



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD BACTERIANA Y
ENZIMÁTICA EN EL PROCESO DE
BIODEGRADACIÓN AEROBIA DE VINAZAS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)
P R E S E N T A :
ERNESTO CARLOS REYES ALVARADO

TUTOR: DR. VÍCTOR MANUEL LUNA PABELLO



MÉXICO, D. F.,

JUNIO 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Víctor Manuel Luna Pabello en el laboratorio de Microbiología Experimental, en el Departamento de Biología de la Facultad de Química, de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Víctor Manuel Luna Pabello	Facultad de Química, UNAM
Dra. Ma. Del Carmen Wachter Rodarte	Facultad de Química, UNAM
Dr. Thangarasu Pandiyan	Facultad de Química, UNAM

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día 20 de Junio de 2006

El Jurado de Examen de Maestría estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Enrique Galindo Fentanes	Instituto de Biotecnología, UNAM
Vocal	Dra. Ma. del Carme Wachter Rodarte	Facultad de Química, UNAM
Secretario	Dr. Sergio Sánchez Esquivel	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Suplente	Dra. Maricarmen Quirasco B.	Facultad de Química, UNAM
Suplente	Dr. Francisco Ruiz Terán	Facultad de Química, UNAM

Reconocimientos

Al laboratorio de Microbiología Experimental, del Departamento de Biología de la Facultad de Química, de la Universidad Nacional Autónoma de México, dónde se realizó el trabajo experimental de la presente tesis.

Al Dr. Víctor Manuel Luna Pabello por la dirección de esta tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para los estudios de maestría.

A la dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) por el complemento de beca otorgado para la realización de la presente tesis.

Agradecimientos

Agradezco la enorme ayuda, conocimientos, confianza y paciencia que el doctor Víctor Manuel Luna Pabello me brindó, así como por darme la oportunidad de trabajar con usted y dirigir mi trabajo.

Asimismo, deseo expresar mi agradecimiento a mis compañeros del laboratorio de Microbiología Experimental: Adriana, Alicia, Ana, Claudia, Christopher, Eva, Héctor, Israel, Javier, Benjamín, Luis, Mónica, Otoniel, Patricia, René, Rosario, Tania y Yesenia.

Quiero agradecer también a la Dra. María del Carmen Wachter Rodarte y al Dr. Thangarasu Pandiyan Sarasvathi por la ayuda y experiencia que me brindaron.

A los miembros del jurado, gracias por todas sus opiniones y contribuciones para la presentación de esta tesis.

A Carmen, Yeya y Gaby por haber hecho agradable la estancia en la maestría y por su muy agradable amistad.

A la UNAM por haber sido mi casa de estudio y por brindarme lo oportunidad de prepararme profesionalmente.

A mis padres, gracias por sus preocupaciones y por todo lo que me han dado y que no tengo con que pagar, les doy las gracias y espero que se sientan orgullosos de mi.

Dedicatorias

A mis padres por ser un gran ejemplo en mi vida, por todo su amor, apoyo y paciencia que han tenido conmigo.

A mis hermanos: Fausto Alejandro, Norma Araceli, Jesús Gaspar, Saúl Omar y Sandro, cuyo apoyo fue indispensable para la consolidación de este trabajo.

A mis muy queridos sobrinos: Greta, Omar, Sofía y Gissele.

A mis amigos del inolvidable “OSCURO”: Osvaldo, Jaime, Bulmaro, David, Tacho, Guadalupe, Perlish, Perla, Wendy, Rodrigo, Chevit, Iliana, Giuliana, Stibalitz, Eréndira, Vladimir, Brenda, Sandra, Elke, Azucena, Paulina, Grecia, Areli.

A mis amigos de la orquesta, Milpa Alta, prepa y más: Norma, Paola, Dení, Berenice V, Daniel David, Aline, Zaira, Paulina H, Tania M, Itzel, Lizbeth, Areli M., Daniela, Elena, Julián, Octavio y de forma muy especial a Erandi Violeta L. G. por todo...

A mis amigos de la carrera de Química de Alimentos y de la Facultad de Química: Deisy H., Carmen F., Erick B., Gabriela M., Adriana M., Minerva J., Miguel G., José Luis C., Violeta V., Adriana I., Pilar H., Berenice de la B., Gabriela L., Rocío H., Nadine M., Aurora L., Monserrat F., Edgar Isac., Miguel H.

A todos ustedes y a sus familias, así como a todas aquellas viejas y nuevas amistades que también son importantes para mí, les agradezco su paciencia, comprensión y los buenos momentos que pasamos juntos. Los quiero mucho y les dedico este trabajo. Espero que nuestra bella amistad siga para siempre.

Ernesto Carlos Reyes Alvarado

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	2
1. INTRODUCCIÓN	4
2. MARCO DE REFERENCIA	7
2.1. LA INDUSTRIA AZUCARERA	8
2.2. DESCRIPCIÓN DE LAS VINAZAS.....	10
2.2.1. COMPONENTES PRESENTES EN LAS VINAZAS.....	11
2.2.2. USOS Y TRATAMIENTOS APLICADOS A LAS VINAZAS.....	12
2.3. PRUEBAS DE BIODEGRADACIÓN.....	14
2.4. GENERALIDADES DE LOS SISTEMAS DE BIOFILTROS.....	16
2.4.1. LECHO O MATERIAL DE SOPORTE.....	16
2.4.2. MICROORGANISMOS	17
3. OBJETIVOS	19
3.1. OBJETIVO GENERAL.....	19
3.2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	19
3.3. HIPÓTESIS.....	19
4. MATERIALES Y MÉTODOS	20
4.1. MATERIALES	20
4.2. ESTRATEGIA GENERAL DE TRABAJO	21
4.3. METODOLOGÍA.....	23

5. RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN	28
5.1. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LAS VINAZAS.....	28
5.2. PRUEBA DE BIODEGRADACIÓN AEROBIA DE VINAZAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE DQO.....	28
5.3. PRUEBAS DE BIODEGRADACIÓN AEROBIA DE VINAZAS A TRES VALORES CONSTANTES DE PH (5, 7 Y 9).....	38
5.4. PRUEBAS DE BIODEGRADACIÓN AEROBIA DE LAS VINAZAS EN LOS BIOFILTROS EXPERIMENTALES	50
6. CONCLUSIONES	61
7. REFERENCIAS.....	62
8. ANEXOS.....	70
A-1) TÉCNICAS ANALÍTICAS	70
<i>I DETERMINACIÓN DE DQO.....</i>	<i>70</i>
<i>II DETERMINACIÓN DE DBO₅.....</i>	<i>73</i>
<i>III AISLAMIENTO Y CUENTA DE GRUPOS BACTERIANOS</i>	<i>75</i>
<i>IV CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES DE EMPAQUE</i>	<i>78</i>
A-2) RESULTADOS EXPERIMENTALES DE SOPORTE ..	80
<i>I REPRODUCIBILIDAD DE LOS RESULTADOS.....</i>	<i>80</i>
<i>II RESULTADOS DE LA MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN LOS BIOENSAYOS A VALORES DE pH CONSTANTE (5, 7 Y 9).....</i>	<i>83</i>
<i>III RESULTADOS DE LA MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN LOS BIOFILTROS EXPERIMENTALES</i>	<i>87</i>
<i>IV PROPIEDADES DE LOS MATERIALES DE EMPAQUE.....</i>	<i>90</i>

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1. Composición general de las vinazas (Cortez y Pérez, 1997; Jiménez <i>et al.</i> , 2003; Mahimairaja y Bolan, 2004).....	4
Tabla 1-2. Límites máximos permisibles para la descarga de aguas residuales a los diferentes cuerpos receptores. Tomada de la NOM-001-SEMARNAT-1996.	6
Tabla 2-1. Descargas de agua residual del tipo municipal y no municipal en México (CNA, 2004).....	7
Tabla 2-2. Caudal de descarga de aguas residuales y carga orgánica de diferentes giros industriales (CNA, 2004).	8
Tabla 2-3. Comparación de la composición de vinazas obtenidas de diferentes fuentes (Cortez y Pérez, 1997).....	11
Tabla 2-4. Composición general de vinazas de melazas provenientes de remolacha azucarera (Vlyssides <i>et al.</i> , 1997).....	12
Tabla 4-1. Parámetros relevantes medidos a las vinazas.....	23
Tabla 4-2. Enzimas evaluadas en AE con el sistema api ZYM bioMérieux®.....	26
Tabla 5-1. Parámetros fisicoquímicos de las vinazas obtenidas de la industria azucarera-alcoholera.	28
Tabla 5-2. Resultados de la DQO del bioensayo de biodegradación abiótica, al inicio del bioensayo y al final.	29
Tabla 5-3. Parámetros de la cinética de primer orden, del proceso de biodegradación de las vinazas sin y con la adición de lodos activados.	32
Tabla 5-4. Velocidad inicial de la biodegradación aerobia de las vinazas a diferentes concentraciones iniciales, sin y con la adición de lodos activados.	32
Tabla 5-5. Parámetros cinéticos del ajuste a la cinética de Michaelis-Menten para los bioensayos sin y con adición de lodos activados.	34
Tabla 5-6. Valores del coeficiente de correlación (R ²) de la regresión lineal de la relación del pH con el porcentaje de biodegradación.	37
Tabla 5-7. Parámetros del ajuste a una cinética de primer orden aplicado a las curvas de biodegradación con pH constante y testigo.....	38
Tabla 5-8. Porcentaje de grupos bacterianos y enzimáticos encontrados al inicio, al día de mayor remoción y al final del proceso de depuración, para cada uno de los bioensayos a valores de pH constante (5, 7y 9) y el testigo.	45

Tabla 5-9. Parámetros del ajuste a una cinética de primer orden, de las curvas de biodegradación aerobia de vinazas en los BE.	52
Tabla 5-10. Resultados del contenido total de materia orgánica disuelta (mg DQO) en las pruebas realizados en los BE alimentados con vinazas y con agua de la llave.	54
Tabla 5-11. Porcentaje de grupos bacterianos y enzimáticos, encontrados en las diferentes etapas del proceso de biodegradación aerobia de las vinazas, en los BE.	58
Tabla 8-1. Cantidades de muestras y reactivos para tubos de digestión de dos tamaños.	71
Tabla 8-2. Valores de la medición de la actividad de la fosfatasa alcalina durante el proceso de biodegradación de las vinazas, en los bioensayos a valores de pH constante de 5, 7 y 9 y el testigo.	82
Tabla 8-3. Distribución y abundancia de la AE durante el proceso de biodegradación en el bioensayo a valor constante de pH 5.	83
Tabla 8-4. Distribución y abundancia de la AE durante el proceso de biodegradación en el bioensayo a valor constante de pH 7.	84
Tabla 8-5. Distribución y abundancia de la AE durante el proceso de biodegradación en el bioensayo a valor constante de pH 9.	85
Tabla 8-6. Distribución y abundancia de la AE durante el proceso de biodegradación en el bioensayo testigo.	86
Tabla 8-7. Distribución y abundancia de la AE, durante el proceso depurativo de vinazas, en la etapa inicial de operación de los BE.	87
Tabla 8-8. Distribución y abundancia de la AE, durante el proceso depurativo de vinazas, en la etapa intermedia de operación de los BE.	88
Tabla 8-9. Distribución y abundancia de la AE, durante el proceso depurativo de vinazas, en la etapa final de operación de los BE.	89
Tabla 8-10. Resultados de los parámetros evaluados a los materiales de empaque.	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2-1. Diagrama general del proceso de obtención de alcohol etílico a partir de melaza de caña de azúcar.....	10
Figura 2-2. Esquema de la película biológica activa (tomado de Luna-Pabello, 1990).....	18
Figura 4-1. Esquema básico de la metodología general planteada para la fase experimental.	22
Figura 4-2. Esquema general de diseño de las columnas empacadas a usar durante la etapa experimental.	25
Figura 4-3. Escala de tonalidades para establecer el nivel de AE.....	27
Figura 5-1. Curvas de biodegradación aerobia de la materia orgánica a diferentes concentraciones iniciales de DQO.	29
Figura 5-2. Porcentaje de remoción de DQO a diferentes concentraciones, para los bioensayos sin y con adición de lodos activados.	30
Figura 5-3. Representación gráfica del progreso de una reacción, concentración de sustrato (S); producto (P), enzima-sustrato (ES) y de enzima libre (E). a) modelo aplicado a reacciones enzimáticas (Segel, 1975); b) modelo donde la biomasa (B) es el complejo enzimático.	31
Figura 5-4. Curvas del progreso del proceso de biodegradación (DQO en función del tiempo) de las vinazas sin y con la adición de lodos activados.....	31
Figura 5-5. Modelo cinético de Michaelis-Menten para los procesos de biodegradación de vinazas sin y con la adición de lodos activados.	33
Figura 5-6. Biodegradación la concentración de sustrato en el agua residual (mg L^{-1}) como función del logaritmo de la concentración inicial de microorganismos (número de células mL^{-1}). Simkins y Alexander (1984).	35
Figura 5-7. Perfil del pH durante el proceso de biodegradación a las diferentes concentraciones de DQO en los bioensayos sin y con la adición de lodos activados.....	37
Figura 5-8. Cinéticas de biodegradación y porcentaje de remoción de DQO, en los bioensayos a valores de pH constante (5, 7 y 9) y el testigo (sin ajuste de pH).	38

