primeras etapas (cámaras), aumentando progresivamente al final del tratamiento, es decir, se presentaron durante los periodos de menor contaminación (34.47%). Los nemátodos (0.75%), al igual que, los ciliados, se presentaron durante los periodos de menor contaminación.

En términos generales, se observa, que los protozoos flagelados están siempre presentes en mayor abundancia en todas las etapas; para el caso de los ciliados, se presenta un aumento paulatino en la abundancia hacia las últimas tres etapas. Para el caso de los nemátodos aparecen a partir de la tercera y cuarta etapa del RBR (figura 11).

Tabla 9. Número total de microorganismos contados en 1 mL para cada etapa del RBR

| MICROORGANISMOS       |             |             |             |             |             |              |
|-----------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| No. de cámara (etapa) | 1           | 2           | 3           | 4           | 5           | TOTAL        |
| Flagelados            | 1790        | 1940        | 1960        | 2960        | 1760        | 10410        |
| Ciliados              | 100         | 210         | 400         | 2300        | 2530        | 5540         |
| Nemátodos             | 0           | 0           | 0           | 40          | 80          | 120          |
| <b>TOTAL</b>          | <b>1890</b> | <b>2150</b> | <b>2360</b> | <b>5300</b> | <b>4370</b> | <b>16070</b> |

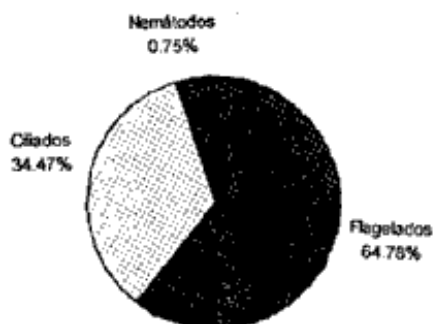


Figura 10. Porcentajes relativos, por grupos de organismos presentes en el RBR (DQO=11,700 a 4,080 mgDQO/L; pH=9.24 a 9.48; T(°C)=16; O.D=0.1 a 0.7 mgOD/L; sólidos totales=23,470 mg/L)

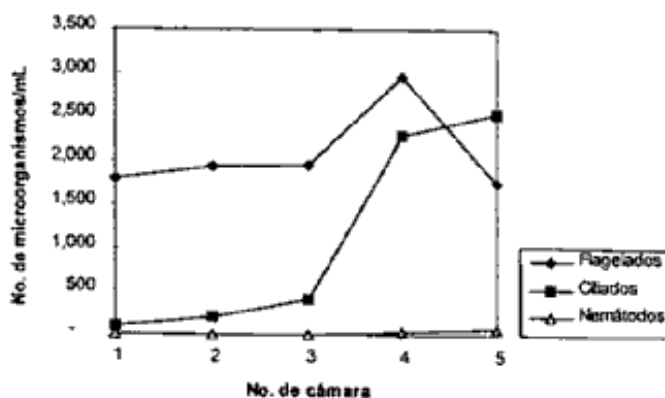


Figura 11. Tipo y abundancia de microorganismos presentes en 1 mL para las diferentes cámaras del RBR alimentado al 50% (DQO=11,700 a 4080 mgDQO/L; pH=9.24 a 9.48; T(°C)=16; O.D=0.1 a 0.7 mgO/L; sólidos totales=23,470)

Tabla 10. Porcentajes relativos, por grupos de organismos presentes en el RBR

| MICROORGANISMOS | (%)   |
|-----------------|-------|
| Flagelados      | 64.78 |
| Ciliados        | 34.47 |
| Nemátodos       | 0.75  |
| TOTAL           | 100   |

De lo anterior se infiere que no existe una amplia diversidad de microorganismos en el RBR. La presencia de los diferentes grupos de organismos encontrados confirma que el tipo de agua residual tratada, limita la proliferación de otros microorganismos usualmente presentes en aguas residuales contaminadas orgánicamente. Se observa con mayor claridad cuando el RBR es alimentado a una concentración mayor a 14,000 mgDQO/L, a la cual posiblemente se incrementa por la presencia de compuestos tóxicos y/o poco biodegradables (Granados y López, 1996).

Por otra parte, la distribución de estos organismos puede considerarse como de tipo "eurisaprobio" (del griego Euri= amplio y Sapro= podrido), es decir, que toleran amplios intervalos de concentración de material orgánico factible de descomponerse biológicamente. En este caso, dichos microorganismos son importantes desde el punto de vista de depuración, ya que permanecen tróficamente activos, lo cual redundará en la obtención de una mejor calidad del líquido tratado.

### 5.3.3 Evaluación global del tren de tratamiento anaerobio-aerobio

El porcentaje de remoción total de DQO soluble alcanzado en el sistema anaerobio-aerobio conectado en serie es del 91% para concentraciones de 21,460; 32,720; 34,810 y 48,850 mgDQO/L y, finalmente, para las concentraciones de 20,670; 23,830 y 33,330 mgDQO/L se obtuvo una remoción promedio total del 82% (tabla 11). Los porcentajes de remoción logrados durante todo el tratamiento anaerobio-aerobio son satisfactorios, pero se requiere de un tratamiento terciario y/o un tren de tratamiento de mayor complejidad para poder eliminar la mayor cantidad de materia orgánica presente y el color. Cabe mencionar que con este proceso biológico no es posible alcanzar la calidad de agua impuesta por la Norma Oficial Mexicana (NOM-064-ECOL/1995) para descargar agua residual de proceso de campasúchil a cuerpos receptores, clasificándola como medianamente biodegradable (Bernal, 1997).



Tabla 11. Resultados promedio alcanzados en el tren de tratamiento biológico anaerobio-aerobio durante el proceso de degradación

| Parámetro      | Concentración: 15% |        | Concentración: 20% |        | Concentración: 25% |        | Concentración: 30% |        | Concentración: 35% |        | Concentración: 40% |        | Concentración: 45% |        | Concentración: 50% |        |
|----------------|--------------------|--------|--------------------|--------|--------------------|--------|--------------------|--------|--------------------|--------|--------------------|--------|--------------------|--------|--------------------|--------|
|                | Entrada            | Salida | Entrada            | Salida | Entrada            | Salida | Entrada            | Salida | Entrada            | Salida | Entrada            | Salida | Entrada            | Salida | Entrada            | Salida |
| pH             | 5.31               | 9.09   | 5.39               | 9.03   | 5.17               | 9.33   | 5.21               | 9.23   | 4.84               | 9.10   | 4.43               | 9.15   | 4.47               | 9.37   | 4.44               | 9.48   |
| DQOt           | 15800              | 12710  | 23950              | 7520   | 23280              | 2910   | 26810              | 4270   | 35470              | 37260  | 6310               | 37400  | 8660               | 52100  | 5590               | 5590   |
| DQOs           | 11550              | 6550   | 20670              | 5130   | 21460              | 1960   | 23830              | 2810   | 32720              | 3000   | 34810              | 3090   | 33330              | 6100   | 48850              | 4080   |
| STT            | 24280              | 8220   | 23260              | 7850   | 22970              | 12250  | 25750              | 11140  | 35650              | 15210  | 35920              | 15210  | 36330              | 17970  | 47510              | 16210  |
| STV            | 17200              | 3600   | 14200              | 2990   | 15090              | 4860   | 16200              | 3530   | 26020              | 6250   | 27190              | 6430   | 25360              | 7810   | 25420              | 13090  |
| STF            | 7080               | 4620   | 9060               | 4860   | 7880               | 7380   | 9550               | 7610   | 9620               | 8390   | 8730               | 8780   | 10970              | 10160  | 22090              | 3130   |
| Rem DQO        |                    | 20     |                    | 69     |                    | 88     |                    | 84     |                    | 84     |                    | 83     |                    | 77     |                    | 89     |
| Rem DQOs       |                    | 43     |                    | 75     |                    | 91     |                    | 88     |                    | 91     |                    | 91     |                    | 82     |                    | 92     |
| Carga orgánica | 5.3                |        | 8.0                |        | 7.8                |        | 8.9                |        | 11.8               |        | 12.4               |        | 12.5               |        | 17.4               |        |
| (TRH)          |                    | 3      |                    | 3      |                    | 3      |                    | 3      |                    | 3      |                    | 3      |                    | 3      |                    | 3      |

## 5.4 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES DE ESTA FASE EXPERIMENTAL

### 5.4.1 CONCLUSIONES

1. Es necesario utilizar un lodo previamente adaptado a algún tipo de agua residual (sustrato) para un rápido funcionamiento y estabilización del reactor anaerobio.
2. La dilución del cempasúchil y su neutralización permitió que el lodo utilizado como inóculo, se adaptara rápidamente al agua derivada del ensilado y prensado del cempasúchil.
3. El pH ácido de las aguas residuales de cempasúchil alimentadas fue neutralizado por la generación interna de alcalinidad en el reactor anaerobio, alcanzando un valor de 9.24 a la salida del reactor biológico rotatorio aerobio.
4. Para optimizar la eficiencia de un sistema de tratamiento biológico es indispensable el conocimiento de las comunidades que en él intervienen y su correlación con los parámetros fisicoquímicos.
5. Los parámetros fisicoquímicos evaluados (pH, T, sólidos y DQO) se mantuvieron dentro de los intervalos adecuados para llevar a cabo la depuración biológica anaerobia-aerobia. Cuando la concentración de materia orgánica es alta, ésta actúa como un factor limitante para la presencia y proliferación de mayor número de microorganismos, principalmente de tipo eucarionte.
6. Durante toda la fase estable del tratamiento, solo se presentaron los ciliados de los géneros *Epistylis* y *Opercularia* los cuales se encontraron tróficamente activos y de manera abundante. Ambos géneros, no obstante, son de metabolismo aerobio pero toleraron bajas o nulas concentraciones de oxígeno disuelto para poder sobrevivir. También se encontró presente y de manera abundante el alga *Merismopedia tenuissima*.
7. Posiblemente bajo estas condiciones de operación no hubo una alta proliferación de especies, debido a que, según estudios recientes (Granados y López, 1996) es posible encontrar biocidas naturales presentes en la propia flor, lo cual afecta la eficiencia depurativa de los sistemas microbianos que coexisten en el reactor.

8. De manera global puede decirse que, bajo las condiciones de operación establecidas, el sistema de tratamiento biológico anaerobio-aerobio conectado en serie resultó ser un sistema de tratamiento adecuado para remover materia orgánica disuelta biodegradable en concentraciones mayores a 48,000 mgDQO/L y a un THR de tres días.

9. Un factor que resulta importante es la evaporación del agua en las cámaras del RBR durante el tratamiento. Por ello, el RBR debe tener un flujo de alimentación de agua constante mayor que la tasa de evaporación para evitar que el porcentaje de evaporación sea altamente significativo. Este parámetro debe tomarse en cuenta para hacer una correcta interpretación de los resultados obtenidos respecto, tanto de la concentración de la materia orgánica disuelta, como de los sólidos totales generados.

10. De acuerdo con los registros de oxígeno disuelto realizados en cada una de las cámaras del RBR, el sistema operó permanentemente bajo condiciones anaerobias, anóxicas y/o microaerobias.

11. Los valores obtenidos de la determinación de la demanda química de oxígeno (DQO) presentaron más del 10% de variación en los análisis consecutivos, pero siempre se encontraron dentro de un intervalo muy parecido. Dicha variación se debió a que la concentración de materia orgánica disuelta que salía del RALLFA y que alimentaba al RBR no siempre era la misma.

#### **5.4.2 RECOMENDACIONES**

1. Un rápido incremento en las cargas orgánicas aplicadas en los reactores anaerobios provoca la acidificación de los mismos. Es necesario el incremento gradual de la concentración de agua residual de cempasúchil para evitar estos problemas.

2. Es necesario vigilar constantemente al sistema anaerobio del taponamiento en el cono, ya que el reactor aerobio depende del efluente anaerobio como alimentación, por lo que si no se mantiene un flujo constante, el reactor aerobio no podrá recibir la totalidad del volumen de agua de trabajo, provocando la muerte de los microorganismos en la biopelícula de los discos.

3. Promover condiciones más adecuadas que favorezcan la presencia y proliferación de mayor cantidad de microorganismos en ambos reactores con la finalidad de aumentar la calidad del agua obtenida al final del tratamiento.

4. Procurar incrementar la concentración de oxígeno molecular disuelto del agua en tratamiento en el reactor de biodiscos para asegurar condiciones aerobias, debido a que el oxígeno es un factor limitante para la actividad metabólica de los microorganismos. Para ello, es necesario aumentar la velocidad de rotación de los discos. Debe tenerse cuidado en este parámetro dado que una velocidad de giro alta conlleva a un mayor esfuerzo de corte sobre la biopelícula, provocando problemas de desprendimiento y un aumento en el consumo energético. Por otro lado, una velocidad de rotación lenta puede provocar que el oxígeno sea el factor limitante en la transferencia de oxígeno en la biopelícula, ocasionando anaerobiosis en el sistema. Otra alternativa sería aumentar la relación área-volumen a efecto de garantizar una mayor aireación en el líquido residual bajo tratamiento.

5. Cuando se busque conocer la diversidad y abundancia de ciliados presentes en una agua de tipo agroindustrial bajo tratamiento, es necesario primeramente preparar un cultivo microbiano mixto y aclimatarlo paulatinamente al líquido a efecto de conocer la diversidad que potencialmente pueda estar presente. Posteriormente, debe observarse la diversidad persistente a este medio y, si no existe una diversidad amplia que amerite un estudio detallado de dichos microorganismos, es recomendable cambiar la estrategia experimental planteada.

6. Es necesario trabajar con concentraciones de materia orgánica, menores a las empleadas en el presente estudio con objeto de que el oxígeno disuelto provisto por la rotación de los discos sea suficiente para promover condiciones aerobias en el licor mezclado.

## **6. FASE EXPERIMENTAL II**

### **PRUEBA DE BIODEGRADABILIDAD AEROBIA RÁPIDA**

## 6.1 OBJETIVOS

Cómo siguiente etapa se plantea el estudio de la biodegradabilidad aerobia rápida del efluente anaerobio procedente del RALLFA, ello debido a que resulta interesante conocer que tan biodegradable es esta agua residual bajo condiciones aerobias, complementariamente se cuantificaran los diferentes grupos bacterianos que se encuentran tróficamente activos. Para ello se plantean los siguientes objetivos:

- Conocer la biodegradabilidad aerobia rápida de las aguas residuales del proceso de cempasúchil (previamente tratadas en un reactor anaerobio), empleando como referencia el procedimiento establecido en la norma OECD 301 A, pero utilizando para ello un respirómetro automático Voith-Sapromat B-12.
- Cuantificar por medio de la técnica de extensión superficial los principales grupos tróficos bacterianos de interés, utilizando diferentes medios de cultivo selectivos.

## 6.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.2.1 Prueba de biodegradabilidad aerobia rápida

Esta prueba se realizó tomando como referencia la OECD 301 modificada (Norma 301 A de la OCDE para determinar la biodegradabilidad rápida de sustancias orgánicas solubles en agua bajo condiciones aerobias) (OECD, 1993 a). Esta prueba consiste en depositar un volumen determinado de muestra preinoculada, conteniendo una concentración conocida, mantenida con aireación constante en la oscuridad o con luz difusa. El curso de la degradación es monitoreada por medio del análisis de DQO o COD a intervalos frecuentes de tiempo durante un periodo de 28 días.

El método clásico para demostrar la biodegradabilidad de un compuesto o como en este caso una muestra de agua residual, es realizar la medición de oxígeno consumido y/o eliminación de carbón orgánico disuelto durante un tiempo de prueba estandarizado de 28 días. En caso de que la biodegradación haya comenzado, pero no se ha alcanzado la fase de meseta después de los primeros 28 días de prueba, se recomienda continuar con la misma hasta los 42 días a efecto de ubicar el nivel de biodegradabilidad del compuesto o muestra bajo estudio (OECD, 1993 a). Debido a que no se cuenta con antecedentes sobre

el nivel de biodegradabilidad del efluente seleccionado, en este estudio se optó por efectuar la prueba experimental durante 42 días a fin de disponer de más puntos significativos y poder observar los niveles de biodegradación en función del tiempo.

Para llevar a cabo este tipo de análisis se empleó un respirómetro automático Voith-Sapromat B-12, el cual consta de 12 unidades de medición (matraces), uno por muestra y que funciona de manera simultánea. Este equipo regula la temperatura de los matraces a 20°C, agitación continua y un aporte de oxígeno acorde al requerimiento de la muestra (Manual del respirómetro, 1996). El procedimiento de su uso y una descripción más detallada del equipo se encuentra en el anexo A.

## **6.2.2 Elaboración del inóculo y preparación del agua residual en estudio**

En un matraz de 500 mL, se preparó un inóculo microbiano elaborado a partir de suelo, agua de la llave, agua estancada y agua residual a fin de obtener la mayor diversidad posible de microorganismos. El dispositivo funcionó completamente mezclado, tapado y burbujeado con aire para mantener condiciones aerobias (mayor de 2 mgOD/L).

Se recolectaron 1000 mL de agua residual pretratada anaerobiamente, la cual fue centrifugada con objeto de eliminar la biomasa microbiana presente. El contenido de materia orgánica disuelta fue de 13,700 mgDQO/L, el cual fue ajustado por dilución con agua de la llave a 6050 mgDQO/L. Posteriormente se adicionó un volumen de inóculo microbiano aclimatado de aproximadamente el 10% del volumen total de la muestra, lo anterior con objeto de obtener la muestra a una concentración conocida y uniformemente inoculada. El pH inicial de la muestra fue de 8.35 unidades, se adicionó ácido sulfúrico diluido para ajustar el pH a un valor de 7.24 unidades con el fin de favorecer el crecimiento de los microorganismos.

Cabe señalar que se optó por utilizar efluente anaerobio diluido debido a que el RBR empleado en la secuencia de tratamiento anaerobia-aerobia no puede operar aerobiamente cuando es alimentado con el efluente concentrado. Por otro lado, trabajos experimentales anteriormente realizados señalan que la máxima concentración orgánica a la que se puede operar este tipo de reactores con 80% de las cámaras de manera aerobia es, aproximadamente, de 2,000 mgDQO/L y 585 mgDBO<sub>5</sub>/L (Luna-Pabello, 1990; Briones *et al.*, 1993).

En consecuencia, para que los resultados de esta fase experimental puedan tener alguna utilidad para ser aplicados en el entendimiento del comportamiento de un reactor aerobio de tipo RBR, se decidió manejar la concentración antes señalada.

### 6.2.3 Análisis fisicoquímico del agua a tratar

A cada uno de los 11 matraces empleados se le adicionaron 250 mL del agua residual preinoculada, un matraz con agua destilada se utilizó como control. El estudio de biodegradación se realizó bajo condiciones constantes de temperatura, agitación controlada y aporte de oxígeno acorde al requerimiento de la muestra.

En tiempos preestablecidos (3, 5, 7, 12, 14, 16, 23, 28, 33, 37 y 42 días) se fue retirando (sacrificando) un matraz para el análisis de parámetros fisicoquímicos de pH, temperatura (°C), oxígeno disuelto (OD), concentración de materia orgánica disuelta (medida como DQOs y DBO<sub>5</sub> respectivamente), sólidos totales (STT), totales volátiles (STV) y totales fijos (STF) (APHA, 1981, 1990). La aplicación sistemática de las pruebas de DQO y DBO<sub>5</sub> permitieron conocer la cantidad de materia orgánica disuelta que queda en solución después de un determinado tiempo de permanencia dentro del sistema así como el nivel correspondiente de biodegradación. En el anexo A, se presenta la descripción más amplia de la metodología de cada una de las técnicas.

### 6.2.4 Análisis bacteriológico

Estos se realizaron también en cada uno de los 11 matraces retirados del respirómetro en los tiempos específicos.

El análisis bacteriológico para el seguimiento de los principales grupos bacterianos tróficamente activos se llevó a cabo por el método de extensión superficial (Ramírez-Gama *et al.*, 1992; Schade y Lemmer, 1994). La descripción más amplia de la metodología se encuentra en el anexo D.

Para observar la actividad enzimática microbiana, a 24 y 48 horas de cultivo, se prepararon medios de cultivo específicos y se inocularon con microorganismos en estudio. Los medios específicos utilizados para el cultivo fueron (DIBICO, 1989, DIFCO, 1984, 1990; Ramírez-Gama *et al.*, 1992):

**agar nutritivo:** Para la cuenta de bacterias mesófilas aerobias (cuenta total). Contar todas las colonias desarrolladas sobre la superficie del medio.

**agar leche-descremada:** Para la cuenta de bacterias proteolíticas. Contar todas las colonias típicas con halo transparente (pérdida de opacidad alrededor de las colonias) desarrolladas sobre la superficie del medio.



**agar almidón:** Para la cuenta de bacterias amilolíticas. Contar todas las colonias típicas con halo de color rojo o transparente desarrolladas sobre la superficie del medio.

**agar celulosa:** Para la cuenta de bacterias celulolíticas. Contar todas las colonias desarrolladas sobre la superficie del medio.

**medio mínimo:** Para la cuenta de bacterias sacarolíticas. Contar todas las colonias desarrolladas sobre la superficie del medio.

De aquí se calcularon para todos los casos, la cantidad de microorganismos por mililitro de muestra y se expresaron los resultados como unidades formadoras de colonias (UFC).

### 6.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se presentan los valores obtenidos de la evaluación fisicoquímica y bacteriológica de cada uno de los matraces para cada uno de los tiempos preestablecidos.

En la tabla 12, puede observarse que el valor de pH inicial se ajustó a un valor cercano al neutro, con el fin de que no constituyera un factor limitante para el crecimiento de las comunidades microbianas inoculadas. Durante toda la fase experimental los valores de pH siempre se mantuvieron básicos oscilando entre 8.88 hasta  $9.75 \pm 0.2$  unidades. Cabe recordar que debido a que el experimento se realizó en el respirómetro automático Voith-Sapromat B-12, la temperatura pudo mantenerse constante a  $20^{\circ}\text{C}$  con un aporte de oxígeno vía electrolítica acorde con los requerimientos del matraz de reacción o de prueba.

En la tabla 12 y figura 12, se observa el consumo de oxígeno en las diferentes muestras, producto de la actividad metabólica de las poblaciones microbianas. Asimismo, se observa que aumenta el oxígeno disuelto paulatinamente, conforme el tiempo de degradación transcurre (0.3 a 7.6 mgOD/L), logrando concentraciones de 2 mg/L a partir del día 16 y verificándose que el sistema en este punto presenta condiciones aerobias, ello como consecuencia del continuo aporte de oxígeno suministrado por el matraz generador de oxígeno vía electrolítica.