Figura 5-9. Curvas de crecimiento de los 6 grupos bacterianos, durante la biodegradación aerobia de vinazas, en los bioensayos a valores de pH constante (5, 7 y 9) y testigo.....	40
Figura 5-10. Porcentaje de crecimiento de los grupos bacterianos, evaluados durante la biodegradación aerobia de vinazas, en los bioensayos a valores de pH constante (5, 7 y 9) y testigo.	41
Figura 5-11. Gráficas del porcentaje de AE por grupo de enzimas, evaluados durante la biodegradación aerobia de vinazas, en los bioensayos a valores de pH constante (5, 7 y 9) y testigo.	42
Figura 5-12. Diversidad del crecimiento bacteriano y de la AE en los bioensayos a valores constantes de pH (5, 7 y 9) y el testigo.	46
Figura 5-13. Graficas de la correlación entre el porcentaje de remoción de DQO y la diversidad bacteriana.....	47
Figura 5-14. Graficas de la correlación entre el porcentaje de remoción de DQO y la diversidad enzimática.....	48
Figura 5-15. Biofiltros experimentales empleados para las pruebas de biodegradación aerobia de vinazas.	50
Figura 5-16. Curvas de biodegradación aerobia de las vinazas en los BE. Los días 0, 4, 12, 16, 24 y 28 son los días que se adicionaron vinazas a una concentración de 10%.	52
Figura 5-17. Porcentaje de remoción de DQO durante los 4 días de retención hidráulica, para los días de adición de vinazas: 0, 4, 12, 16, 24 y 28, en los BE.....	53
Figura 5-18. Remoción de materia orgánica (DQO) en los BE: a) alimentados con vinazas; b) alimentados con agua de la llave.	54
Figura 5-19. Curvas de crecimiento de los 6 grupos bacterianos durante la biodegradación aerobia de vinazas en los BE.....	55
Figura 5-20. Porcentaje de crecimiento de los grupos bacterianos, evaluados durante la biodegradación aerobia de vinazas en los BE.	56
Figura 5-21. Porcentaje de actividad de las enzimas evaluadas durante el proceso de biodegradación aerobia de las vinazas en los biofiltros experimentales, durante las etapas inicial, intermedia y final, del proceso.	57

Figura 5-22. Diversidad del crecimiento bacteriano y de la AE, durante la biodegradación aerobia de las vinazas en los BE.59

Figura 5-23. Graficas de la correlación entre el porcentaje de remoción de DQO y la diversidad bacteriana y enzimática.60

Figura 8-1. Fotografías de los materiales de empaque, escoria volcánica roja y gravilla blanca, después de la molienda, tamizado y lavado.90

Figura 8-2. Distribución del área superficial de los materiales de empaque, escoria volcánica roja y gravilla blanca.90

Figura 8-3. Perfiles de velocidad para cada uno de los materiales de empaque: EVR y GB.92

Figura 8-4. Adsorción de materia orgánica (DQO), de las vinazas, en 10 g de mezcla de material de empaque de los biofiltros.92

ABREVIATURAS

AE	Actividad Enzimática
ANOVA	Análisis de Varianza
BE	Biofiltros Experimentales
CNA	Comisión Nacional del Agua
CU	Ciudad Universitaria
DA	Densidad Aparente
DR	Densidad Real
DBO ₅	Demanda Bioquímica de Oxígeno en 5 días.
DQO	Demanda Química de Oxígeno
E	Equidad o Igualdad
EVR	Escoria Volcánica Roja (Tezontle Rojo)
GB	Gravilla Blanca (Granzón)
H	Índice de Diversidad
k	Constante de velocidad
K _m	Constante de Michaelis-Menten
L	Litros
N	Normalidad
NOM	Norma Oficial Mexicana
OD	Oxígeno Disuelto
SEMARNAT	Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales
S ₀	Concentración inicial de substrato
ST	Sólidos Totales
SDT	Sólidos Disueltos Totales
SV	Sólidos Voátiles
TRH	Tiempo de Residencia Hidráulico
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UV	Ultra Violeta
V _{MAX}	velocidad máxima
X ₀	Concentración inicial de inóculo

RESUMEN

Las vinazas son aguas residuales generadas por la industria azucarera-alcoholera, son aguas con alta carga de materia orgánica, determinada como demanda química de oxígeno (DQO). Generalmente son dispuestas a ríos o son usadas como aguas de riego en suelos, sin embargo, la incorrecta disposición de las vinazas puede causar daños al ambiente. El presente trabajo se enfocó a la evaluación del efecto de la concentración inicial de DQO en las vinazas (100, 50, 25, 10 y 5% de la concentración inicial), sobre la velocidad de biodegradación aerobia de las vinazas, en un sistema de biomasa en suspensión sin y con la adición de lodos activados. Posteriormente, a una concentración del 10% de vinazas, se evaluó el efecto del pH en la velocidad de biodegradación. Además se estudió el proceso de biodegradación aerobia en sistemas de biofiltros experimentales (BE). Por otro lado, también se evaluó la diversidad bacteriana y enzimática y se analizó su relación con el proceso de biodegradación. Los resultados de los bioensayos de biodegradación aerobia a diferentes concentraciones de vinazas, sin y con adición de lodos activados, se ajustaron a una cinética de primer orden. La adición de lodos activados incrementó en 1.7 veces la velocidad de biodegradación (sin lodos activados: $k = 0.015 \text{ d}^{-1}$; con lodos activados: $k = 0.026 \text{ d}^{-1}$). Además, con el modelo cinético de primer orden, se estimó que con la adición de lodos activados, el tiempo de tratamiento de las vinazas para obtener una concentración de 0.15 g L^{-1} de DQO, a partir de una concentración de 100 g L^{-1} de DQO, fue de 167 días. Al aplicar el modelo de Michaelis-Menten, la máxima velocidad del proceso de biodegradación, sin adición de lodos activados fue menor ($V_{\text{MAX}} = 1.3 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), en comparación con los obtenidos cuando se adicionaron lodos activados ($V_{\text{MAX}} = 10.0 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$). En cuanto a la K_m , para el bioensayo sin lodos activados fue mayor ($K_m = 70.0 \text{ g L}^{-1}$) que en el bioensayo con lodos activados ($K_m = 432.0 \text{ g L}^{-1}$). Sin embargo, la relación $V_{\text{MAX}} K_m^{-1}$, fue más alta con la adición de lodos activados (2.4 d^{-1}) que sin la adición de lodos activados (2.0 d^{-1}), corroborando que la adición de lodos activados aumentó la eficiencia del proceso de biodegradación. Estos resultados indican que no hay inhibición del proceso de biodegradación por altas concentraciones de DQO en las vinazas. En cuanto a los bioensayos de biodegradación aerobia de vinazas a una concentración del 10%, manteniendo los valores constantes de pH en 5, 7 y 9 y un testigo sin ajuste, los resultados indican que el pH no influyó en la velocidad de biodegradación, ya que no se encontró diferencia significativa ($p=0.05$) entre las constantes de velocidad ($k = 0.22, 0.20$ y

0.23 d⁻¹ a pH 5, 7 y 9, respectivamente). Sin embargo, cuando el valor del pH no fue ajustado, la velocidad del proceso de biodegradación fue menor ($k = 0.05 \text{ d}^{-1}$), debido a la baja velocidad del crecimiento bacteriano en ese bioensayo. En cuanto a los bioensayos realizados en los BE, la mayor velocidad de biodegradación se obtuvo en los días 12 y 26 de operación ($k = 0.25 \text{ d}^{-1}$ en ambos casos), mientras que para los días 0, 4, 24 y 28, la velocidad de biodegradación fue menor ($k = 0.04$, $k = 0.14 \text{ d}^{-1}$, $k = 0.21$ y $k = 0.09 \text{ d}^{-1}$, respectivamente). La disminución en la capacidad de alimentación, de los BE, se presentó a los 12 días y el taponamiento del sistema a los 28 días de operación. De forma general, cuando la diversidad bacteriana y de actividad enzimática aumentan, se presenta un mayor porcentaje de remoción. Los perfiles de remoción de materia orgánica, determinada como DQO y los de diversidad bacteriana y enzimática, resultan muy similares, por lo que estos últimos parámetros pueden ser empleados para evaluar la calidad del proceso de sistemas aerobios durante el proceso biodegradación.

1. INTRODUCCIÓN

Los ingenios azucareros-alcoholeros (destilerías), son uno de los sectores que más contribuye a la contaminación de suelos y aguas terrestres y costeras del país, en cuanto al aporte de materia orgánica biodegradable (CNA, 2004). Siendo las vinazas el principal subproducto con mayor impacto ambiental, descargadas comúnmente en los suelos aledaños (como agua de riego) y en los cuerpos de agua naturales (Cámara Azucarera, 2004; Jiménez *et al.*, 2003; Mahimairaja y Bolan, 2004). A los fondos remanentes que quedan al final del proceso de obtención del alcohol por destilación, se le conoce como vinazas. Éstas son aguas residuales de color pardo oscuro que presentan una alta concentración de materia orgánica disuelta, sólidos suspendidos y un pH ácido. Debido a su alto contenido en sales, acidez y a las características generales de las vinazas, como se puede observar en la Tabla 1-1, resulta muy agresiva, sin tratamiento previo, para los sitios receptores de esta agua residual, ocasionando deterioro al ambiente. Por ello, éste tipo de prácticas es poco recomendable y hace necesario fijar límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de estas industrias, así como desarrollar tecnologías capaces de tratar este tipo de aguas residuales.

Tabla 1-1. Composición general de las vinazas (Cortez y Pérez, 1997; Jiménez *et al.*, 2003; Mahimairaja y Bolan, 2004).

<i>Parámetros</i>	<i>Concentración</i>	<i>Parámetros</i>	<i>Concentración</i>
DQO (g L ⁻¹)	60 -120	Potasio (g L ⁻¹)	9 - 17
DBO ₅ (g L ⁻¹)	50 -110	Calcio (g L ⁻¹)	2 - 7
Sólidos totales (g L ⁻¹)	80 - 110	Magnesio (g L ⁻¹)	1 - 2
Sólidos volátiles totales (g L ⁻¹)	60 - 80	Sodio (g L ⁻¹)	0.5 - 1.0
Sólidos suspendidos (mg L ⁻¹)	4 - 6	Cloruros (g L ⁻¹)	3.0 - 3.5
Carbohidratos (g L ⁻¹)	5 - 10	Zinc (mg L ⁻¹)	3 - 10
Lípidos (g L ⁻¹)	4 - 8	Cobre (mg L ⁻¹)	0.5 - 2.0
Proteínas (g L ⁻¹)	30 - 40	Manganeso (mg L ⁻¹)	4.5 - 5
Fosfatos totales (mg L ⁻¹)	90 - 120	Conductividad (mS cm ⁻¹)	40 - 60
Nitrógeno total (g L ⁻¹)	2 - 8	pH	3 - 5
Sulfatos totales (mg L ⁻¹)	4 - 5		

En México, la Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996, es la que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales, en aguas y bienes nacionales (Tabla 1-2). Esta norma surgió con el objetivo de proteger la calidad de los mantos freáticos e involucra a los municipios, comercios e industrias, incluyendo las destilerías. De esta forma, la generación de vinazas, no solo es un problema de los ingenios azucareros-alcoholeros, sino que también involucra a los productores de tequila, brandy, vino, ron, vodka, ginebra, whisky, mezcal y charanda, entre otros. Por lo que las grandes empresas productoras, podrían estar interesadas en tener sistemas de tratamiento que sean baratos y eficientes, incrementando la necesidad de mejorar o desarrollar nuevas tecnologías eficientes para el tratamiento de las vinazas, que además sean de bajo costo en operación y mantenimiento.

Una herramienta ampliamente usada para el diseño y mejora de sistemas de tratamiento, así como para evaluar el tiempo de degradación total y la permanencia o acumulación de compuestos recalcitrantes, es el estudio de las cinéticas de biodegradación de compuestos orgánicos en aguas residuales o en cuerpos naturales (Ahtiainen *et al.*, 2003; Alam *et al.*, 2003; Blok, 1994b; Nakhla *et al.*, 2005; Nyholm, 1996; Petruccioli *et al.*, 2002; Zgajnar-Gotvajn y Zagorc-Koncan, 1999). Además, el estudio del crecimiento microbiano y de la actividad enzimática (AE), por otro lado, pueden ser empleados para el monitoreo de la calidad de suelos contaminados y de los procesos de biodegradación en aguas residuales y procesos como el compostaje (Baran *et al.*, 2004; Leirós *et al.*, 1999; Margesin *et al.*, 2000; Pascual *et al.*, 2000; Taylor *et al.*, 2002; Trasar-Cepeda *et al.*, 1998; Vezzuli *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2005).