Este incremento del consumo de oxígeno, indica que existió actividad biológica de los microorganismos y, por tanto, degradación de la materia orgánica disuelta presente en el agua residual. La actividad biológica comienza a

descender a partir del quinto día. A partir del día 28 la curva indicaría un consumo de oxígeno influenciado por reacciones de nitrificación (tabla 12 y figura 12).

En la tabla 12 y figura 13 se observa el comportamiento de la tasa de consumo de oxígeno (TOC) por día que requirieron los microorganismos para llevar a cabo la degradación de la materia orgánica disuelta presente en el agua residual. A los tres días de incubación se registró un TOC de 310 mgO<sub>2</sub>/L, incrementándose al día cinco a 395 mgO<sub>2</sub>/L, este consumo de oxígeno se debe probablemente a que existe un aumento en el número de bacterias heterótrofas que requieren de mayor consumo para degradar la materia orgánica disuelta de tipo carbonoso, observándose un porcentaje de remoción del 36.7%. A partir del día siete hasta el día 14 se observa una disminución poco variable del consumo de oxígeno debido a que las poblaciones bacterianas probablemente se encuentran en una fase estacionaria, alcanzando un porcentaje de remoción acumulado del 77.8%.

También se observa que entre el día 16 y 28 existe una caída drástica en la disminución del consumo de oxígeno, debido a que las poblaciones bacterianas disminuyen en número y por tanto la necesidad de consumo de oxígeno para poder degradar la materia orgánica de tipo carbonoso es poco, observándose que no se registra una disminución en la concentración de materia orgánica e indicando que probablemente toda la materia de tipo carbonoso se ha degradado. Después del día 28 hasta el día 42 se observa un aumento en el consumo de oxígeno, indicando que las poblaciones bacterianas establecidas son de otro tipo que no requieren como sustrato carbono sino compuestos nitrogenados como amonio, nitrato (proceso de nitrificación).

El porcentaje de remoción total de la DQOs alcanzado en el respirómetro automático es del 78.9% en 28 días, por lo que estas aguas residuales pueden considerarse como rápidamente biodegradables, ya que alcanzaron más del 70% de pérdida de materia orgánica disuelta, medida como DQO en 28 días. Puede observarse que este nivel de biodegradación se alcanzó en diez días. Finalmente el porcentaje de remoción de materia orgánica, medida como DQO soluble fue de 85% en 42 días (figura 14).

Tabla 12. Valores de los parámetros fisicoquímicos registrados en los tiempos de muestreo preestablecidos

| No. de Matraz | Tiempo (días) | PH unidades | O.D (mgOD/L) | SIT (mg/L) | STV (mg/L) | STF (mg/L) | DQOt (mg/L) | DQOs (mg/L) | %R DQOs acum. | CO acum. (mg/L) | TCO (mg/L d) |
|---------------|---------------|-------------|--------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|---------------|-----------------|--------------|
|               | 0             | 7.24        | ---          | 10080±240  | 4020±80    | 6060±160   | 6560        | 6050        | ---           | ---             | ---          |
| 1             | 3             | 8.93        | 0.3          | 9620±40    | 4040±280   | 5580±240   | 4330        | 3830        | 36.7          | 930             | 310          |
| 2             | 5             | 8.97        | 0.3          | 8590±100   | 3340±240   | 5610±140   | 3540        | 3050        | 49.5          | 1720            | 395          |
| 3             | 7             | 8.91        | 0.3          | 9130±60    | 3690±60    | 5440±0     | 2890        | 2520        | 58.3          | 2210            | 245          |
| 4             | 12            | 8.93        | 0.4          | 9140±80    | 3440±280   | 5700±200   | 2880        | 1730        | 71.4          | 3270            | 212          |
| 5             | 14            | 8.90        | 1.1          | 9000±0     | 3490±260   | 5510±260   | 2840        | 1340        | 77.8          | 3700            | 215          |
| 6             | 16            | 8.88        | 2.0          | 8630±60    | 3380±80    | 5250±140   | 2540        | 1310        | 78.4          | 3900            | 100          |
| 7             | 23            | 9.03        | 4.6          | 8350±140   | 3130±260   | 5220±120   | 1960        | 1280        | 78.8          | 4690            | 113          |
| 8             | 28            | 9.25        | 6.7          | 8260±60    | 2273±60    | 5987±120   | 1720        | 1280        | 78.9          | 4720            | 6            |
| 9             | 33            | 9.19        | 7.2          | 8010±220   | 2460±160   | 5550±50    | 1970        | 1040        | 82.8          | 6520            | 360          |
| 10            | 37            | 9.40        | 7.6          | 8290±180   | 2160±160   | 6130±20    | 1940        | 970         | 83.9          | 7410            | 222          |
| 11            | 42            | 9.75        | 6.7          | 7570±40    | 2020±80    | 5550±160   | 1590        | 920         | 84.7          | 8350            | 188          |

--- No determinado

CO acum = Consumo de oxígeno acumulado

TCO = Tasa de consumo de oxígeno por día

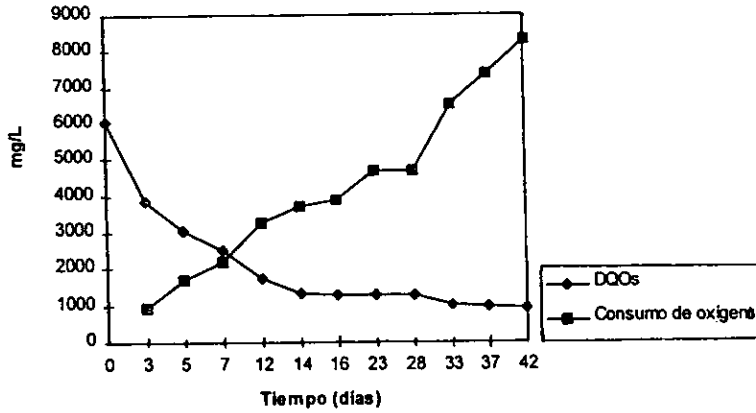


Figura 12. Comportamiento de la DQOs y consumo de oxígeno en cada uno de los matraces del Voith-Sapromat B-12

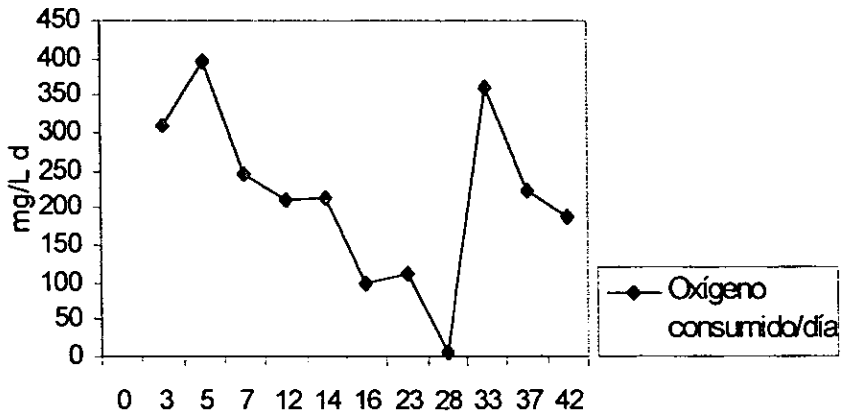


Figura 13. Comportamiento del oxígeno consumido por día en el respirómetro Voith-Sapromat B-12

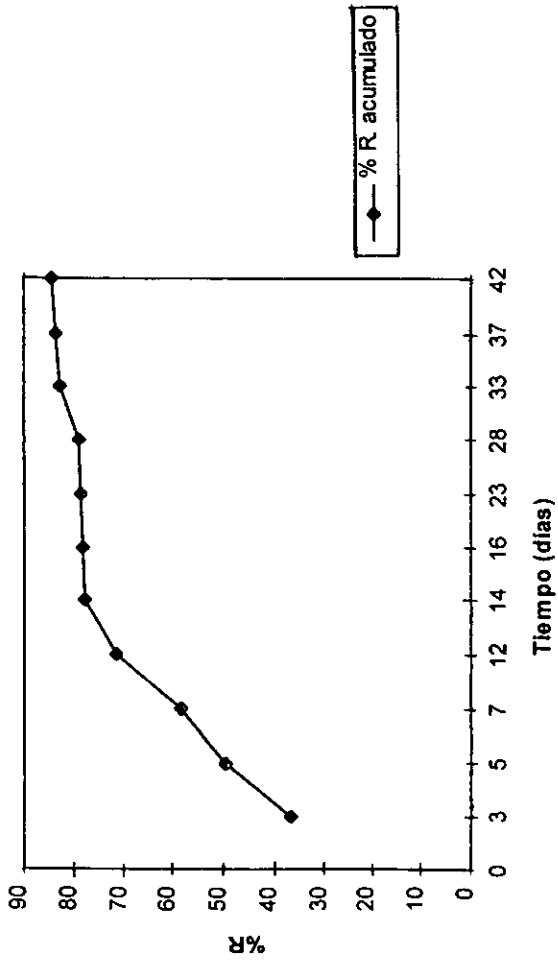


Figura 14. Comportamiento del porcentaje de remoción (%R) de la DQOs acumulados en cada uno de los matraces

Del análisis de sólidos (tabla 12 y figura 15) no se pudo detectar un comportamiento claro que pudiera ser asociado con la transformación de la materia orgánica disuelta a biomasa microbiana, lo que hace suponer que existió preferentemente conversión a bióxido de carbono. Esto pudo deberse a que la materia orgánica presente en el agua residual experimentada, es la única fuente de carbono disponible para el desarrollo microbiano. No obstante, si hubiera existido un suministro constante de nutrimentos, una parte de ellos se utilizaría en la síntesis de nueva materia microbiana o biomasa, pero como no existe otra fuente de nutrimentos al sistema, algunos microorganismos mueren y se desintegran y sus componentes serán utilizados por los organismos restantes.

Brown *et al* (1989), señalan que en la depuración aerobia se requiere una vasta población de microorganismos de metabolismo activo, capaces de degradar productos orgánicos tanto solubles como coloidales con una elevada tasa de conversión a CO<sub>2</sub> y agua, lo que sería una explicación para los resultados obtenidos. También pudo ser factible que se presentó la oxidación de la materia celular a bióxido de carbono, ya que las piedras de cal sodada contenidas dentro del matraz de reacción se sacaron muy mojadas (OECD, 1987, 1993). Después del período de prueba (28 días) las bacterias nitrificantes presentaron una baja velocidad de crecimiento y, por tanto, un bajo rendimiento celular a biomasa, siguiéndose observando una disminución en los sólidos (Muxí-de-Abreu, 1994).

Cabé mencionar que hubo una disminución en los sólidos totales. Esto no se debió a una mayor productividad de biomasa en el sistema, sino a que los sólidos totales fijos variaron constantemente con una consecuente disminución en el contenido de los sólidos totales volátiles (sustancias de origen orgánico, como son las células, polímeros extracelulares, fracciones de material orgánico, CO<sub>2</sub>, etc).

En la tabla 13, puede observarse el comportamiento del crecimiento de los diferentes grupos tróficos microbianos a 24 y 48 horas de cultivo (figura 16). Con este análisis fue posible visualizar de manera rápida las curvas de crecimiento (abundancia) que presenta cada uno de los grupos tróficos microbianos durante el proceso de biodegradación.

En términos generales, se observa un alto desarrollo de colonias mesófilas aerobias, las cuales representan el 100% (1927E+04), de ellas el 46.50% (8894E+03) son bacterias que degradan proteínas, ácidos nucleicos, etc (bacterias proteolíticas); 27.50% (535E+04) son bacterias que degradan carbohidratos fácilmente biodegradable como el almidón (bacterias amilolíticas); 22.50% (4365E+03) son bacterias que degradan disacáridos como el azúcar (bacterias sacarolíticas) y el 3.50% (67,871E+01) representa a bacterias que degradan la celulosa (polisacárido). Estos diferentes sustratos se encuentran

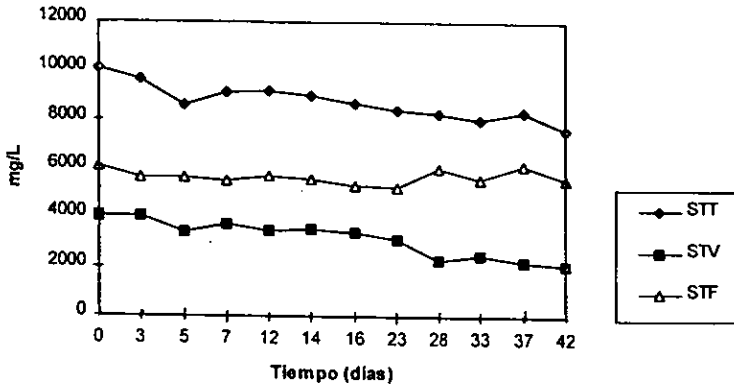


Figura 15. Comportamiento de los sólidos en cada uno de los matraces del respirómetro automático Voith-Sapromat B-12

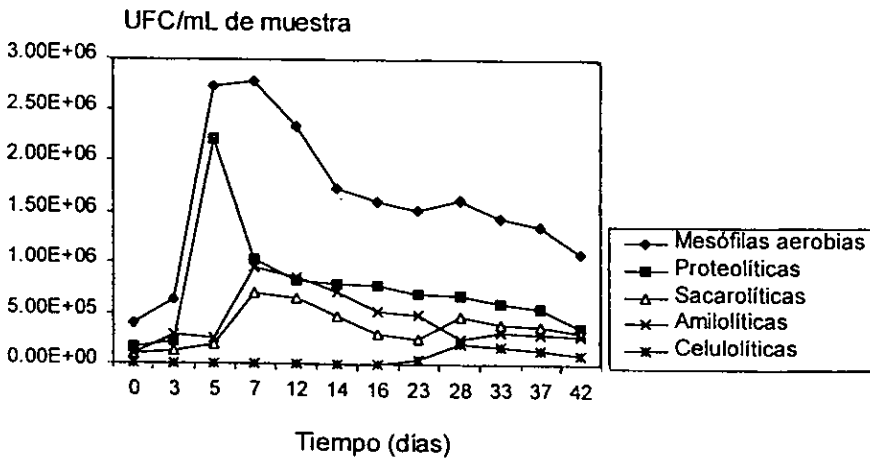


Figura 16. Cuenta total en placa para los diferentes grupos tróficos bacterianos a 48 horas de cultivo tomados de cada uno de los matraces del respirómetro automático Voith-Sapromat B-12

Tabla 13. Cuenta total en placa para los diferentes grupos tróficos bacterianos, después de 24 y 48 horas de cultivo, tomados de los once matraces del respirómetro Voith-Sapromat B-12

| Grupo bacteriano | Mesófilas aerobias |          | Proteolíticas |          | Sacarolíticas |          | Amilolíticas |          | Celulolíticas |           |
|------------------|--------------------|----------|---------------|----------|---------------|----------|--------------|----------|---------------|-----------|
|                  | 24 hrs.            | 48 hrs.  | 24hrs.        | 48 hrs.  | 24 hrs.       | 48hrs.   | 24 hrs.      | 48 hrs.  | 24 hrs.       | 48 hrs.   |
|                  |                    |          |               |          |               |          |              |          |               |           |
| 0                | 3.10E+05           | 3.90E+05 | 9.80E+04      | 1.51E+05 | 2.70E+04      | 9.70E+04 | 8.20E+04     | 1.00E+05 | 1.00E+01      | 2.00E+01  |
| 3                | 4.26E+05           | 6.40E+05 | 1.05E+05      | 2.23E+05 | 3.60E+04      | 1.20E+05 | 2.20E+05     | 2.80E+05 | 3.00E+01      | 5.00E+01  |
| 5                | 2.52E+06           | 2.73E+06 | 1.91E+06      | 2.20E+06 | 1.18E+05      | 1.87E+05 | 1.20E+05     | 2.80E+05 | 5.00E+01      | 1.50E+02  |
| 7                | 2.20E+06           | 2.78E+06 | 5.10E+05      | 1.03E+06 | 4.50E+05      | 7.00E+05 | 9.30E+05     | 9.60E+05 | 6.00E+01      | 3.00E+02  |
| 12               | 1.95E+06           | 2.34E+06 | 7.30E+05      | 8.20E+05 | 3.90E+05      | 6.50E+05 | 5.20E+05     | 8.60E+05 | 8.00E+01      | 6.10E+02  |
| 14               | 1.68E+06           | 1.73E+06 | 7.00E+05      | 8.00E+05 | 2.70E+05      | 4.80E+05 | 4.60E+05     | 7.10E+05 | 6.00E+02      | 8.00E+02  |
| 16               | 1.32E+06           | 1.61E+06 | 6.60E+05      | 7.80E+05 | 2.28E+05      | 3.00E+05 | 3.30E+05     | 5.20E+05 | 2.06E+03      | 2.28E+03  |
| 23               | 1.30E+06           | 1.52E+06 | 6.10E+05      | 7.00E+05 | 1.95E+05      | 2.51E+05 | 2.80E+05     | 5.00E+05 | 2.88E+04      | 5.45E+04  |
| 28               | 1.46E+06           | 1.62E+06 | 6.00E+05      | 6.80E+05 | 3.70E+05      | 4.80E+05 | 1.60E+05     | 2.60E+05 | 1.60E+05      | 2.00E+05  |
| 33               | 1.40E+06           | 1.45E+06 | 5.80E+05      | 6.00E+05 | 3.30E+05      | 4.00E+05 | 2.80E+05     | 3.20E+05 | 1.50E+05      | 1.80E+05  |
| 37               | 1.22E+06           | 1.36E+06 | 4.40E+05      | 5.50E+05 | 2.80E+05      | 3.80E+05 | 2.80E+05     | 3.00E+05 | 6.40E+04      | 1.40E+05  |
| 42               | 9.92E+05           | 1.10E+06 | 3.20E+05      | 3.60E+05 | 2.60E+05      | 3.20E+05 | 2.30E+05     | 2.80E+05 | 5.92E+04      | 1.00E+05  |
| TOTAL            | 16778E+03          | 1927E+04 | 7283E0+3      | 8894E+03 | 2964E+03      | 4385E+03 | 3892E+03     | 535E+04  | 46598E+01     | 87871E+01 |



presentes en el agua residual de cempasúchil, son característicos de las células de las plantas y son degradados por los microorganismos por medio de una variedad de enzimas (tabla 14).

Tabla 14. Porcentajes relativos obtenidos para los diferentes grupos tróficos bacterianos a 48 horas de cultivo.

| <b>Grupo bacteriano</b> | <b>%</b>        |
|-------------------------|-----------------|
| Mesófilas aerobias      | 1927E+04 (100%) |
| Proteolíticas           | 46.50           |
| Amilolíticas            | 27.50           |
| Sacarolíticas           | 22.50           |
| Celulolíticas           | 3.50            |
| <b>TOTAL</b>            | <b>100.00</b>   |

Se puede observar (tabla 14) que durante el conteo a 24 horas de cultivo, no existe un desarrollo total de colonias desarrolladas sobre la superficie del medio, conforme transcurre el período de incubación a 48 horas de cultivo, existe un aumento gradual en la cantidad de colonias desarrolladas. También se observó que mientras se lleva a cabo el proceso de degradación de la materia orgánica disuelta a través del tiempo, existe una disminución paulatina del número de colonias desarrolladas sobre la superficie. Esto se debe a que el sustrato presente también va disminuyendo gradualmente durante el proceso de degradación (agotamiento de los sustratos disponibles en el agua residual) (Tebbutt, 1994).

La cantidad de bacterias desarrolladas fue reflejo de la accesibilidad de sustratos, consumiéndose primero los de fácil asimilación y posteriormente los de mayor complejidad; por ello las colonias celulolíticas aumentaron en los últimos puntos de muestreo. Asimismo, el aumento numérico de bacterias mesófilas aerobias se relaciona con un mayor consumo de oxígeno y de remoción de materia orgánica. La disminución en la abundancia de las mismas se presenta como resultado del agotamiento de los sustratos disponibles.

Después del período de prueba estandarizado de 28 días, se observó en la etapa aerobia una oxidación del amoníaco a nitrato (nitrificación), el compuesto reducido de nitrógeno es la fuente de energía de las bacterias autótrofas y heterótrofas aerobias que oxidan los grupos amino y nitro de compuestos inorgánicos de nitrógeno, liberando el nitrógeno como nitrito o nitrato. Se ha observado que la materia orgánica disuelta en concentraciones superiores a 1000 mgDQO/L, inhiben el crecimiento de los microorganismos nitrificantes.

Desde el punto de vista bacteriológico, se ha demostrado que a bajas concentraciones de oxígeno disuelto (0.5 mg/L), aumenta la tasa de crecimiento de *Nitrosomonas* así como durante el proceso de nitrificación (Muxi-de-Abreu, 1994). Por ello, tanto al inicio como al final de la prueba se observó posiblemente un alto desarrollo de *Pseudomonas* o *Nitrosomonas* en la cuenta en placa (cuenta total), estas se presentaban en forma de colonias ramificadas (forma de árboles).

Se puede observar que en el estudio experimental sobre degradación aerobia, hubo una degradación secuencial de la materia orgánica disuelta por medio de diferentes grupos tróficos bacterianos y otros microorganismos aerobios presentes en el agua residual.

Los resultados de las observaciones macroscópicas de las colonias desarrolladas en cada uno de los medios específicos utilizados se presentan en la tabla 15. Estos datos revelan el crecimiento de diferentes tipos de colonias. Estas colonias desarrolladas sobre la superficie del medio son visibles a simple vista y están formadas por masas de muchos millones de células. Su forma, textura y color fueron característicos, aunque éstos dependieron de la naturaleza del medio de cultivo y de las condiciones de incubación.