De esta forma, se plantea determinar las cinéticas de biodegradación de la materia orgánica, presente en las vinazas, a diferentes concentraciones. Evaluar el efecto del pH, ya que este puede afectar a los procesos biológicos, en el proceso de biodegradación aerobia de la materia orgánica, a una misma concentración inicial de DQO. Por otro lado, se evaluará el proceso de biodegradación aerobia de vinazas en sistemas de biofiltros aerobios, debido a que estos sistemas tienen la capacidad de remover altas concentraciones de materia orgánica, medida como Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO₅). Asimismo, se evaluará el crecimiento bacteriano, la actividad enzimática y su relación con el proceso de biodegradación.

Tabla 1-2. Límites máximos permisibles para la descarga de aguas residuales a los diferentes cuerpos receptores. Tomada de la NOM-001-SEMARNAT-1996.

PARÁMETROS (<i>mg L⁻¹ excepto cuando se especifique</i>)	EMBALSES NATURALES Y ARTIFICIALES																					
	RÍOS						AGUAS COSTERAS						SUELO									
	Uso en riego agrícola (A)		Uso público urbano (B)		Protección de vida acuática (C)		Uso en riego agrícola (A)		Uso público urbano (B)		Explotación pesquera, navegación y otros usos (A)		Recreación (B)		Estuarios (B)		Uso en riego agrícola (A)		Humedales Naturales			
	P.M.	P.D.	P.M.	P.D.	P.M.	P.D.	P.M.	P.D.	P.M.	P.D.	P.M.	P.D.	P.M.	P.D.	P.M.	P.D.	P.M.	P.D.	P.M.	P.D.		
Temperatura °C	N.A.	N.A.	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	N.A.	N.A.	40	40	
Grasas y Aceites	15	25	15	25	15	25	15	25	15	25	15	25	15	25	15	25	15	25	15	25	15	25
Materia Flotante	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente
Sólidos Sedimentables (mL L ⁻¹)	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	N.A.	N.A.	1	2		
Sólidos Suspendidos Totales	150	200	75	125	40	60	75	125	40	60	150	200	75	125	75	125	N.A.	N.A.	75	125		
Demanda Bioquímica de Oxígeno	150	200	75	125	40	60	75	125	30	60	150	200	75	125	75	125	N.A.	N.A.	75	125		
Nitrógeno Total	40	60	40	60	15	25	40	60	15	25	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	15	25	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.		
Fósforo Total	20	30	20	30	5	10	20	30	5	10	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	5	10	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.		

P.M. Promedio Mensual; P.D. Promedio diario; N.A. No Aplica.

2. MARCO DE REFERENCIA

Durante muchos años el ambiente ha sido constantemente sometido a la acción contaminante de las actividades antropogénicas, acción que se ha incrementando constantemente con el crecimiento de las poblaciones (Boopathy, 2000; Reuschenbach *et al.*, 2003). Dicho crecimiento ha llevado a explotar de manera desmedida los recursos naturales, produciendo un desequilibrio en el ambiente y evitando que se tenga un proceso de recuperación o regeneración del equilibrio ecológico.

Uno de tantos problemas es el uso del agua como vehículo para la eliminación de desechos y la disposición de los efluentes hacia los cuerpos de agua superficiales y suelos, generando una creciente contaminación (Tabla 2-1), no solo en México sino en todo el mundo. Lo que ha tenido como consecuencia una disminución de la disponibilidad de este recurso, además de problemas como el agotamiento progresivo de los mantos freáticos, el deterioro de suelos, desequilibrios en la flora y fauna silvestre y el acrecentamiento en enfermedades de tipo gastrointestinal. Dichos problemas son el resultado de una incorrecta disposición de las aguas residuales, incluyendo las de origen doméstico, industrial y de la actividad agrícola.

Tabla 2-1. Descargas de agua residual del tipo municipal y no municipal en México (CNA, 2004).

<i>Parámetro</i>	<i>Tipo de agua residual</i>	
	Municipales	No municipales incluida la industria
Caudal de descarga ($\text{km}^3 \text{ año}^{-1}$)	7.95 ($252 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$)	5.39 ($171 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$)
DBO_5 (t año^{-1})	2.15×10^6	1.10×10^6

En los últimos años, la insuficiente atención en el control de los problemas ambientales por la actividad productiva o industrial, ha sido identificada como una de las carencias más importantes del quehacer ambiental a nivel mundial. En México, del total de las fuentes puntuales de contaminación correspondientes a instalaciones industriales y agropecuarias, destaca la industria azucarera, que contribuye, del total industrial, con un caudal de descarga de aproximadamente el 27% (Tabla 2-2). Además, sus derivados son los de mayor incidencia en el deterioro del saneamiento y de las condiciones ambientales, contribuyendo con el mayor aporte de descarga de materia orgánica, con aproximadamente el 28% del total producido (Tabla 2-2), en comparación con las otras industrias.

Tabla 2-2. Caudal de descarga de aguas residuales y carga orgánica de diferentes giros industriales (CNA, 2004).

<i>Origen de la descarga</i>	<i>Caudal descargado</i>		<i>Carga orgánica</i>		
	Giro industrial	m ³ año ⁻¹	%	Miles t año ⁻¹	%
Acuacultura		5 836 953	39.60	7	0.11
Agropecuaria		280 290	1.90	1 063	16.86
Alimentaria		256 984	1.74	193	3.06
Azúcar		3 968 230	26.92	1 750	27.76
Beneficio de café		22 153	0.15	32	0.51
Celulosa y papel		478 757	3.25	108	1.71
Cerveza y malta		140 391	0.95	272	4.32
Curtiduría		4 567	0.03	9	0.14
Destilería y vitivinicultura		38 866	0.26	230	3.65
Minería		66 053	0.45	56	0.89
Petrolera		980 902	6.66	1 186	18.82
Química		597 826	4.06	406	6.44
Servicios		886 001	6.01	183	2.90
Textil		64 196	0.44	14	0.22
Otros giros		1 117 143	7.58	795	12.61

De manera particular, la industria azucarera comprende la producción de azúcar crudo y refinada, las destilerías e instalaciones para el procesamiento de derivados como son las fábricas de tableros de bagazo (material sólido y pulposo que queda después de la extracción del jugo de la caña), plantas de cera y otras. Por ello, éste es el sector con mayor incidencia en la contaminación de las aguas terrestres y costeras en términos de materia orgánica biodegradable (Cámara Azucarera, 2004; CNA, 2004; Ministerio de ciencia, tecnología y medio ambiente, 1998).

2.1. LA INDUSTRIA AZUCARERA

Desde sus inicios en México, la agroindustria azucarera, ha estado ligada al desarrollo del país. Gracias a su amplia red de relaciones humanas, agrícolas e industriales y a sus innumerables implicaciones internas y externas, participando siempre en los grandes problemas nacionales. Sin embargo, esta industria en sus inicios, no preveía el aprovechamiento integral de la caña de azúcar, generando subproductos muy contaminantes, al desecharlos sin tratamiento y quedando desaprovechados en su mayoría (Jiménez-Ambriz y Martínez-Garza, 1995).

Durante su desarrollo, esta agroindustria se ha enfrentado a retos tecnológicos, para la utilización de los subproductos derivados del procesamiento de la caña de azúcar. Las mieles incristalizables o finales, conocidas como melazas, son un subproducto espeso y oscuro que pueden ser utilizadas como una fuente energética para la alimentación de animales poligástricos o como sustrato para la elaboración de alcohol etílico y otros insumos de carácter biotecnológico (Jiménez-Ambriz y Martínez-Garza, 1995).

Actualmente, en México existen 58 ingenios azucareros, cuya distribución se encuentra principalmente en los estados de Veracruz, Oaxaca, San Luis Potosí, Michoacán, Sinaloa, Tabasco, Nayarit, Puebla, Chiapas, Morelos, Tamaulipas, Quintana Roo, Campeche y Colima. Del total de los ingenios, 27 son propiedad del Gobierno Federal y los 31 ingenios restantes son de propiedad privada (Cámara Azucarera, 2004). Muchos de estos ingenios cuentan con sus propias destilerías, las cuales producen alcohol a partir de la fermentación de las melazas, éstas están constituidas principalmente por sacarosa, azúcares reductores (glucosa), monosacáridos y las impurezas que no se pudieron separar en la cachaza (material marrón oscuro, constituido por una mezcla de fibra de caña, sacarosa, coloides, cera y minerales) (García *et al.*, 1997; Sangave y Pandit, 2004). Sin embargo, las melazas deben ser diluidas para realizar la fermentación y producir etanol. Posteriormente el caldo se introduce a una batería de torres de destilación, donde se separa el alcohol etílico, generando como subproducto grandes cantidades de agua con características bastantes agresivas (Jiménez *et al.*, 2003; Pandiyan *et al.*, 1999). Siendo dispuestas en ríos y suelos, sin tratamiento y sin considerar su impacto ambiental y deterioro al ecosistema (Cortez y Pérez, 1997; Jiménez *et al.*, 2003; Vlyssides *et al.*, 1997). Por ello, la importancia tanto tecnológica como social y económica, de la agroindustria azucarera, hace de ello uno de los principales retos de los profesionistas mexicanos, en la aplicación de los conocimientos para que esta agroindustria sea una fuente de trabajo, de recursos materiales y de ingresos, pero además que mantenga un equilibrio ecológico con su entorno.

2.2. DESCRIPCIÓN DE LAS VINAZAS

En el caso de la industria alcoholera, la obtención de alcohol se realiza a partir de la fermentación del mosto (caldo que se obtiene a partir de las melazas adicionadas con algunos factores de crecimiento para las levaduras), como se muestra en la Figura 2-1. Sin embargo, para la obtención del mosto, es necesario realizar diluciones de las melazas, lo que requiere usar grandes volúmenes de agua. Durante el proceso de fermentación las levaduras necesitan, para poder llevar a cabo el proceso de fermentación, una cantidad de sacarosa tal que no exceda la formación de etanol del 10% en volumen, ya que una cantidad por encima de este valor inhibe las funciones de las levaduras y de cualquier forma la sacarosa excedente no será metabolizada. Por tal motivo las melazas, que tienen un contenido de 30 a 50% de azúcares fermentables, deben ser diluidas con agua (García *et al.*, 1997; Jiménez-Ambriz y Martínez-Garza, 1995; Sangave y Pandit, 2004). Una vez transcurrida la fermentación, se debe destilar el etanol, obteniéndose de este proceso grandes cantidades de agua residual de color pardo oscuro, con alto contenido de sólidos y pH ácido, generalmente conocida como vinaza (Jiménez-Ambriz y Martínez-Garza, 1995; Sangave y Pandit, 2006).

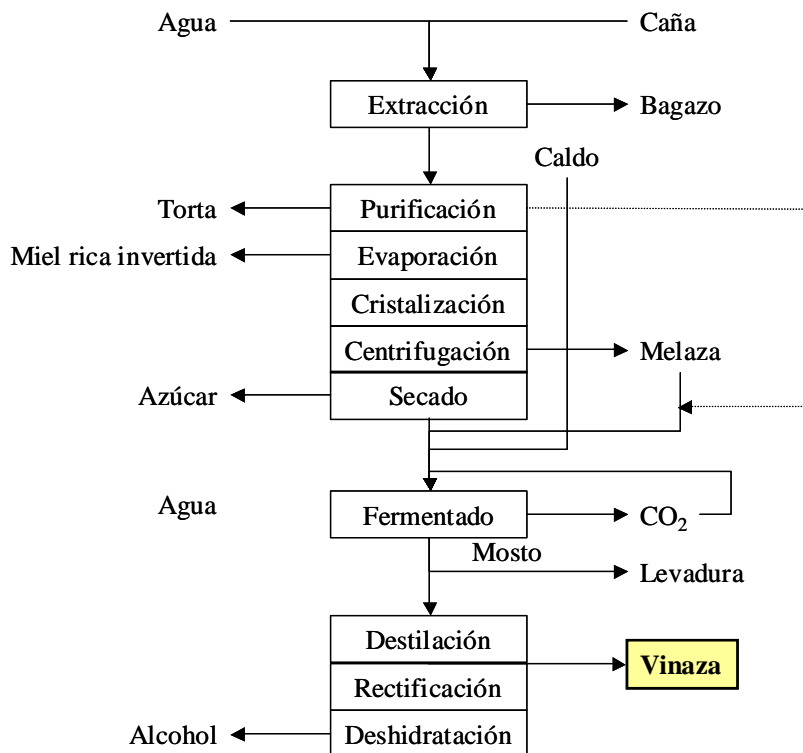


Figura 2-1. Diagrama general del proceso de obtención de alcohol etílico a partir de melaza de caña de azúcar.