Tabla 15. Diferenciación con base en un criterio morfológico de las colonias desarrolladas en los diferentes medios de cultivo utilizados

| Medio de cultivo      | Tipo de colonias                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Tinción de Gram     |
|-----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| Agar nutritivo        | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ramificadas (arborescentes), extendidas, lisa y brillante (húmeda) y cremosa</li> <li>• Borde entero, lisa, extendida (ligeramente irregular), cremosa y opaca</li> <li>• Ramificadas (arborescentes), extendidas, lisas y opacas con pequeñas vellosidades</li> <li>• Redonda (uniforme), entera, lisa y opaca</li> </ul> | Negativas (cocos)   |
| Agar leche-descremada | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Blanca redonda (uniforme), lisa y brillante (húmeda)</li> <li>• Blancas ramificadas (arborescentes), extendidas, lisas y opacas</li> </ul>                                                                                                                                                                                 | Negativas (bacilos) |
| Agar almidón          | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Redonda (uniforme), elevada, lisa y brillante, cremosa</li> <li>• Amorfa (extendida), elevada, lisa y brillante, cremosa</li> <li>• Redonda (uniforme), lisa, opaca, seca y frágil (apariencia de costra)</li> <li>• Ramificada (arborescentes), extendida con pequeñas vellosidades, elevada y opacas</li> </ul>          | Positivas (bacilos) |
| Agar celulosa         | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Blanca redonda (uniforme), pequeñas, elevada, lisa y brillante</li> <li>• Redondas (uniformes), medianas, ligeramente elevadas y translúcidas</li> </ul>                                                                                                                                                                   | Negativas (cocos)   |
| Medio mínimo          | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Redonda (uniforme), entera, elevada, lisa y cremosa</li> <li>• Blanca redonda (uniforme), entera, lisa y opaca</li> </ul>                                                                                                                                                                                                  | Negativas (bacilos) |

## 6.4 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES DE LA FASE EXPERIMENTAL II

### 6.4.1 CONCLUSIONES

1. En el respirómetro automático Voith-Sapromat B-12 se mantienen condiciones controladas de temperatura, agitación continua y aporte de oxígeno acorde al requerimiento de la muestra, con lo cual se pudieron obtener las curvas de crecimiento de los diferentes grupos bacterianos tróficamente activos así como la curva de degradación de la materia orgánica disuelta a través del tiempo.
2. Se observó que existe una degradación secuencial de la materia orgánica disuelta por medio de diferentes grupos tróficos bacterianos.
3. Se confirma lo evaluado en estudios anteriores con nejayote, que los grupos bacterianos tróficamente activos utilizaron primero los sustratos de más fácil degradación, dejando al final los sustratos de mayor complejidad (Pedroza, 1985).
4. Mediante el uso del respirómetro automático Voith-Sapromat B-12 fue posible llevar a cabo la evaluación de la biodegradabilidad aerobia rápida de las aguas residuales del proceso de cempasúchil, corroborándose que son rápidamente biodegradables de acuerdo con el procedimiento establecido por la norma OECD 301 A, ya que en menos de 28 días se redujo más del 70% de la materia orgánica disuelta, medida como DQO.
5. El porcentaje de remoción total de materia orgánica disuelta, medida como DQO soluble fue del 49.5% en 5 días, 78.9% en 28 días y del 84.7% en 42 días.
6. Las bacterias proteolíticas, sacarolíticas y amilolíticas se presentaron tróficamente activas durante todo el periodo de degradación, mientras que las bacterias celulolíticas presentaron actividad trófica sólo al final del tratamiento.
7. Para optimizar la eficiencia de un sistema de tratamiento es indispensable el conocimiento de las comunidades bacterianas que intervienen durante el proceso de degradación a efecto de proporcionarles las condiciones fisicoquímicas más adecuadas para su proliferación.
8. Los géneros de ciliados encontrados en el RBR y los grupos tróficos bacterianos cuantificados, permitirán en conjunto dar una interpretación adecuada del proceso de degradación de las aguas residuales del cempasúchil.
9. Con este estudio se pudo secuenciar el aumento poblacional de los diferentes grupos bacterianos participantes en la degradación de los sustratos existentes en el agua residual bajo estudio, observándose un aumento significativo en sus abundancias relativas en función del tipo de sustrato utilizado.

## 6.4.2 RECOMENDACIONES

1. Realizar la determinación de las especies bacterianas participantes en el proceso de biodegradación de las aguas residuales estudiadas.
2. Estudiar el proceso de nitrificación presente durante la fase de degradación aerobia.
3. Realizar la medición de la degradación de los diferentes sustratos de interés que se encuentran presentes en el agua residual bajo estudio (por ejemplo, almidón, sacarosa, proteína y celulosa) y las abundancias poblacionales asociadas con los mismos.
4. Hubiera sido deseable realizar la fase experimental II por duplicado pero, dado que se cuenta con un respirómetro de solamente 12 piezas solo se rellevo a cabo una corrida. Se recomienda repetir el experimento con un inóculo liofilizado para ambos con objeto de garantizar, en la medida de lo posible, repetividad.
5. Asimismo, hubiera sido deseable usar agua residual previamente tratada anaerobiamente para estos experimentos ya que la materia orgánica residual de ese tratamiento no es equivalente a la materia orgánica de una agua residual diluida. Por ello, se recomienda que, al repetir este experimento, se haga con efluente del RALLFA procurando detectar la concentración máxima posible de ser estudiada bajo condiciones aerobias a efecto de poder inferir la factibilidad de realizar un tratamiento biológico anaerobio-aerobio conectados en serie.

## **7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES GENERALES**

A continuación se presentara las conclusiones y recomendaciones derivadas del presente trabajo de investigación.

### **7.1 CONCLUSIONES**

Bajo las condiciones de operación establecidas en el sistema de tratamiento biológico anaerobio-aerobio conectados en serie se obtuvieron los siguientes porcentajes de remoción promedio total de materia orgánica disuelta, medida como DQO soluble: 91% para concentraciones de 21,460; 32,720; 34,810 y 48,850 mgDQO/L y de 82% cuando se utilizaron concentraciones de 20,670; 23,830 y 33,330 mgDQO/L.

Debido a las relativamente altas concentraciones de materia orgánica disuelta con las que se alimentó al RBR, se observó que la transferencia de oxígeno disuelto en el líquido residual bajo tratamiento fue insuficiente para que el reactor operara de manera aerobia (más de 2 mgOD/L), por lo que se presentaron de manera permanente condiciones anaerobias, anóxicas y/o microaerobias. Ambos parámetros, concentración de materia orgánica y oxígeno disuelto, resultaron limitantes para la proliferación de una mayor diversidad microbiana.

De la aplicación de la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida se observó que, el porcentaje de remoción total de la DQO soluble alcanzado fue del 49.5% en 5 días, 78.9% en 28 días y del 84.7% en 42 días. En consecuencia puede considerarse a este tipo de aguas residuales como rápidamente biodegradables ya que se logro más del 70% de pérdida de materia orgánica disuelta, medida como DQO en 28 días.

De a cuerdo con los diferentes grupos bacterianos cuantificados, se observó que aquellos con actividad proteolítica, sacarolítica y amilolítica se presentaron tróficamente activos durante todo el período de degradación, mientras que las bacterias celulolíticas, denotaron actividad únicamente al final del tratamiento.

Se observó que existe una estrecha relación entre la disminución paulatina de la abundancia de los diferentes grupos bacterianos tróficamente activos con la disminución de los sustratos disponibles.

### **7.2 RECOMENDACIONES**

De a cuerdo con la temática abordada en el presente trabajo, se recomienda profundizar en el estudio microbiológico y de metabolitos secundarios, tanto de los sistemas de tratamiento biológico empleados (RALLFA y RBR), como de la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida, a efecto de entender con mayor claridad los procesos de biotransformación que se están llevando a cabo.

## 8. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

- Aguirre, V. y Correa, I. 1997. Estudio técnico-económico del secado para la obtención de harina de cempasúchil. Informe técnico de proyecto. CEMPA-01-97. Pub. PIQAYQA, Facultad de Química. México, D. F. México. 79 pp.
- Albert, L. A., López, S. M., y Flores, J. 1995. **Diccionario de la contaminación.** Centro de Ecología y Desarrollo. México, D. F. México. 85 pp.
- Alexander, M. 1981. Biodegradation of chemicals of environmental concern. **Science.** 211: 132-138.
- Anónimo. 1990. **Efluentes de Deshidratadoras.** Reporte Final. Pub. Laboratorios Bioquímex, S. A. de C. V. México, D. F. México. 67 pp.
- APHA. 1981. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.** Ed. Washington, EEUUA. 842 pp.
- APHA. 1990. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.** Ed. Washington, EEUUA. 915 pp.
- Avilés, R. D., Cortés, G. A., Eusebio, H. G., Flores, V. M., Lugo, F. G., Mota, G. L., Mora, F. J., Padierna, O. M. y Rodríguez, M. R. 1983. **Manual de Laboratorio de Microbiología Sanitaria.** Instituto Politécnico Nacional. México, D. F. México. 264 pp.
- Bernal, G. M. 1997. Tratamiento anaerobio-aerobio a nivel laboratorio de aguas residuales de la industria alcoholera a partir de melazas de caña de azúcar aciduladas con HCl. **Tesis profesional.** Facultad de Química, UNAM. México, D. F. México. 94 pp.
- Bradshaw, J. L. 1976. **Microbiología de Laboratorio.** El manual moderno. México, D. F. México. 235 pp.
- Briones, R., Espinosa, A., Moreno, G. y Noyola, A. 1993. Apuntes: 20 tópicos del tema tratamiento anaerobio de aguas residuales, compilados y resumidos en el Instituto de Ingeniería, UNAM. México, D. F. México. 120 pp.
- Brown, C. M., Campbell, I., Priest, F. G., 1989. "Introducción a la biotecnología". Ed. Acribia S. A., Barcelona, España. 143 pp.
- Bryan, A. y Bryan, A. Ch. 1974. **Bacteriología.** Continental. México, D. F. México. 595 pp.

- Casarrubias, M. y Hernández, J. G. 1996. Degradación anaerobia de aguas derivadas del ensilado y prensado del cempasúchil (*Tagetes erecta*). **Tesis profesional**. FES Zaragoza, UNAM, México, D. F. México. 101 pp.
- Chávez, I. 1995. Tratamiento de aguas residuales de alto contenido de materia orgánica biodegradable (cempasúchil) en un reactor de biodiscos a escala laboratorio. **Tesis profesional**. Instituto Tecnológico de Tapachula. Tapachula, Chiapas. 93 pp.
- Desikachary, T. V. 1959. **Cyanophyta**. Ed. Board. Nueva Delhi, India. p 150-155.
- DIBICO. 1989. **Medios de cultivo deshidratados**. México, D. F. México. 50 pp.
- DIFCO manual. 1984. **Dehydrated culture media and reagents for microbiology**. DIFCO Laboratories, Detroit, EEUUA. 1155 pp.
- DIFCO manual. 1990. **Dehydrated culture media and reagents for microbiological and clinical laboratory procedures**. Michigan, EEUUA. 348 pp.
- Durán-de-Bazúa, C. 1993. **Tratamiento biológico de aguas residuales de la industria de proceso**. Departamento de Alimentos y Biotecnología, División de Ingeniería y Programa de Ingeniería Química Ambiental y Química Ambiental. Pub. PIQAYQA, Facultad de Química, UNAM. Ciudad Universitaria, México, D. F. 141 pp.
- Durán-de-Bazúa, C., Briones, R., Ilangovan, K., Krishnan, R., Noyola, A., Pandiyan, T., Pedroza, R., Picaso, R. M., Ramírez-Burgos, I., Casarrubias, M., Chávez, I. y Hernández, G. 1994. **Biodegradación de aguas de origen agroindustrial**. Estudio de las aguas de proceso del cempasúchil (*Tagetes erecta*). Primer informe técnico CEMPA-01-93. Pub. UNAM, PUMA-PIQAYQA. México, D. F. México. 100 pp.
- Dutka, B. 1979. Microbiological indicators problems and potential of new microbial indicator of water quality. En **Biological Indicator of Water Quality**. James, A. y Evison, L. Eds. John Wiley and Sons. Londres, Inglaterra. Pp 1-24.
- Escárcega, C. A. y Pulido, R. 1986. Modelo cinético para un reactor biológico rotatorio usado en el tratamiento aerobio de efluentes. **Tesis profesional**. Facultad de Química, UNAM. México, D. F. México. 106 pp.