Por lo tanto, la problemática de la industria azucarera y en particular de las destilerías, es la alta producción de vinazas, que se generan en una proporción aproximada de entre 15 y 20 litros por litro de alcohol destilado (Cortez y Pérez, 1997; Decloux *et al.*, 2002; Jiménez-Ambriz y Martínez-Garza, 1995; Nuissier *et al.*, 2002; Pandiyan *et al.*, 1999). Además, la disposición de las vinazas sin tratamiento tiene un grave impacto ambiental, siendo un problema no sólo de la industria azucarera-alcoholera sino en general de las destilerías (Jiménez *et al.*, 2005). En Francia, por ejemplo, una empresa alcoholera de tamaño promedio genera una contaminación equivalente a 15 000 habitantes en términos de DBO₅. Para una industria mexicana productora de tequila, se genera el equivalente a 125 000 habitantes (Lardon *et al.*, 2002).

2.2.1. COMPONENTES PRESENTES EN LAS VINAZAS

Las vinazas contienen principalmente agua y en disolución los productos metabólicos de *Saccharomyces cerevisiae* y otros organismos presentes en las tinas de fermentación, después de usar los azúcares remanentes de las melazas. También contienen materia orgánica constituyente de levadura muerta, materia soluble del jugo de caña no fermentable, sólidos totales entre 8 y 12% y un pH que varía entre 3 y 5 (Decloux *et al.*, 2002; Jiménez *et al.*, 1997). Sin embargo, su composición varía de acuerdo con la materia prima y el proceso, entre destilerías de alcohol y en menor grado, para una misma destilería, entre día y día de la zafra y entre zafras (García *et al.*, 1997; Sangave y Pandit, 2004). En la Tabla 2-3 y en la Tabla 2-4, a modo de ejemplo, se muestra la composición de vinazas de distintos orígenes.

Tabla 2-3. Comparación de la composición de vinazas obtenidas de diferentes fuentes (Cortez y Pérez, 1997).

Origen de vinaza	Fuente	Composición en % p/p						% sólidos totales	% sólidos orgánicos	pH
		K	P	N	Ca	Mg	cenizas			
Brasil	Melazas	0.48	0.01	0.04	0.07	0.02	1.95	46.47	4.63	4.8
Brasil	Jugo	0.17	0.01	0.01	0.04	0.01	1.50	6.69	5.14	4.6
Australia	Melazas	0.86	0.00	0.31	0.11	0.15	3.20	n.a.	n.a.	n.a.
Australia	Melazas	1.05	0.01	0.18	0.20	0.13	n.a.	9.00	n.a.	n.a.
India	Melazas	1.2	1.50	0.12	n.a.	n.a.	n.a.	8.00	n.a.	5.3
Louisiana	Melazas	0.89	0.00	0.02	0.01	0.01	5.00	n.a.	n.a.	4.5
México	Melazas	0.49	0.01	0.20	n.a.	n.a.	2.15	6.60	4.50	4.3

Tabla 2-4. Composición general de vinazas de melazas provenientes de remolacha azucarera (Vlyssides *et al.*, 1997).

<i>Parámetros (mg L⁻¹)</i>	<i>Total</i>	<i>Fase líquida</i>	<i>Fase sólida</i>
Sólidos totales	81 200.0	–	–
Sólidos volátiles totales	60 226.0	–	–
Sólidos suspendidos	3 837.0	–	–
DQO	72 000.0	–	–
Carbohidratos	5 526.1	5 265.0	261.0
Lípidos	3 813.6	3 633.0	180.0
Proteínas	27 656.7	36 50.0	1 307.0
Substancias desconocidas	23 226.6	22 132.0	1 098.0
Substancias inorgánicas	20 973.9	19 983.0	991.0
Fosfatos totales	91.0	–	–
Nitrógeno inorgánico total	840.0	–	–
Sulfatos totales	4 520.0	–	–
Nitrógeno total	7 340.0	–	–

Existe una gran variedad de estudios con la finalidad de aprovechar o tratar las vinazas, provenientes de la industria para la producción de alcohol, lo que ha dado lugar a una gran variedad de alternativas, a continuación se describen algunas de ellas.

2.2.2. USOS Y TRATAMIENTOS APLICADOS A LAS VINAZAS

La descarga de las vinazas a cuerpos receptores sin tratamiento, significa un alto peligro para el ambiente, debido principalmente a su alta concentración de materia orgánica, sólidos, sales y a su acidez, por lo que se han realizado diversos estudios enfocados al tratamiento de las mismas para diversos usos, dentro de los que destacan:

a) Alimento animal. Su contenido de proteínas y minerales permiten utilizarla como alimento animal, siempre que no se degraden las primeras. Es preferible en forma granular o en polvo para facilitar su mezcla con otros productos alimenticios (Cortez y Pérez, 1997).

b) Producción de levaduras y proteínas. Clarificada es sustrato para *Saccharomyces cerevisiae* en la producción de levaduras. Mediante fermentación aerobia se logra la producción de proteínas unicelulares (Ministerio de ciencia, tecnología y medio ambiente, 1998; Omar *et al.*, 2002).

c) Riego (fertirriego). La vinaza tiene alta concentración salina con un predominio relativo de potasio y sodio. Su empleo para riego, en las dosis adecuadas puede incrementar el rendimiento en la producción de caña y otros cultivos. Sin embargo, la experiencia en el riego de vinazas, expone la inconveniencia de su aplicación directa debido a su alta agresividad, por lo que su utilización pudiera llevarse a cabo mediante dilución con agua, en proporción aproximada de 1:10 (vinaza:agua) (Bueno-de-Paula, 1999; Jiménez-Ambriz y Martínez-Garza, 1995; Mahimairaja y Bolan, 2004; Ministerio de ciencia, tecnología y medio ambiente, 1998; Tenorio *et al.*, 2000).

d) Producción de biogas y fertilizantes. Los biorreactores anaerobios han sido ampliamente aplicados para el tratamiento de residuos de agro-industrias e industrias procesadoras de bebidas, encontrándose en este grupo las destilerías (Lardon *et al.*, 2002; Pérez *et al.*, 2001). Estos biorreactores degradan la materia orgánica con la producción de biogas (metano y dióxido de carbono). Varios estudios se han realizado para hacer más eficiente la producción de biogas a partir de las vinazas, utilizando diversos tipos de biorreactores anaerobios. Se estima una relación de 20-22 m³ de biogas (con 60% de metano) por m³ de vinaza y una eficiencia del 60% en la remoción de DBO₅. Los lodos resultantes son fertilizantes de muy buena calidad y logran captar más de un 60% del nitrógeno y fósforo residual (Ghosh *et al.*, 2002; Jiménez *et al.*, 1997; Jiménez *et al.*, 2005; Ministerio de ciencia, tecnología y medio ambiente, 1998; Pérez *et al.*, 2001; Solera *et al.*, 2002; Steyer *et al.*, 2002). Sin embargo, existe la dificultad de biodegradar rápidamente la alta concentración de materia orgánica, debido a la presencia de compuestos tóxicos (fenoles y melanoidinas) y a la alta salinidad. Bajo estas condiciones, las bacterias responsables de la biodegradación anaerobia se inhiben y disminuyen la eficiencia de estos sistemas, lo que ocasiona Tiempos de Residencia Hidráulico (TRH) muy altos (Ghosh *et al.*, 2002; Jiménez *et al.*, 2005; Lardon *et al.*, 2002; Pérez *et al.*, 2001). Por lo que generalmente se realizan diluciones de las vinazas antes de ser ingresadas a los biorreactores anaerobios y también se usan en combinación con sistemas de digestión aerobia (García *et al.*, 2003; Jiménez *et al.*, 1997; Jiménez *et al.*, 2003; Luna-Pabello *et al.*, 1994; Steyer *et al.*, 2002; Torrijos y Moletta, 1997).

De acuerdo con el panorama planteado, es recomendable usar más de una de las opciones anteriores para dar un mejor tratamiento a la totalidad de las vinazas que se generan en una destilería, sin embargo, es necesario profundizar en el estudio de los procesos de biodegradación.

2.3. PRUEBAS DE BIODEGRADACIÓN

En cuanto a la permanencia de compuestos químicos en el ambiente, se han realizado muchos estudios especialmente en el tratamiento de aguas residuales. Aunque la remoción de compuestos químicos en el ambiente acuático puede ocurrir por procesos abióticos tales como: adsorción, hidrólisis, fotólisis y volatilización hacia la atmósfera, la completa conversión en compuestos inorgánicos es realizada principalmente por la actividad microbiana (Ledakowicz *et al.*, 2001; Maeda *et al.*, 2005; OECD, 1993; Quiroga *et al.*, 1999; Reuschenbach *et al.*, 2003; Sangave y Pandit, 2006; Scott *et al.*, 2000). Además, los procesos de depuración mediante microorganismos ofrecen ventajas sobre otras técnicas convencionales (oxidación en presencia de ozono u otros compuestos químicos), cuando los microorganismos son capaces de metabolizar los compuestos orgánicos hasta su completa mineralización (Boopathy, 2000; Chudoba *et al.*, 1992; Pagga, 1997; Quiroga *et al.*, 1999). Sin embargo, es posible encontrar algunos compuestos químicos que no son fácilmente degradados o asimilados por los microorganismos, como los metales pesados (que pueden ser incorporados por los microorganismos, pero a altas concentraciones resultan letales), algunos compuestos clorados, fenólicos y otros compuestos tóxicos (Alexander, 1999; Boopathy, 2000; Margesin *et al.*, 2000).

La biodegradabilidad no depende sólo de la estructura molecular del compuesto, sino también, de los microorganismos disponibles y de otras condiciones ambientales, como la concentración del compuesto o mezcla de compuestos. Para evaluar si un compuesto (o mezcla) pueden ser biodegradados, se han desarrollado métodos estandarizados (ISO, OECD). Sin embargo, no son capaces de predecir la velocidad de biodegradación en las condiciones ambientales en que normalmente se encuentra dicho compuesto, factor importante y poco conocido en la evaluación de riesgo de un compuesto en el ambiente (Ahtiainen *et al.*, 2003; Pagga, 1997).

Una forma de estudiar los procesos de biodegradación de un contaminante en las condiciones que es desechado, es mediante el análisis de las cinéticas con las que se realiza dicho proceso. De esta forma se puede evaluar la concentración remanente de cierto contaminante en un tiempo o etapa de tratamiento determinado; así como su posible acumulación en el ambiente y la posibilidad de exponer este compuesto a un cultivo microbiano para su biodegradación (Alam *et al.*, 2003; Blok, 1994b; Mao y Smith, 1995; Nyholm, 1996; Zgajnar-Gotvajin y Zagorc-Koncan,

1996; Zgajnar-Gotvajn y Zagorc-Koncan, 1999). De igual forma es posible obtener parámetros que permitan mejorar las condiciones de tratamiento de agua residuales y diseñar (o rediseñar) sistemas con mayor eficiencia (Alam *et al.*, 2003; Petruccioli *et al.*, 2000; Petruccioli *et al.*, 2002).

Dentro de estos sistemas, los que son menos susceptibles a cambios de flujo y calidad de agua, son los humedales artificiales de flujo vertical y los filtros biológicos. Principalmente en aquellos en los que se realiza una biodegradación aerobia, en donde la remoción de la materia orgánica se realiza con mayor velocidad, en comparación con los sistemas anaerobios. Sin embargo, la combinación de ambos tipos de tratamiento (aerobios y anaerobios) ofrece mejores resultados en la remoción de contaminantes, que los sistemas por separado (Ciria *et al.*, 2005; Jiménez *et al.*, 1997; Jiménez *et al.*, 2003). Además, para evaluar un proceso de biodegradación, no es suficiente la medición de materia orgánica remanente, sino que es necesario valorar el proceso biológico, debido a que no toda la materia orgánica es mineralizada y pueden permanecer subproductos tóxicos (Bandick y Dick, 1999; Margesin *et al.*, 2000; Pascual *et al.*, 2000). Así, la medición de la respiración de la biomasa, cuanta microbiana y actividad enzimática, se han utilizado como herramientas para el monitoreo de procesos de biodegradación y del estado de contaminación en suelos y sistemas de tratamiento de aguas residuales (Baran *et al.*, 2004; Leirós *et al.*, 1999; Margesin *et al.*, 2000; Pascual *et al.*, 2000; Taylor *et al.*, 2002; Trasar-Cepeda *et al.*, 1998; Vezzuli *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2005). Aún así, la medición del crecimiento de un solo grupo de microorganismos o de la actividad de una enzima no resulta conveniente, ya que se pueden ver inhibidos por diversos factores. Por lo que la medición de varios grupos de organismos o enzimas, puede ser una herramienta útil en el estudio de los procesos de biodegradación, mediante el análisis de la diversidad, que relaciona tanto el número de especies (riqueza), como la abundancia relativa de las mismas. Una forma ampliamente aceptada para medir la diversidad de una comunidad, es mediante la función de Shannon y Wiener. Donde el valor obtenido, como resultado de la aplicación de esta función, es directamente proporcional al grado de diversidad presente en la comunidad bajo estudio (Luna-Pabello *et al.*, 1994). En este caso, dicha función combina tanto el número de bacterias, como la proporción relativa de los individuos. En cuanto a la AE, relaciona tanto el número de enzimas como el nivel de actividad relativa de cada enzima.