- Granados, E. y López, X. 1996. Identificación espectroscópica de compuestos orgánicos presentes en agua residual de cempasúchil. **Tesis profesional**. FES Zaragoza, UNAM, México, D. F. México. 73 pp.
- Hodgson, D. A. 1989. Bacterial diversity: The range of interesting things that bacteria do. En *Genetics of Bacterial Diversity*. Hopwood, D. A. y K. E. Chater. Academic Press, Oxford, Inglaterra. p 3-22.
- Jenkins, S. R., Morgan, J. M. y Zhang, X. 1991. Measuring the usable carbonate alkalinity of operating anaerobic digesters. **JWPCF**. 63: 28-34.
- Klein, B. M. 1958. The dry silver method and its proper use. **J. Protozool.** 5:99
- Kudo, R. R. 1969. **Protozoología**. CECSA. México, D. F. México. 905 pp.
- Lee, J. J., Hutner, S. H. y Bovee, E. C. (eds.). 1985. **An illustrated guide to the protozoa**. Society of Protozoologist. Kansas, EEUUA. 629 pp.
- Lehninger, L. A. 1990. **Bioquímica**. Omega. Barcelona, España. 486 pp.
- Lettinga, G., Van Velsen, A. F. M., Hobma, S., de Zeeuw, W. y Klapwijk, A. 1980. Use of the upflow sludge blanket (USB) reactor concept for biological wastewater treatment, especially for anaerobic treatment. **Biotechnol. Bioeng.** 22: 699-734.
- Luna-Pabello, V. M. 1987. Estudio de los protozoarios ciliados presentes en un sistema de tratamiento por medio de biodiscos. **Tesis profesional**. Facultad de Ciencias, UNAM. México, D. F. México. 105 pp.
- Luna-Pabello, V. M. 1990. Efecto de la temperatura en las poblaciones de protozoarios ciliados en un reactor de biodiscos. **Tesis de maestría**. Facultad de Ciencias, UNAM. México, D. F. México. 117 pp.
- Luna-Pabello, V. M. 1993. Estudio comparativo de las poblaciones de protozoarios ciliados en un reactor de biodiscos alimentado con diferentes sustratos. **Tesis doctoral**. Facultad de Ciencias, UNAM. México, D. F. México. 152 pp.
- Maciel-Luna, M. A. 1997. Tratamiento biológico de aguas residuales del procesamiento de cempasúchil, estudio de factibilidad. **Tesis profesional**. Facultad de Química, UNAM. México, D. F. México. 100 pp.
- Madoni, P. 1981. **I protozoi ciliati degli impianti biologi di depurazione**. Consiglio National della Ricerche. Roma, Italia. 134 pp.



- Manual del respirómetro Voith-Sapromat B-12. 1996. VOITH Suizer Stoffaufbereitung GmbH. Alemania. 20 pp.
- Margulis, L. y K. V. Schwartz. 1985. **Cinco Reinos. Guía ilustrada de los phyla de la vida en la Tierra.** Labor. Barcelona, España. 335 pp.
- Muñiz, R. R. 1987. Evaluación comparativa del funcionamiento de modelos físicos de laboratorio de lagunas anaerobias tratando aguas residuales de excretas de cerdo. **Tesis profesional.** Facultad de Ciencias, UNAM, México, D. F. México. 106 pp.
- Muxí-de-Abreu, L. 1994. II Taller. Seminario latinoamericano "Tratamiento anaerobio de aguas residuales". Montevideo, Uruguay. pp 55-62.
- OECD, 1987. Guidelines for testing of chemicals. **"Ready biodegradability: Modified AFNOR test"**. Organization for Economic Cooperation and Development. París, Francia. 65 pp.
- OECD, 1993 a. Guidelines for testing of chemicals. **"Ready biodegradability: Die Die-Away Test"**. Organization for Economic Cooperation and Development. París, Francia. 10 pp.
- OECD, 1993 b. Degradation and Bioaccumulation. Section 3. Organization for Economic Cooperation and Development. París, Francia. 110 pp.
- Ottengraf, S. 1987. Biological systems for waste gas elimination. Trends in Biotechnology, **5** (5), 132-136.
- Pedroza, R. 1985. Estudio de la degradación biológica aerobia de los efluentes de nixtamalización. **Tesis de maestría.** Universidad Iberoamericana. México, D. F. México. 143 pp.
- Postgate, J. 1992. **Microbes and man.** Cambridge University Press, Cambridge, EEUUA. Inglaterra. 297 pp.
- Quentin, N. M. y Russel, S. W. 1991. **Bacteriología y micología.** Interamericana. México, D. F. México. 713 pp.
- Ramírez-Gama, R. M., Luna, M. B., Mejía, Ch. A., Velázquez, M. O., Tsuzuki, R. G., Vierna, G. L., y Muggenburg, Y. 1992. **Manual de Prácticas de Microbiología General.** Facultad de Química, UNAM, México, D. F. México. 318 pp.
- Rodier, J. 1989. **Análisis de las aguas.** Omega. Barcelona, España. 1059 pp.

- Rojas, Ch. O. 1988. La alcalinidad como parámetro de control de los ácidos grasos volátiles en digestores anaerobios. En **Manual del curso de tratamiento "anaeróbico" de aguas residuales**. Microbiología y Bioquímica. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. Pp. d1-d31.
- Rojo, N. A. 1989. Taxonomía vegetal y florística. **Seminario de titulación**. IPN, México, D. F. México. 97 pp.
- Romero, C. R. 1993. **Microbiología**. Médica-Panamericana S. A. de C. V. México, D. F. México. Buenos Aires, Argentina. 750 pp.
- Sánchez, H., Saval-de-Hach, S., y Durán-de-Bazúa, C. 1991. **Degradación aerobia de aguas residuales que contienen metilaminas y dimetilformamida**. PIQAyQA. Facultad de Química, UNAM, México, D. F. México. 205 pp.
- Schade, M. y Lemmer, H. 1994. Counting bacteria of selected metabolic groups in activated sludge-an assessment of methods. **Wat. Sci. Tech.** 29(7): 75-79.
- Sonea, S. y M. Panisset. 1983. **A new bacteriology**. Janes and Bartlett Pub. Inc. EEUUA. 140 pp.
- Starmach, K. 1966. Cyanophyta-Sinice, Glaucophyta-Glaukofity. Tomo II. Karszawa, Polonia. Pp 70-71.
- Strother, J. L. 1977. Tageteae systematic review. En **The Biology and Chemistry of the Compositae**. Heywood, V. H., J. B. Harborne y B. L. Turner (eds.). Vol. II. Academic Press. Nueva York, EEUUA. 769-783 pp.
- Tebutt, T. H. 1994. **Fundamentos de control de la calidad del agua**. Limusa. México, D. F. México. 239 pp.
- Tortora, G. J., Funke, B. R. y Case, C. C. 1992. **Microbiology**. Benjamin/Cummings Publishing Co. California, California. EEUUA. Pp. 682-692.

## 9. ANEXOS

### ANEXO A

#### PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS

##### PRUEBA QUÍMICA:

**Demanda química de oxígeno (DQO).**

**Método volumétrico de oxígeno con dicromato de potasio (APHA, 1990).**

##### Fundamento:

El método se basa en una oxidación enérgica de la materia orgánica e inorgánica oxidable, que se encuentra en el agua en un medio fuertemente ácido, con una solución valorada de dicromato de potasio. El exceso de agente oxidante después de un período de reflujo a 150°C durante 2 horas, se determina con una solución valorada de sulfato ferroso amoniacal, en presencia de un complejo ferroso de ortofenantrolina (ferroín indicador) como indicador interno. El valor obtenido se introduce a una ecuación, cuyo desarrollo da como resultado la concentración en mg/L de materia oxidable químicamente.

##### Interferencias:

Las sustancias inorgánicas como los iones ferroso ( $\text{Fe}^{++}$ ), sulfato ( $\text{SO}_4^-$ ), sulfitos ( $\text{SO}_3^-$ ) y tiosulfatos ( $\text{S}_2\text{O}_3^-$ ) se oxidan bajo ciertas condiciones y crean una DQO inorgánica, la cual interfiere cuando se estima el contenido del agua residual.

El ión cloruro ( $\text{Cl}^-$ ) interfiere, pero puede eliminarse al agregar sulfato mercuríco ( $(\text{Hg})_2\text{SO}_4$ ) a la muestra por analizar.

Nota: mediante esta prueba no es posible conocer el tipo de compuestos orgánicos presentes, ni diferenciar entre material biodegradable y sustancias tóxicas, por lo cual sólo constituye un análisis para la determinación del total de material presente.

##### Reactivos:

- Solución acuosa de dicromato de potasio 0.25 N
- Sulfato de plata (cristales)

- Solución de sulfato de plata en ácido sulfúrico. Esta se prepara disolviendo 22 gr de sulfato de plata en 4 litros de ácido sulfúrico. La solución debe protegerse de la luz.
- Ácido sulfúrico concentrado
- Solución indicadora de ferroín
- Solución de sulfato ferroso amoniacal para valoración en una concentración aproximada de 0.05 N
- Sulfato mercúrico

### **Equipo:**

El equipo empleado es un Behr, el cual consta de una parrilla, con control de temperatura y tiempo, de calentamiento para 24 muestras, 2 canastillas metálicas con 24 vasos de reacción de 200 mL de capacidad, cada uno de ellos con un tubo refrigerante que permite la condensación, mediante enfriamiento por aire, de los vapores generados durante el período de reflujo.

De manera complementaria a lo que es propiamente el equipo para la prueba de DQO, esto un recipiente de PVC que contiene agua para el enfriamiento de los vasos de reacción después de haber puesto las muestras a reflujo.

### **Procedimiento:**

#### Tratamiento de la muestra

- 1.- Centrifugar las muestras por analizar (3 600 rpm a 5°C durante 15 minutos).
- 2.- Poner en el recipiente de reflujo:
  - 10 mL de muestra diluída (con agua destilada) en proporciones 1:50 para muestras concentradas y 5:50 para aquellas provenientes del sistema de tratamiento. En la preparación del blanco (testigo) se utilizan 10 mL de agua destilada como muestra.
  - 0.2 g de sulfato mercúrico
  - 5 mL de dicromato de potasio 0.25 N
- 3.- Colocar el refrigerante y añadir lentamente 15 mL de solución de plata en ácido sulfúrico concentrado.

### **Reflujo:**

- 4.- Colocar los matraces de reacción en la parrilla eléctrica, manteniéndolos en reflujo, a 150°C, durante dos horas.

### Valoración de la muestra:

Al acabarse el reflujó, una parte del dicromato ya ha reaccionado con la materia orgánica. El dicromato restante se valora de la siguiente manera:

- Agregar al recipiente de reflujó 40 mL de agua destilada y dos gotas de ferroín indicador, homogenizar.
- Titular con sulfato ferroso amoniacal (SFA) 0.05 N. El punto final de la valoración (titulación) es el cambio de coloración de azul verdoso a pardc rojizo.