Por otro lado, considerando que se estudiará la biodegradación aerobia de las vinazas en sistemas de filtración biológica, a continuación se describen algunas generalidades de éstos.

2.4. GENERALIDADES DE LOS SISTEMAS DE BIOFILTROS

El sistema de depuración de aguas residuales a base de filtros biológicos ha sido probado como uno de los métodos más exitosos y usados para la eliminación de materia orgánica disuelta. La depuración se lleva a cabo por medio de la oxidación aerobia microbiana, en sistemas tales como los humedales artificiales y los biofiltros aireados (Bahgat *et al.*, 1999). Estos sistemas se han construido y desarrollado, para el tratamiento de aguas residuales, imitando los procesos que ocurren de manera natural, como sería el caso de los humedales naturales. En el caso de los sistemas artificiales presentan ventaja el tener variables controladas como son la carga de contaminantes, el TRH, el tipo de soporte y las dimensiones, que permiten incrementar la eficiencia del proceso de depuración (Luederitz *et al.*, 2001; Wetzel, 2001).

La gran mayoría de los estudios desarrollados sobre los humedales artificiales y los biofiltros, se han enfocado en su uso y aplicación para depurar aguas residuales domésticas (García *et al.*, 2004; Giraldo y Zárate, 2001; Luederitz *et al.*, 2001; Mantovi *et al.*, 2003; Meuleman *et al.*, 2003). Sin embargo, la posibilidad de emplear estos sistemas, para que puedan ser suministrados con aguas que no tengan las características generales de las aguas residuales domésticas, no se ha descartado (Miranda-Ríos y Luna-Pabello, 2001; Schulz *et al.*, 2003; Stottmeister *et al.*, 2003; Wetzel, 2001). En este sentido, la profundidad de los estudios realizados hasta el momento en sistemas de biofiltros, ha permitido que sean capaces de tratar aguas con altas cargas de contaminantes, como pueden ser las aguas residuales de origen industrial (Ibekwe *et al.*, 2003; Pinney *et al.*, 2000; Scholz y Xu, 2002a).

En los sistemas de filtración con actividad biológica, como los biofiltros y los humedales artificiales, la remoción de contaminantes del agua residual ocurre por: a) procesos físicos como la adsorción, sedimentación y filtración, por interacción con el lecho o material de empaque y b) a la transformación de los nutrientes en compuestos inorgánicos, realizada por la actividad bioquímica de los microorganismos (Ciria *et al.*, 2005; Schulz *et al.*, 2003).

2.4.1. LECHO O MATERIAL DE SOPORTE

El lecho funciona como soporte principal para el desarrollo de los microorganismos (biopelículas), como adsorbente de los compuestos presentes en el agua residual, por simple

contacto físico con las sustancias disueltas, y como filtro de los sólidos suspendidos que pudieran estar presentes (Stottmeister *et al.*, 2003; Wetzel, 2001). En cuanto a los procesos que ocurren dentro de estos sistemas, relacionados tanto con la composición química del medio de soporte, como con sus parámetros físicos (distribución y tamaño de partícula, espacio poroso, los grados de irregularidad y el coeficiente de permeabilidad), influyen en conjunto, en las condiciones para el desarrollo microbiano, los estados hidráulicos y la calidad del tratamiento de aguas residuales (García *et al.*, 2003; García *et al.*, 2004; Stottmeister *et al.*, 2003).

2.4.2. MICROORGANISMOS

Durante el tratamiento de aguas residuales en los sistemas de biofiltros, la descomposición de la materia orgánica y la asimilación de los nutrientes y la de otros contaminantes, presentes en las aguas residuales, es realizada principalmente por la actividad metabólica de bacterias, hongos y protozoos presentes en el lecho. Éstos se encargan de degradar la materia orgánica a compuestos de menor peso molecular y en óptimas condiciones hasta su mineralización, con la formación de metabolitos y biomasa, gracias a su actividad enzimática, incluyendo las enzimas excretadas y las inmovilizadas en el lecho (Shackle *et al.*, 2000).

Muchos de los procesos de biotransformación, biodegradación, mineralización, así como la asimilación de nutrientes, en el reciclaje de contaminantes, son eventos realizados por un consorcio complejo de comunidades microbianas que se encuentran integrando la biopelícula (Liu *et al.*, 2003; Luna-Pabello, 1990; Roy, 1993; Stottmeister *et al.*, 2003; Wetzel, 2001). La formación de esta biopelícula, comienza con la adhesión de las bacterias a las superficies disponibles del lecho, donde se desarrollan y estratifican en capas (Figura 2-2). Posteriormente, los microorganismos menos competentes son eliminados, hasta quedar constituida la biopelícula madura, la cual es una matriz compuesta principalmente por exopolímeros (exopolisacáridos), dentro de la cual se encuentran embebidas las bacterias (Liu *et al.*, 2003; Luna-Pabello, 1990; Roy, 1993; Shaw *et al.*, 1985; Vandevivere y Kirchman, 1993). Como un evento biológico, la formación de la biopelícula se ve influenciada por factores como la temperatura, el potencial redox, pH del medio y la concentración de carbón, nitrógeno, fósforo y otros minerales (Mattison *et al.*, 2002; Vandevivere y Kirchman, 1993).

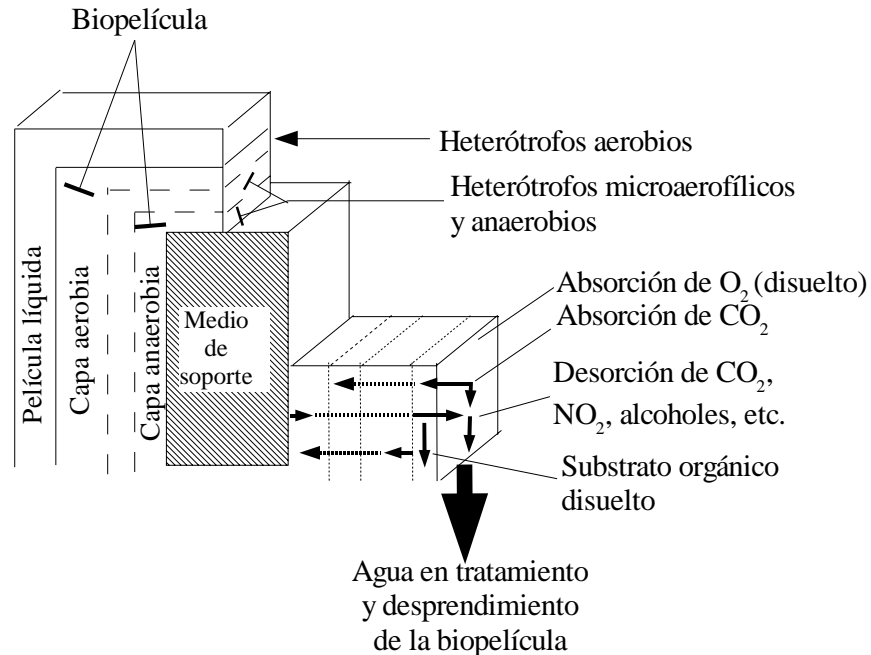


Figura 2-2. Esquema de la película biológica activa (tomado de Luna-Pabello, 1990).

Sin embargo, el crecimiento microbiano en medios porosos (acumulación de biomasa), la bioacumulación de nutrientes y la secreción de exopolisacáridos, ocasiona frecuentemente la reducción o pérdida de la permeabilidad del medio, fenómeno conocido como taponamiento (Campos *et al.*, 2002; Mattison *et al.*, 2002; Vandevivere y Baveye, 1992b; Vandevivere y Kirchman, 1993). El crecimiento microbiano y la bioacumulación de nutrientes, ocurren con mayor velocidad cuando se adicionan aguas residuales que tienen alta carga orgánica a este tipo de sistemas, alterando el funcionamiento completo en el tratamiento de aguas residuales y disminuyendo la calidad en la remoción de contaminantes (Ibekwe *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2003; Nguyen, 2001; Wetzel, 2001). En cuanto a los polisacáridos, éstos juegan un papel importante en el efecto de taponamiento, involucrando a las bacterias capaces de sintetizar exopolímeros. El mecanismo por el cual se produce la síntesis de polisacáridos, responde directamente a señales externas y se encuentra bajo un control regulatorio a nivel de expresión genética (Shaw *et al.*, 1985; Stewart y Fogler, 2001; Vandevivere y Baveye, 1992b; Vandevivere y Kirchman, 1993).

De acuerdo con el panorama planteado, a continuación se exponen los objetivos para este trabajo.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Comparar la diversidad enzimática y bacteriana con el proceso de biodegradación aerobia de vinazas, en sistemas por lote con biomasa suspendida y en biofiltros experimentales.

3.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Conocer el efecto de la concentración de vinazas en la velocidad de biodegradación aerobia de vinazas, en matraces con biomasa en suspensión.
- Conocer el efecto del pH, en la velocidad de biodegradación aerobia de vinazas, en matraces con biomasa en suspensión.
- Evaluar el proceso de biodegradación aerobia de vinazas en biofiltros experimentales.
- Describir cómo es la relación entre la diversidad bacteriana y de la actividad enzimática, con el proceso de biodegradación.

3.3. HIPÓTESIS

El proceso de biodegradación de vinazas depende tanto de la diversidad de las bacterias involucradas en la degradación de la materia orgánica disuelta, como de la actividad metabólica. Por lo tanto, la medición de ambos parámetros, permitirá diagnosticar la calidad operante de los biofiltros durante el proceso de biodegradación aerobia de vinazas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. MATERIALES

- Las vinazas usadas para este estudio se obtuvieron de un muestreo realizado en un ingenio azucarero-alcoholero ubicado en el municipio de Comalcalco, estado de Tabasco. El lote obtenido de vinazas se conservó en refrigeración a 4 °C.
- Los materiales de empaque probados fueron: Escoria volcánica roja (tezontle, EVR) y Granzón (gravilla blanca, GB).
- Para la elaboración de los BE se usaron tubos de acrílico de 5.4 cm de diámetro externo y 60 cm de largo.
- Material adicional: bombas de aire, mangueras de plástico de 10 y 6 mm de diámetro, embudos de plástico, difusores de aire, agitadores magnéticos, barras magnéticas.
- Material de vidrio de laboratorio, que incluye: matraces Erlenmeyer de diferentes capacidades, cajas Petri, vasos de precipitados, probetas, buretas, tubos con tapón de rosca.
- Para la evaluación de la actividad enzimática: Galerías api ZYM bioMérieux®
- Reactivos y medios de cultivo.

EQUIPO

- Espectrofotómetro, con capacidad de medir a longitudes de onda de 420 y 600 nm.
- Horno, con temperatura mínima de 150°C.
- Mufla, con temperatura mínima de 550°C.
- Balanzas analíticas.
- Incubadora con temperatura de 20 – 28°C.

SOFTWARE

- Origin 7.0 OriginLab Corporation Copyright© 1991-2002
- Motic Image Plus 2.0 Motic China Group Co., LTD. Copyright© 2001-2004

4.2. ESTRATEGIA GENERAL DE TRABAJO

La descripción general de la metodología realizada se encuentra en la Figura 4-1. En primera instancia se caracterizó las vinazas y se evaluó la biodegradación aerobia a concentraciones de 100, 50, 25, 10 y 5%. Para ello se usaron matraces con biomasa en suspensión con un flujo constante de aire, que permitió mantener una concentración superior a los 2 mg L⁻¹ de oxígeno disuelto (OD; condiciones aerobias). Las pruebas de biodegradación se realizaron siguiendo el protocolo establecido en la OECD (1993), con algunas modificaciones como se describe en la sección 4.3 (pág. 23).

Con la finalidad de determinar cómo afecta el pH la velocidad de biodegradación, se realizaron bioensayos a tres valores constantes de pH (5, 7 y 9) y un control sin ajuste del pH, con una concentración inicial de vinazas del 10%. Además, se realizó el seguimiento de la presencia de 6 grupos bacterianos con medios selectivos para amilolíticos, mesófilos aerobios, sacarolíticos, lipolíticos, proteolíticos y celulolíticos. Asimismo, se evaluó la actividad enzimática mediante el uso de las galerías api ZYM bioMérieux®.

Para estudiar el proceso de biodegradación de vinazas en un sistema de filtro biológico, se usó un biofiltro experimental elaborado con columnas de acrílico, conteniendo como material de empaque se usó una mezcla de escoria volcánica roja y gravilla blanca (Kao *et al.*, 2001; Ramírez-Carrillo, 1998).

Los BE fueron operados por lote, con una concentración de vinaza del 10% en el influente, un TRH de 4 días y un tiempo de operación total de 32 días. También se realizó el seguimiento del crecimiento de los 6 grupos bacterianos, la medición de la AE y el tiempo de taponamiento del biofiltro experimental.

En todos los casos, la determinación de las cinéticas de biodegradación de la materia orgánica, se realizó por el seguimiento de la DQO con respecto al tiempo.

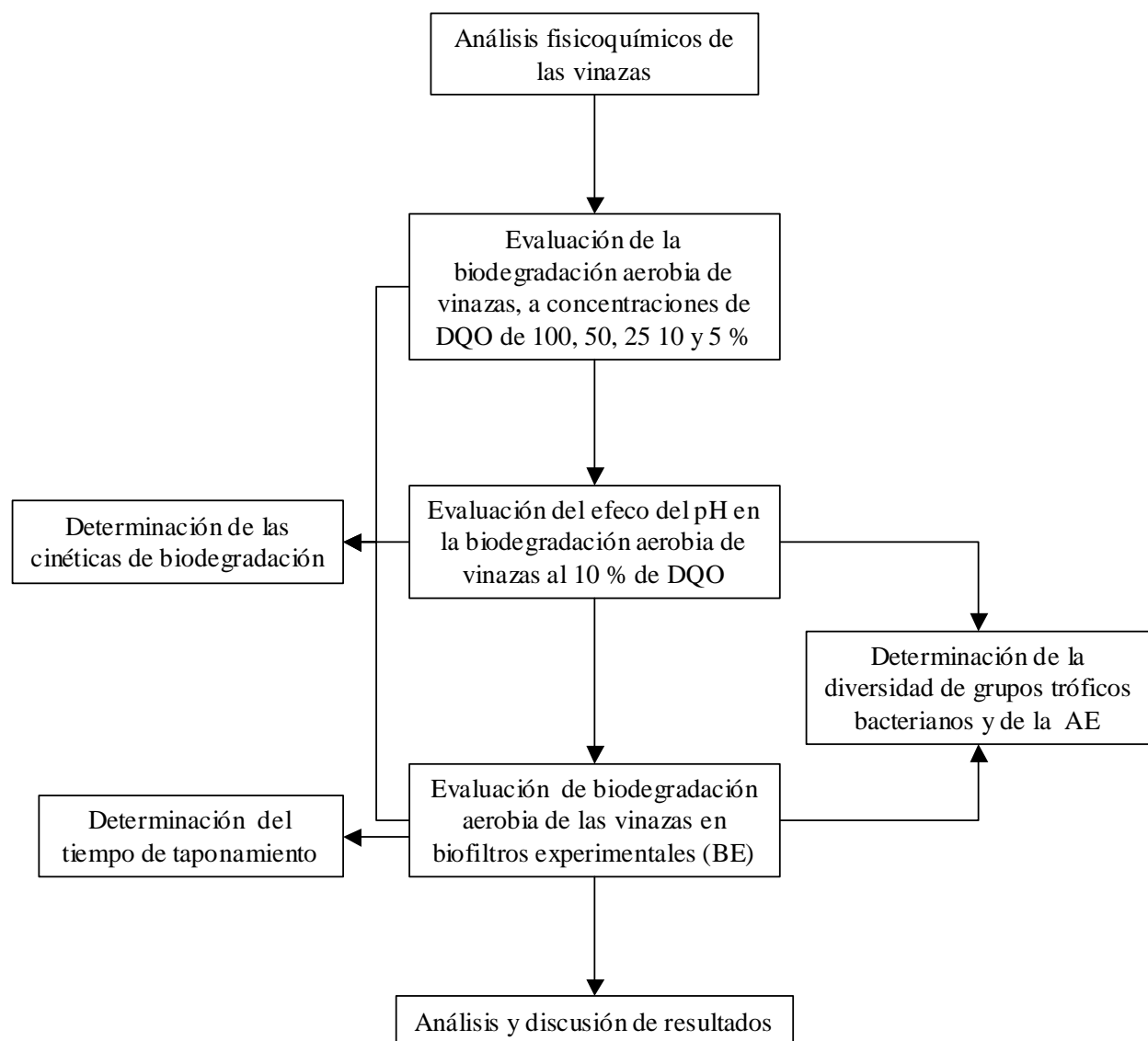


Figura 4-1. Esquema básico de la metodología general planteada para la fase experimental.

4.3. METODOLOGÍA

CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LAS VINAZAS

Como etapa previa a la evaluación de la biodegradación aerobia de las vinazas, se realizó la caracterización de las vinazas, para lo cual se procedió a determinar los parámetros más relevantes de acuerdo con lo indicado en la Tabla 4-1.

Tabla 4-1. Parámetros relevantes medidos a las vinazas.

<i>Parámetro Técnica</i>	<i>Referencia</i>
DBO	Método respirométrico (DBO ₅) APHA (1998)
DQO	Método de reflujo abierto APHA (1998)
ST	Desecación a 105°C APHA (1998)
SV	Combustión a 550°C APHA (1998)
OD	Método de electrodo de membrana. APHA (1998) y manual del equipo.
pH	Método electroquímico APHA (1998) y manual del equipo.

ST = Sólidos Totales; SV = Sólidos Volátiles.

EVALUACIÓN DE LA BIODEGRADACIÓN AEROBIA DE VINAZAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE DQO

Se realizaron pruebas de biodegradación de las vinazas, con 5 concentraciones iniciales (S_0) de DQO: 100, 50, 25, 10 y 5%, tomando como 100% la concentración inicial de DQO en las vinazas, tal y como fueron obtenidas de la destilería. Un litro de cada una de las concentraciones de vinazas se colocó en matraces Erlenmeyer de 2 L. Se realizaron tres tipos de bioensayos, uno en el que se dejaron las vinazas sin adición de lodos activados y únicamente se favorecieron las condiciones para que se desarrollara la microbiota presente en las vinazas; otro en el que a las vinazas se les adicionaron lodos activados y un control de degradación abiótica en el que las vinazas se mantuvieron en condiciones estériles, mediante la adición de HgCl a una concentración final de 1 mg L⁻¹. Con las bombas de aire se mantuvieron en aireación y, con agitadores magnéticos, en agitación constante. Durante el periodo de prueba se midió el OD “in situ” para corroborar que se mantuvieran las condiciones aerobias (>2 mg L⁻¹ de OD). Las pruebas se realizaron por duplicado para cada una de las concentraciones. Se tomaron muestras a diferentes intervalos de tiempo y se les midió el pH y la DQO.

Los lodos activados se obtuvieron de la planta de tratamiento de aguas residuales de Ciudad Universitaria (CU). Los lodos activados fueron precondicionados mediante aireación, en medio

mineral, a temperatura ambiente 23 ± 2 °C por 5 días. Las partículas gruesas se eliminaron por filtración (tamaño de poro de 0.8 mm) con agua de la llave como se describe en Percherancier *et al.* (1996) y Reuschenbach *et al.* (2003). La cantidad adicionada de lodos fue 10 mL con una concentración de 30 mg L^{-1} de ST.

EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL pH EN LA BIODEGRADACIÓN AEROBIA DE VINAZAS A UNA CONCENTRACIÓN DEL 10% DE DQO

Para este estudio, las vinazas al 10% de DQO ($S_0 = 11 \text{ g L}^{-1}$ de DQO) fueron tratadas en condiciones aerobias. La cantidad de muestra y la adición de lodos activados se manejaron como se indicó anteriormente. Los bioensayos se realizaron manteniendo las vinazas a valores de pH constantes de 5, 7 y 9, mediante la adición de NaOH 1 N y H₂SO₄ 1 N, según se requirió. Se midieron los volúmenes de las soluciones adicionadas y en aquellos bioensayos que se agregó, se ajustó al máximo volumen de solución adicionada con agua destilada, a fin de evitar el efecto de dilución de DQO. También se hizo un bioensayo testigo en el que el pH no se ajustó. El intervalo de pH evaluado se estableció tomando como referencia el pH inicial de las vinazas que es de 4.5 y el valor de pH que se alcanzó en el proceso de biodegradación, el cual fue de 9. Para evaluar el proceso de biodegradación se tomaron muestras a diferentes intervalos de tiempo, a las cuales se les determinó la DQO, la AE y presencia de 6 grupos bacterianos (amilolíticos, sacarolíticos, proteolíticos, lipolíticos, mesófilos aerobios y celulolíticos).

PRUEBAS DE BIODEGRADACIÓN AEROBIA DE LAS VINAZAS EN LOS BIOFILTROS EXPERIMENTALES

La concentración de vinazas con las que fueron alimentados los BE fue del 10% de DQO ($S_0 = 11 \text{ g L}^{-1}$ de DQO), la misma que se usó en los bioensayos para determinar el efecto del pH. Para estos bioensayos se usaron tres BE, dos de los cuales fueron alimentadas con vinazas (adicionadas con lodos activados) y el tercer biofiltro fue alimentado con agua corriente de la llave, a fin de evaluar el posible aporte de materia orgánica por parte del material de empaque. Los experimentos se realizaron por duplicado con aireación constante. Se tomó una muestra a la que se le determinó la DQO, la AE y la presencia de los 6 grupos bacterianos mencionados, durante el periodo de operación de los BE. Debido a la alta concentración de DQO presente en las vinazas, se evaluó el proceso de biodegradación en los BE hasta que se presentó el taponamiento.

CONSTRUCCIÓN DE LOS BIOFILTROS EXPERIMENTALES

Se construyeron tres BE con columnas de acrílico, con las siguientes dimensiones: 60 cm de largo (para tener 50 cm efectivos de empaque) y 4.5 mm de diámetro interno, de acuerdo con las relaciones establecidas en Önorm (1997), Ramírez-Carrillo (1998) y Álvarez-Fajardo (2003). En la Figura 4-2 se esquematiza del diseño de los BE, los cuales cuentan con un puerto para la toma de muestra a 25 cm de altura, un difusor de aire (para mantener un ambiente aerobio) y un sistema de drenado ubicados en la parte inferior.

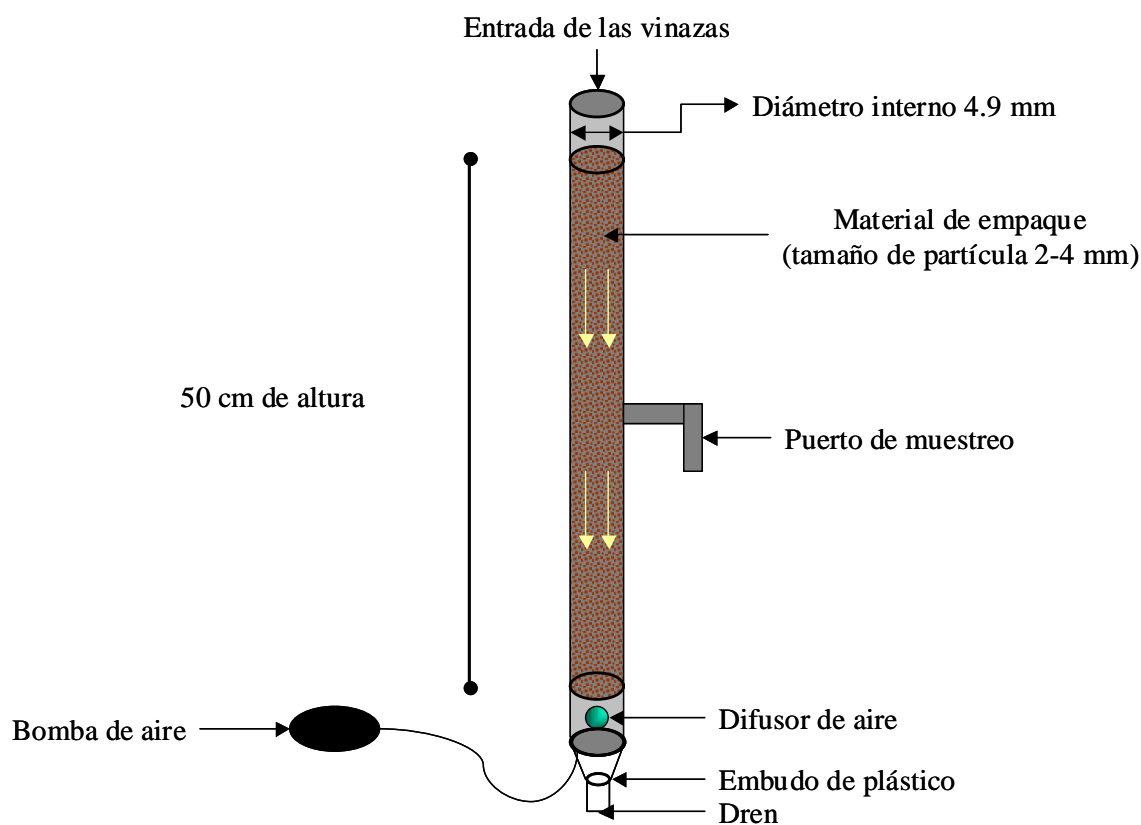


Figura 4-2. Esquema general de diseño de las columnas empacadas a usar durante la etapa experimental.