### Obtención de resultados:

- La fórmula empleada es la siguiente:

$$\text{mg DQO/L} = (a-b) N 8000/\text{mL muestra (f)}$$

Donde:

a=Volumen de sulfato ferroso amoniacal utilizado para valorar el blanco (testigo).

b=Volumen de sulfato ferroso amoniacal utilizado para valorar la muestra.

N=Normalidad del sulfato ferroso amoniacal.

f=Fracción volumétrica decimal de la muestra inicial en la solución de la cual se tomó la alicuota de 10 mL para la determinación.

### Normalidad del sulfato ferroso amoniacal (FAS)

En un matraz se colocan:

- 10 mL de dicromato de potasio 0.05 N
  - 40 mL de agua destilada
  - 10 mL de ácido sulfúrico concentrado (enfriando constantemente)
- Después de enfriar se le agregan 2 gotas de ferroín indicador y se agita.

### Valoración:

La solución anterior se titula con sulfato ferroso amoniacal con una normalidad aproximada de 0.05 y se anotan los mL gastados para lograr el cambio de color a café rojizo.

N=mL de dicromato de potasio 0.05 N x Normalidad del mismo / mL de SFA empleados en la titulación

$$N=10 \times 0.05 / \text{mL SFA empleados}$$

## GUÍA PARA LA OPERACIÓN DEL EQUIPO VOITH-SAPROMAT B-12

### Fundamento:

El método respirométrico presenta la particularidad de que el oxígeno se encuentra disponible a lo largo de toda la prueba. Esto se logra por medio del montaje de unidades compuestas por un indicador de presión, un generador de oxígeno (celda electrolítica) y un matraz de reacción interconectados por mangueras (figura 16). Los envases forman un sistema de medición sellado por lo que las fluctuaciones de la presión barométrica no afectan el resultado de las determinaciones. La actividad de los microorganismos en la muestra produce  $\text{CO}_2$ . La absorción del  $\text{CO}_2$  en gránulos de cal sodada crea un vacío parcial en la unidad de medición, el cual es registrado por el indicador de presión; este controla la generación electrolítica de oxígeno a partir de una solución ácida saturada de  $\text{CuSO}_4$ , que será suministrado al matraz de reacción. La relación nitrógeno/oxígeno en el espacio gaseoso sobre la muestra se mantiene a través del período de medición, por lo tanto no existe depleción de oxígeno disuelto. Un agitador magnético dentro de la muestra provee de agitación vigorosa, con el fin de asegurar un intercambio de gases efectivo. La temperatura de la muestra se mantiene por medio de un baño de agua controlado. En contraste con el método de dilución convencional, este equipo permite que se lleve a cabo un verdadero proceso respiratorio pues cuantifica la cantidad de oxígeno utilizado por los microorganismos para llevar a cabo la oxidación bioquímica de compuestos orgánicos.

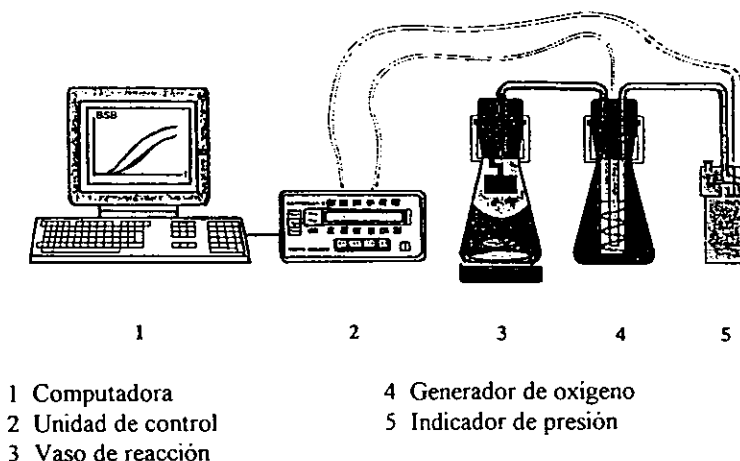


Figura 16. Esquema de los componentes básicos del respirómetro VOITH-SAPROMAT B-12

## Método:

1. Centrifugar la muestra para eliminar partículas suspendidas. Esta operación se realiza solo en caso de que se requiera cuantificar materia orgánica disuelta.
2. Encender el baño de agua con 30 minutos de anticipación para el calentamiento del sistema.
3. Depositar en el vaso de reacción la muestra a ser analizada (realizar diluciones pertinentes y ajuste el pH a valores cercanos a la neutralidad). El volumen total es de 250 mL. Introducir una barra de agitación y un volumen predeterminado de inóculo microbiano (aproximadamente el 10% del volumen total de la muestra).
4. Colocar en el tapón del vaso de reacción cal de sodio granulada para captar el CO<sub>2</sub> producido durante el metabolismo microbiano aerobio. La cal de sodio debe ser secada previamente a 103°C durante una hora y enfriada posteriormente en un desecador.
5. Cerrar correctamente el tapón de rosca del vaso de reacción, cuidando de que no caiga cal de sodio a la muestra de agua en estudio.
6. Encender el sistema de registro y realizar las anotaciones pertinentes en el control del graficador directo (fecha, hora de inicio de la prueba, procedencia de la muestra, diluciones, etc).
7. Ajustar los indicadores digitales a cero y activar el sistema. Presionar simultáneamente **RESET** y los botones correspondientes a las celdas activas, posteriormente presionar **START** y los botones correspondientes.
8. Introducir el vaso de reacción en el baño de agua.
9. Realizar las interconexiones necesarias de mangueras y electrodos de los diferentes componentes de las 12 unidades de medición. Conectar los electrodos rojo y azul al matraz generador de oxígeno.
10. Encender el mecanismo de agitación.
11. Ajustar el indicador de presión (cerrar y observar que todos se encuentren al mismo nivel para evitar valores erróneos, en caso de no ser el mismo nivel desconectar la manguera del matraz generador de O<sub>2</sub>, abrir la válvula de rosca del indicador de presión y reintentar).
12. Registrar los valores obtenidos después de finalizar el tiempo del experimento, observar las gráficas (pueden hacerse registros manuales en una bitácora de control si es que desea conocer algún valor en un tiempo determinado).
13. Al finalizar la prueba de consumo de oxígeno (DBO<sub>5</sub>, DBO<sub>u</sub>, etc). Presionar **STOP** y los botones correspondientes a las celdas activas, posteriormente presionar **RESET** y los botones correspondientes.
14. Apagar el equipo, abrir la válvula de rosca localizado en el indicador de presión; desconectar la manguera de los vasos de reacción y de manera parcial los electrodos.
15. Retirar las muestras y lavar con jabón especial para cristalería de laboratorio o con agua corriente. Finalmente enjuagar con agua destilada y dejar secar.

## SÓLIDOS

### 1. Sólidos totales (ST)

Se limpian los crisoles para eliminar todas las materias adheridas a ellos, se deja en una estufa cuando menos 8 horas a 100°C para eliminar la humedad. Se transfieren a un desecador durante 45 minutos, después se pesan (peso A).

Utilizando una pipeta volumétrica se agregan a los crisoles muestras homogéneas del licor mezclado. Se colocan los crisoles en la estufa a 103°C por un mínimo de 1 hora, los crisoles se enfrían durante 45 minutos en un desecador para después ser pesados (peso B). La diferencia de peso entre los crisoles sin muestra y con muestra ya desecada, da la cantidad de materia sólida total contenida en ésta. Con la siguiente fórmula se calcula los sólidos totales.

$$ST = \frac{(B-A) \times 10^6}{V}$$

Donde:

ST = Sólidos totales (mg/L)

B = peso del crisol con la muestra (g)

A = peso del crisol vacío (g)

V = volumen de la muestra colocada en el crisol (mL)

### 2. Sólidos totales fijos (STF)

Una vez obtenido el peso B los crisoles se meten en la mufla a  $556 \pm 25^\circ\text{C}$  durante 15-20 minutos, se enfrían en un desecador durante 3 horas y se pesan (peso C). Con la siguiente fórmula se calcula los sólidos totales fijos:

$$STF = \frac{(C-A) \times 10^6}{V}$$

Donde:

STF = Sólidos totales fijos (mg/L)

C = peso del crisol con muestra (g)

A = peso del crisol vacío (g)

### 3. Sólidos totales volátiles (STV)

Se obtienen de la diferencia de los sólidos totales menos los sólidos totales fijos.

$$STV = ST - STF = (\text{mg/L})$$



## ANEXO B

### TÉCNICAS PARA DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS

#### Preparaciones temporales:

Para la observación de los protozoos "*in vivo*" de la muestra original y de los cultivos se utilizó el retardador de movimiento ciliar:

**Metilcelulosa.** Disolver 10 g de metilcelulosa en 45 mL de agua destilada fría, mezclar bien y refrigerar a 10 °C hasta que la mezcla obtenga una apariencia transparente. Con esta mezcla hacer una circunferencia en la parte central del portaobjetos, agregar en el interior del anillo una gota de la muestra a observar y colocar el cubreobjetos.

#### Técnicas de Tinción

##### Técnica de Klein

La técnica de Klein no utiliza ningún fijador, sino simplemente se deja secar, lo cual puede ocasionar que los organismos sufran una ligera deformación. Sin embargo, es una técnica que resalta las estructuras argentófilas, tales como los cinetosomas, las cinetias, los poros de las vacuolas contráctiles, el citostoma, el citoprocto y el argiroma.

##### Procedimiento:

- 1.- Colocar una gota de cultivo sobre el cubreobjetos, extenderla con una aguja de disección y dejar secar al aire libre.
- 2.- Introducir el cubreobjetos en una solución de nitrato de plata al 5% durante 5 minutos.
- 3.- Retirar el cubreobjetos y lavarlo dos veces con agua destilada.
- 4.- Colocar el cubreobjetos en una caja Petri con agua destilada y fondo blanco. Irradiar con una lámpara de luz ultravioleta la preparación hasta que tome un color pardo claro (de 2 a 5 minutos).
- 5.- Lavar con agua destilada.
- 6.- Dejar secar al aire libre.
- 7.- Montar en bálsamo de Canadá.
- 8.- Observar los resultados al microscopio.

## Tinción de Gram

Esta técnica se basa en la tinción diferencial de la pared celular de las bacterias, debido a la presencia de los polisacáridos que la constituyen.

### Procedimiento

- 1.- Sobre un portaobjetos hacer un frotis de la muestra, dejarlo secar al aire y pasarlo por la flama de un mechero.
- 2.- Sumergir en violeta de genciana por aproximadamente 1-2 minutos.
- 3.- Añadir 3-4 gotas de una solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 5% y reposar 2-3 minutos
- 4.- Lavar el exceso del colorante con agua corriente.
- 5.- Adicionar lugol durante 1-2 minutos.
- 6.- Lavar con agua corriente y secar con papel absorbente.
- 7.- Decolorar con alcohol al 95% o acetona, o bien una mezcla 1:1 de las mismas soluciones.
- 8.- Adicionar la safranina por 1-2 minutos.
- 9.- Lavar con agua corriente y secar con papel absorbente.
- 10.- Observar al microscopio.

Las bacterias serán gram-positivas si conservan el color azul-violeta del primer colorante empleado, en caso de presentar coloración roja o parda o ninguna, serán gram-negativas.