Antes de instalar los difusores de aire en los BE, se empacaron con cada uno de los materiales: escoria volcánica roja (EVR) y gravilla blanca (GB), con la finalidad de obtener los parámetros hidráulicos de dichos materiales.

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Esta prueba se realizó empleando galerías api ZYM bioMérieux®, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las galerías constan de una cámara de humidificación y una tira con 20 “pozos”, que contienen los reactivos para identificar la actividad de las enzimas que se encuentran listadas en la Tabla 4-2 y un pozo como control negativo. De acuerdo a una escala de intensidad color, es posible establecer, semicuantitativamente, el nivel de actividad enzimática que va de 0 a 5, siendo 5 la actividad más alta como se muestra en la Figura 4-3.

Para la evaluación de la actividad enzimática, se agregaron 5 mL de agua destilada en las cámaras de humidificación y 65 μ L de muestra inmediatamente después de su toma (representativa y homogénea), en cada uno de los pozos en condiciones asépticas. Posteriormente, las galerías se incubaron a 35°C durante 4 horas. Después del tiempo de incubación, la muestra de vinaza fue retirada por absorción con un algodón, para evitar una lectura errónea debido a su coloración. Enseguida, se adicionaron una gota de los reactivos zym-A y zym-B (en éste orden) en cada pozo.

Tabla 4-2. Enzimas evaluadas en AE con el sistema api ZYM bioMérieux®.

<i>Grupo</i>	<i>Enzima</i>
Fosfatasa	Fosfatasa alcalina
	Fosfatasa ácida
	Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa
Lipasas	Estearasa (C4)
	Estearasa Lipasa (C8)
	Lipasa (C 14)
Proteasas	Leucina arilamidasa
	Valina arilamidasa
	Cistina arilamidasa
	Tripsina
Carbohidrasas	α -quimiotripsina
	α -galactosidasa
	β -galactosidasa
	β -glucoronidasa
	α -glucosidasa
	β -glucosidasa
	N-acetil- β -glucosaminidasa
	α -manosidasa
	α -fucosidasa

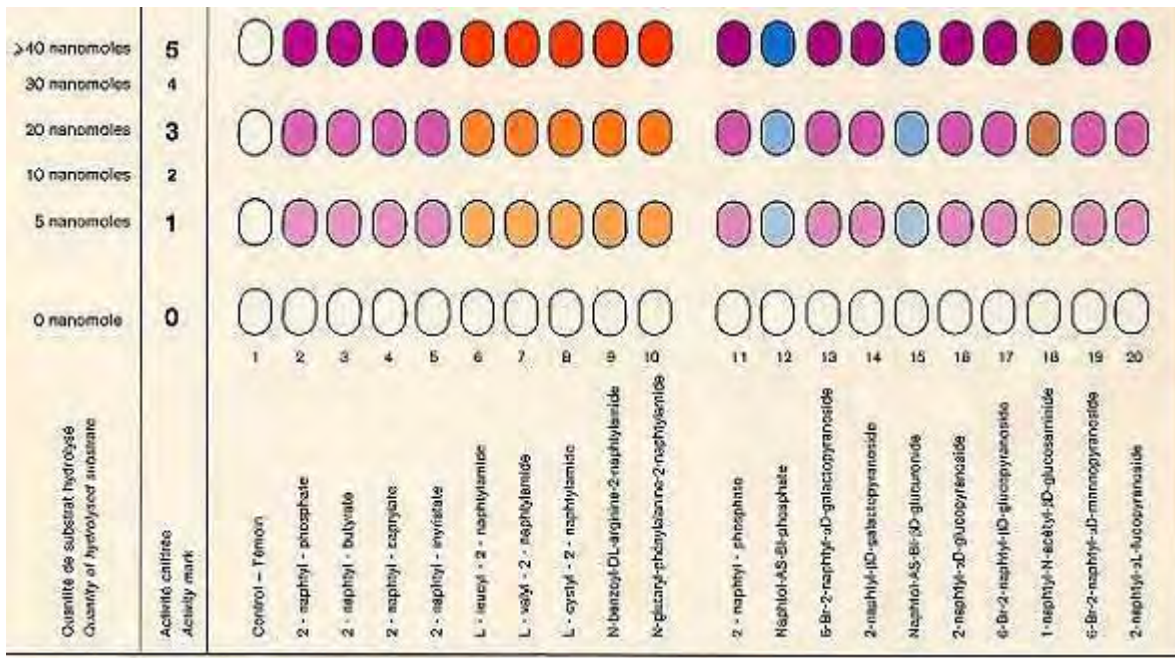


Figura 4-3. Escala de tonalidades para establecer el nivel de AE.

AISLAMIENTO Y CUENTA DE BACTERIAS

Se determinó el crecimiento de 6 diferentes grupos microbianos: amilolíticos, sacarolíticos, proteolíticos, lipolíticos, mesófilos aerobios y celulolíticos. Para ello se empleo la técnica de cuenta en placa con medios selectivos para cada uno de los grupos bacterianos. La descripción detallada del procedimiento y de la composición los medios de cultivo empleados se encuentra en el anexo A-1) III (pág. 75).

5. RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

5.1. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LAS VINAZAS

Los resultados de los parámetros fisicoquímicos evaluados a las vinazas, se encuentran en la Tabla 5-1. Destaca la alta concentración de materia orgánica, determinada como DQO y DBO₅. De la relación DBO₅/DQO = 0.93, se deduce que la mayor parte de la materia orgánica es susceptible de ser biodegradada. También se encontró una alta concentración de sólidos disueltos totales (SDT), relacionada con la alta cantidad de materia orgánica.

Tabla 5-1. Parámetros fisicoquímicos de las vinazas obtenidas de la industria azucarera-alcoholera.

<i>Parámetro</i>	<i>Valor</i>
DBO ₅ (g O ₂ L ⁻¹)	93.0 ± 7.0
DQO (g O ₂ L ⁻¹)	105.0 ± 5.0
PH	4.0 ± 0.0
ST (g L ⁻¹)	122.0 ± 2.0
SV (g L ⁻¹)	33.0 ± 1.0
SDT (g L ⁻¹)	89.0 ± 1.0

5.2. PRUEBA DE BIODEGRADACIÓN AEROBIA DE VINAZAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE DQO

El seguimiento del proceso de biodegradación, para los bioensayos sin y con la adición de lodos activados, se realizó por determinación de la DQO a diferentes tiempos. Estos resultados se presentan en la Figura 5-1 a y b. Como se esperaba, en el bioensayo con la adición de lodos activados se observa que la remoción de DQO se realiza con mayor velocidad. Los microorganismos que se encargan de la biodegradación, en los bioensayos sin la adición de lodos activados, provienen del ambiente (aire, material empleado). En estos bioensayos los microorganismos tienen un periodo de estabilización y adaptación de aproximadamente 16 días, lo cual se observa en las curvas de biodegradación como cambios de pendiente, principalmente en las curvas de 100 y 50% (Figura 5-1). Por ejemplo a una concentración del 100% la velocidad de biodegradación en los primeros 16 días fue de 498 mg de DQO L⁻¹ d⁻¹ y posteriormente de 1 200 mg L⁻¹ d⁻¹, para el bioensayo a 50% la velocidad de biodegradación antes del día 16 fue de 211 mg L⁻¹ d⁻¹ y posteriormente de 573 mg L⁻¹ d⁻¹.

En cuanto al ensayo de degradación abiótica, no se observó cambio significativo en la concentración de DQO inicial y final (Tabla 5-2), lo que indica que no hubo degradación abiótica. No obstante, se ha reportado que procesos como la oxidación avanzada (O_3 , H_2O_2) así como el uso de ultrasonido y luz UV, pueden favorecer la degradación abiótica e incrementar la velocidad de biodegradación (Ledakowicz *et al.*, 2001; Sangave y Pandit, 2006).

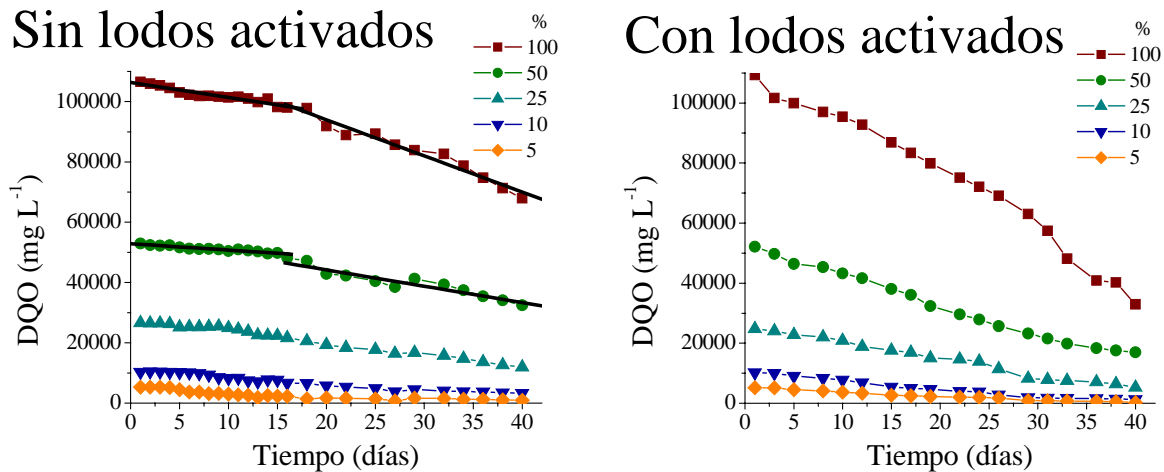


Figura 5-1. Curvas de biodegradación aerobia de la materia orgánica a diferentes concentraciones iniciales de DQO.

Tabla 5-2. Resultados de la DQO del bioensayo de biodegradación abiótica, al inicio del bioensayo y al final.

Concentración de vinazas (%)	Concentración inicial de DQO ($g L^{-1}$)	Concentración de DQO ($g L^{-1}$) a los 40 días
100	105.3 ± 3.2	104.3 ± 2.8
50	52.3 ± 2.1	51.7 ± 2.3
25	26.1 ± 1.5	25.9 ± 1.5
10	10.4 ± 0.6	10.3 ± 0.7
5	5.3 ± 0.3	5.2 ± 0.2

En la Figura 5-2 se muestra la gráfica del porcentaje de remoción en función del tiempo. Se observa que el porcentaje de remoción es mayor cuando la concentración inicial de vinazas es menor, esta observación es consistente con los estudios que se han reportado. Por ejemplo, para melazas ($41.0 g L^{-1}$ de DQO), el porcentaje de remoción fue del 50%, mientras que para concentraciones más bajas ($5.0 g L^{-1}$ de DQO), la remoción alcanzó un 95% (Jiménez *et al.*,

2003; Jiménez *et al.*, 2005; Torrijos y Moletta, 1997). De forma similar, para vinazas a altas concentraciones (83.0 g L^{-1} de DQO), la eficiencia de biodegradación fue del 29%, comparado con una concentración más baja (6.0 g L^{-1} de DQO) en donde se tuvo un 96% (Billore *et al.*, 2001; García *et al.*, 1997; Ghosh *et al.*, 2002; Malandra *et al.*, 2003; Pandiyan *et al.*, 1999; Pérez *et al.*, 1999; Pérez *et al.*, 2001; Petruccioli *et al.*, 2000; Petruccioli *et al.*, 2002; Sangave y Pandit, 2004).