### Técnica para la cuenta de microorganismos

De manera general esta técnica consiste en depositar 0.1 mL de muestra en un portaobjetos y taparlo con un cubreobjetos, cuidando que el agua no desborde y posteriormente se cuenta la totalidad de los organismos presentes en la totalidad del área bajo el cubreobjetos de 22 x 22 mm. Lo anterior permite conocer el número de microorganismos presentes por unidad de volumen. En este caso se obtiene la relación de organismos por mililitro de la siguiente forma:

$$\text{organismos/mililitro} = C (F)$$

Donde:

C= Número de organismos de interés contados en 0.1 mL

F= Factor de conversión a mL, en este caso vale 10, dado que:

$$1 \text{ mL} = F(0.1 \text{ mL}), F = 1 \text{ mL}/0.1, F = 10$$

## ANEXO C

### PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO Y MATERIAL ESTÉRIL

#### Preparación y esterilización del material

##### Procedimiento:

- 1) Lavar todo el material de vidrio con jabón (de preferencia usar Dextran), para eliminar la materia orgánica presente. Enjuagar con abundante agua de la llave y al final con agua destilada para eliminar los residuos de detergente, así como las sustancias corrosivas.
- 2) Secar el material de vidrio a temperatura ambiente o en una estufa.
- 3) Poner en la boquilla de las pipetas un pedazo de algodón, de tal manera que el aire pase libremente a través de él.
- 4) Envolver con papel kraftín cada pipeta y espátula de Drigalski. Marcar en la envoltura el volumen de cada pipeta.
- 5) Esterilizar el material de vidrio en horno a temperatura de 170-180°C durante 1-2 horas o en autoclave a 115°C durante 15 minutos.

#### Preparación de la solución salina isotónica

- 1) En un matraz Erlenmeyer, agregar la cantidad de cloruro de sodio a preparar, disolverlo. Distribuir 9 mL de solución en cada uno de los tubos con tapa de baquelita, no hay que apretar totalmente la tapa hasta después de la esterilización.

#### Preparación de medios de cultivo

Se prepararán las placas con medio de cultivo de acuerdo a las diluciones que se quieran sembrar.

- 1) Colocar la mitad del volumen total de agua destilada en el matraz en donde se va a preparar el medio de cultivo.
- 2) Pesarse en un pedazo de papel aluminio, cada uno de los componentes del medio. Cada vez que pese un reactivo, limpiar perfectamente la espátula para evitar contaminación de reactivos. Adicionar el primer componente y disolverlo, adicionar los siguientes hasta que se haya disuelto el componente anterior (respetar el orden indicado en las formulaciones).
- 3) Adicionar la otra mitad de agua y homogenizar el contenido.
- 4) Ajustar el pH del medio.
- 5) Proceder a calentarlo, de preferencia en baño maría. Tapar el matraz con una torunda de algodón para evitar pérdida de agua y concentrar el calor. Al estar

calentando, tener cuidado de agitar constantemente para evitar que el agar se queme. El medio está listo cuando es transparente.

6) Tapar cada matraz con torundas de algodón y cubrirlos con un gorrito de papel kraftín (este protege a los algodones y evita que durante la esterilización estos se humedezcan).

7) Meter los matraces en autoclave, cerrarla, dejar calentar con la válvula abierta y esperar a que el aire del interior del autoclave sea desplazado totalmente por el vapor de agua, lo que se habrá conseguido, cuando a través de la válvula salga una columna continua de vapor de agua. Cerrar la válvula y esperar a que la presión suba hasta 15 libras de presión y a una temperatura alrededor de 120-121°C, mantener en estas condiciones durante 15 minutos.

8) Al término del ciclo de esterilización, apagar el autoclave, esperar a que la presión baje a cero y sacar el material.

9) Dejar enfriar los medios hasta una temperatura aproximada de 45 a 50°C. Junto a la flama del mechero abrir el matraz y vaciar aproximadamente de 15 a 20 mL de medio en cada una de las cajas de plástico estériles. Dejar enfriar durante 20 minutos hasta que solidifique el medio y después voltearlas para evitar que se forme agua de condensación en las tapas.

10) Si los medios no se van a usar inmediatamente, colocar las cajas en bolsas de poliestireno, etiquetar cada paquete indicando el nombre de la persona que preparó el medio, fecha de preparación y nombre del medio y almacenarlos en refrigeración.

11) Para su uso, los medios deben sacarse del refrigerador con una hora de anticipación.

### Agar nutritivo o gelosa

Rehidratar 23 g del medio de cultivo en un litro de agua destilada. Calentar hasta disolución total. Esterilizar en autoclave a 115°C durante 15 minutos.

### Agar almidón

|                                 |                 |
|---------------------------------|-----------------|
| Peptona de carne                | 5.0 g/L de agua |
| Extracto de levadura            | 5.0 g           |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 5.0 g           |
| Almidón soluble                 | 3.0 g           |
| Agar bacteriológico             | 18.0 g          |

En 300 mL de agua solubilizar el almidón calentando y agitando; solubilizar los otros ingredientes en los 700 mL restantes, mezclar las dos partes. Ajustar el pH a 7.0 y esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Dejar enfriar aproximadamente a 45°C y vaciar de 15 a 20 mL de medio en cajas de Petri.

### Agar leche descremada

#### Solución "A"

|                     |                  |
|---------------------|------------------|
| Dextrosa            | 10.0 g/L de agua |
| Agar bacteriológico | 20.0 g           |

#### Solución "B"

|                  |        |
|------------------|--------|
| Leche descremada | 15.0 g |
|------------------|--------|

En un matraz Erlenmeyer de 500 mL, colocar 250 mL de agua destilada, disolver la leche y esterilizar a 110°C durante 10 minutos. En otro matraz poner 750 mL de agua, agregar el agar y la dextrosa, fundir y esterilizar a 110°C durante 10 minutos. En condiciones de asepsia incorporar la leche a la solución "A", homogenizar y dejar enfriar aproximadamente a 45°C y vaciar de 15 a 20 mL de medio en cajas de Petri.

Nota: Respetar los tiempos de esterilización.

### Medio mínimo

#### Solución 1

|                               |       |
|-------------------------------|-------|
| Fosfato dibásico de potasio   | 7.0 g |
| Fosfato monobásico de potasio | 2.0 g |
| Sulfato de amonio             | 1.0 g |
| Citrato de sodio              | 0.5 g |

Disolver en 250 mL de agua destilada.

#### Solución 2

|                     |        |
|---------------------|--------|
| Agar bacteriológico | 16.0 g |
|---------------------|--------|

Disolver en 500 mL de agua destilada, fundir.

#### Solución 3

|                    |       |
|--------------------|-------|
| Sacarosa o glucosa | 4.0 g |
|--------------------|-------|

Disolver en 250 mL de agua destilada

Esterilizar cada una de las soluciones por separado, enfriar y mezclarlas. En condiciones de asepsia agregar: 1 mL de sulfato de magnesio al 10% y 1 mL de vitamina B1 (tiamina) al 2% (esterilizar la vitamina por filtración). Homogenizar y dejar enfriar aproximadamente a 45°C y vaciar de 15 a 20 mL de medio en cajas de Petri.

## Agar-celulosa

Agar 15.0 g/L de agua destilada  
celulosa (madera, algodón, papel o cartón)

Colocar en un mortero un peso conocido de celulosa, macerar. Agregar a la cantidad de medio a preparar, disolver por calentamiento. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

## ANEXO D

### TÉCNICA PARA LA CUENTA DE MICROORGANISMOS

#### **Método de extensión superficial**

Para poder realizar esta metodología en el laboratorio, el analista deberá contar con material y medios de cultivo estériles.

#### Preparación de las diluciones

- 1) En condiciones de asepsia, colocar cada uno de los tubos que contienen 9.0 mL exactos del diluyente (solución salina isotónica) en una gradilla e identificarlos con la dilución correspondiente ( $10^{-2}$  a  $10^{-8}$ ).
- 2) Mezclar la muestra mediante agitación enérgica.
- 3) En condiciones de asepsia, introducir la pipeta a 2.5 cm de profundidad, tomar 10 mL y transferirlos al frasco que contiene 90 mL del diluyente (dilución 1:10), teniendo cuidado de colocar la punta 1 cm arriba de la superficie del líquido, una vez que se haya vaciado la pipeta, esperar 3 segundos y soplar. Eliminar la pipeta.
- 4) Tapar el frasco y agitarlo mediante movimientos de abajo hacia arriba (agitación vigorosa).
- 5) Mezclar nuevamente el contenido del frasco, introduciendo una pipeta limpia a 2.5 cm de profundidad del líquido, tomar 1 mL y transferirlo al primer tubo (dilución 1:100), teniendo cuidado de que la pipeta no haga contacto con el líquido. Eliminar la pipeta.
- 6) Repetir el procedimiento del inciso 5 y preparar las siguientes diluciones (1:1000 a 1:10,000,000), transfiriendo en cada ocasión 1 mL de la dilución anterior al siguiente tubo que contiene 9.0 mL de diluyente.

7) Con una pipeta limpia y estéril, mezclar el contenido de la dilución  $10^{-5}$  en la forma antes indicada, tomar 0.1 mL de la dilución y colocarlo en el centro de la placa bien seca.

8) En condiciones de asepsia, con la espátula de Drigalski (varilla de vidrio con ángulo), extender la gota sobre toda la superficie del medio.

9) Con pipetas limpias repetir el procedimiento e inocular las cajas correspondientes con las diluciones  $10^{-6}$  a  $10^{-8}$ .

10) Dejar que la muestra se absorba en el medio, invertir la caja e incubar a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 y 48 horas.

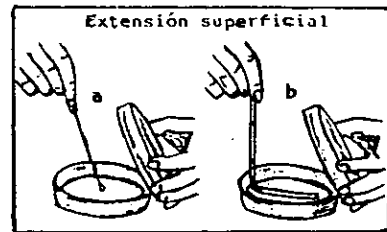
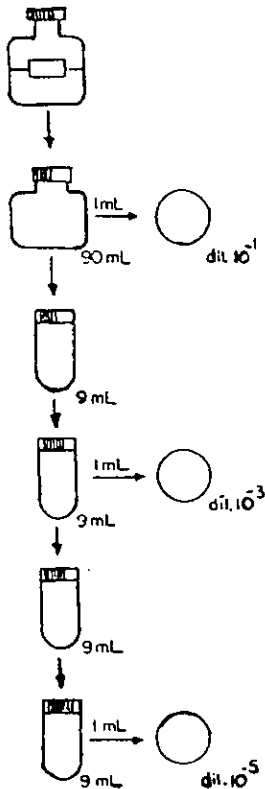
11) Después de la incubación, observar el efecto de la dilución. Cuando ésta sea aparente, seleccionar las placas que muestren entre 30 y 300 colonias.

12) Colocar la caja, con la tapa hacia abajo y la base hacia arriba y marcar cada colonia con plumón o lápiz grueso.

13) Contar el número de colonias desarrolladas en la superficie y calcular el número de microorganismos/mL de muestra con la siguiente fórmula:

$$\text{Promedio de colonias contadas} \times \text{Recíproco de la dilución} = \text{UFC/mL}$$

El resultado se expresa como UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC), no como microorganismos.



d Cuenta



c Incubación



$37^{\circ}\text{C}$  48hrs.