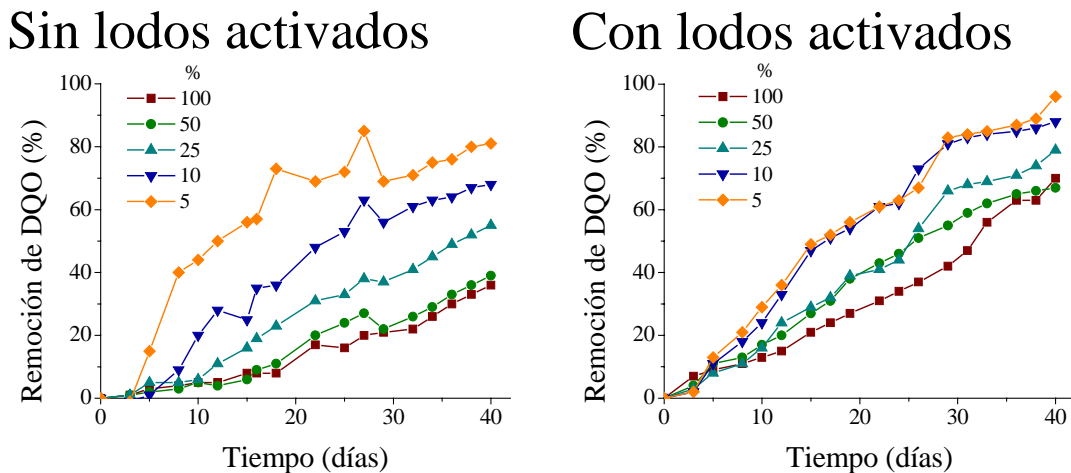


Figura 5-2. Porcentaje de remoción de DQO a diferentes concentraciones, para los bioensayos sin y con adición de lodos activados.

Sin embargo, para evaluar el efecto de la concentración de la DQO sobre la velocidad de biodegradación, se usó el modelo de Michaelis-Menten. Para ello, el proceso de biodegradación se analizó como una reacción enzimática (Figura 5-3 a y b), en donde la biomasa (B) estaría actuando como un complejo enzimático cuyo sustrato (S) sería la materia orgánica y el producto (P) serían los diferentes metabolitos como CO_2 , H_2O , etc. En estos bioensayos se realizó el seguimiento de la DQO como sustrato, tomando los datos de las gráficas de la Figura 5-1 y colocándolos en serie, se obtienen las gráficas de la Figura 5-4, esto para cada uno de los bioensayos sin y con adición de lodos activados. Esto corresponde a la relación del sustrato (DQO) en función del tiempo (como se representa en la Figura 5-3). Los datos se ajustaron a una cinética de primer orden (Ecuación 5-1) y los resultados de los parámetros cinéticos se encuentran en la Tabla 5-3. Las constantes de biodegradación (porcentaje de reactivo transformado en producto por unidad de tiempo) correspondientes son 0.015 d^{-1} y 0.026 d^{-1} para

el bioensayo sin adición de lodos activados y con adición de lodos activados, respectivamente. Lo anterior es de esperarse ya que al adicionar lodos activados se tiene más biomasa (enzimas) capaz de degradar la materia orgánica y esta adición incrementa en 1.7 veces la velocidad del proceso de biodegradación. El ajuste a la cinética de primer orden permite calcular el tiempo requerido para obtener un porcentaje de remoción del 99.0% de DQO (0.15 g L^{-1}). De lo cual se obtuvo que para las vinazas sin adición de lodos activados son necesarios 424 días, mientras que para las vinazas con adición de lodos activados, solo son necesarios 167 días.

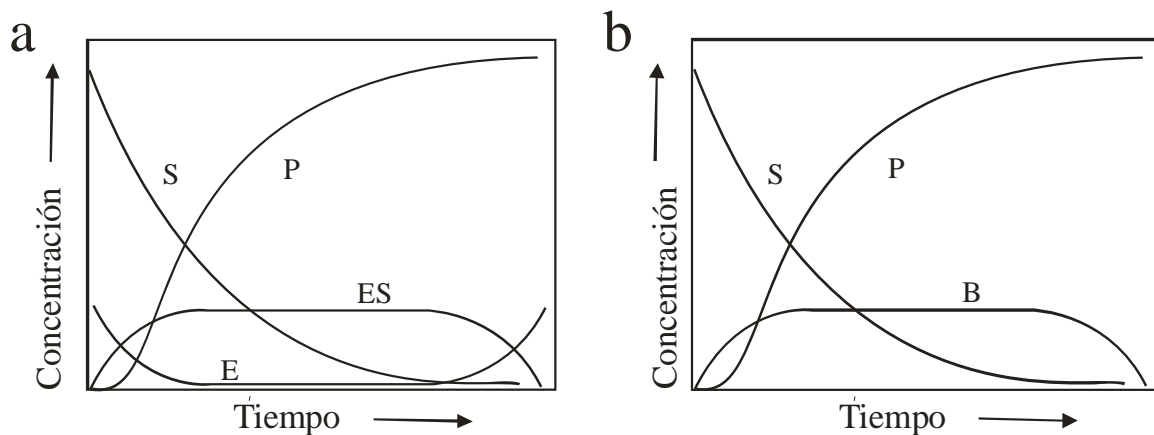


Figura 5-3. Representación gráfica del progreso de una reacción, concentración de sustrato (S); producto (P), enzima-sustrato (ES) y de enzima libre (E). a) modelo aplicado a reacciones enzimáticas (Segel, 1975); b) modelo donde la biomasa (B) es el complejo enzimático.

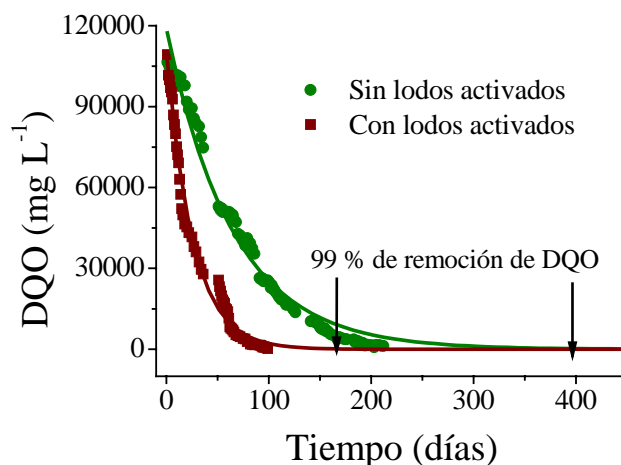


Figura 5-4. Curvas del progreso del proceso de biodegradación (DQO en función del tiempo) de las vinazas sin y con la adición de lodos activados.

$$S = S_0 e^{-kt}$$

Ecuación 5-1.

Donde: S = concentración de vinazas al tiempo (t), S₀ = concentración de vinazas al tiempo inicial, y k = constante de biodegradación de las vinazas.

Tabla 5-3. Parámetros de la cinética de primer orden, del proceso de biodegradación de las vinazas sin y con la adición de lodos activados.

<i>Parámetro</i>	<i>Sin lodos activados</i>	<i>Con lodos activados</i>
k (d ⁻¹)	0.015	0.026
S ₀ (g DQO L ⁻¹)	119 ± 1	121 ± 2
R ²	0.98	0.99

Los valores de las pendientes (-ds/dt) de las curvas de biodegradación a cada una de las concentraciones de DQO, corresponde a la velocidad inicial (V₀) para esa concentración, en el proceso de biodegradación sin y con lodos activados. La V₀ de cada uno de los bioensayos se calculó por ajuste de los datos de la Figura 5-1 a una línea recta. Los valores de V₀ se muestran en la Tabla 5-4. Los valores de R², de la regresión lineal, se encuentran en un intervalo de 0.97 a 0.98, lo que demuestra que las curvas son lineales, factor importante para la aplicación del modelo de Michaelis-Menten (Atkins y Nimmo, 1980; Lehninger 1995; Segel, 1975; Wilkinson, 1961).

Tabla 5-4. Velocidad inicial de la biodegradación aerobia de las vinazas a diferentes concentraciones iniciales, sin y con la adición de lodos activados.

<i>Concentración</i>	<i>Vinazas sin lodos activados</i>		<i>Vinazas con lodos activados</i>	
	Concentración inicial S ₀ (mg DQO L ⁻¹)	Velocidad inicial V ₀ (mg DQO L ⁻¹ d ⁻¹)	Concentración inicial S ₀ (mg DQO L ⁻¹)	Velocidad inicial V ₀ (mg DQO L ⁻¹ d ⁻¹)
100.0	106 550 ± 375	850 ± 39	109 296 ± 651	2 070 ± 78
50.0	52 940 ± 127	515 ± 29	52 110 ± 930	1 054 ± 29
25.0	26 650 ± 332	393 ± 11	24 786 ± 517	588 ± 18
10.0	10 310 ± 141	223 ± 10	10 215 ± 807	275 ± 14
5.0	5 260 ± 121	118 ± 14	5 202 ± 324	143 ± 6

Los datos de S₀ se graficaron en función de V₀ (Figura 5-5) y se realizó el ajuste de la curva de Michaelis-Menten (Ecuación 5-2). En la Tabla 5-5 se encuentran los parámetros obtenidos del ajuste al modelo de Michaelis-Menten para los bioensayos de vinazas sin y con adición de lodos activados. Los valores de V_{MAX} y Km fueron de 1.3 g DQO L⁻¹ d⁻¹ y 70.0 g DQO L⁻¹ para el

bioensayo sin lodos activados y de 10.0 g DQO L⁻¹ d⁻¹ y 423.0 g DQO L⁻¹ para el bioensayo con lodos activados. Al comparar los valores de V_{MAX}, en el bioensayo con adición de lodos activados es 7.7 veces mayor que la obtenida en el bioensayo sin adición de lodos activados. Sin embargo, el valor de Km para el bioensayo con adición de lodos activados fue 6 veces mayor que la Km del bioensayo sin adición de lodos activados. Analizando únicamente los valores de Km, se puede caer en el error de pensar que los microorganismos presentes en el bioensayo sin adición de lodos activados, pueden realizar el proceso de biodegradación con mayor velocidad. Lo anterior debido a que, la Km es una medida inversa de la afinidad de las bacterias por el sustrato, esto es cuando menor será el valor de Km la velocidad de reacción se realiza con mayor velocidad. Por lo cual, un criterio de especificidad es la relación de V_{MAX} Km⁻¹, esta relación permite establecer la eficiencia metabólica de la biomasa a concentraciones de S₀ por debajo de los niveles de saturación. Esta relación de constantes puede ser calculada para evaluar el efecto de diferentes inóculos a una misma concentración sobre un sustrato o un mismo inóculo sobre diferentes sustratos. Los resultados de V_{MAX} Km⁻¹ obtenidos fueron de 1.95 × 10⁻² d⁻¹ y 2.37 × 10⁻² d⁻¹, para los bioensayos sin y con adición de lodos activados, respectivamente, lo cual sólo verifica que la eficiencia del proceso de biodegradación aumenta por la adición de biomasa.

$$V_0 = \frac{V_{MAX} \times S_0}{Km + S_0} \quad \text{Ecuación 5-2.}$$

Donde: V₀ = velocidad de biodegradación inicial (g L⁻¹ d⁻¹), V_{MAX} = velocidad de biodegradación máxima (g L⁻¹ d⁻¹), S₀ = concentración inicial de biodegradación (g L⁻¹), y Km = constante de Michaelis-Menten (g L⁻¹).

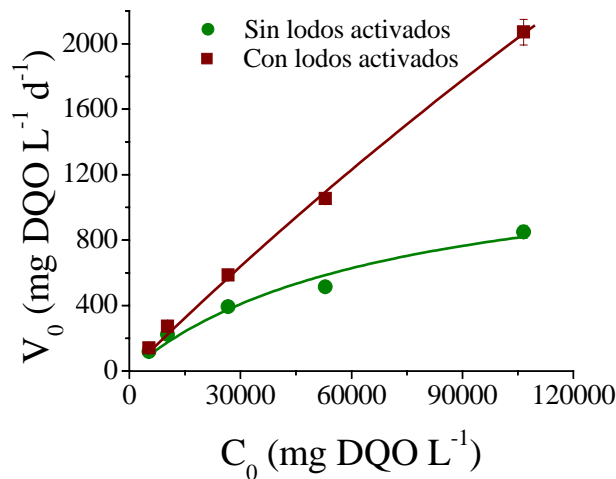


Figura 5-5. Modelo cinético de Michaelis-Menten para los procesos de biodegradación de vinazas sin y con la adición de lodos activados.

Tabla 5-5. Parámetros cinéticos del ajuste a la cinética de Michaelis-Menten para los bioensayos sin y con adición de lodos activados.

<i>Parámetro</i>	<i>Sin lodos activados</i>	<i>Con lodos activados</i>
V_{MAX} (g DQO L ⁻¹ d ⁻¹)	1.3 ± 0.3	10.0 ± 2.8
K_m (g DQO L ⁻¹)	70.0 ± 26.0	423.0 ± 144.0
$V_{MAX} K_m^{-1}$ (d ⁻¹)	2.0×10^{-2}	2.4×10^{-2}
R^2	0.9721	0.9979

Cuando una reacción sigue una cinética de Michaelis-Menten y la concentración de sustrato (S_0) es muy pequeña, respecto de K_m , S_0 puede no ser considerado en el denominador de la Ecuación 5-2, por lo tanto, la velocidad crece proporcionalmente con la concentración de sustrato y la reacción es de orden 1 respecto al sustrato. Para ello debe cumplirse que $S_0 \ll K_m$, de otro modo el proceso será mejor descrito por el modelo de Michaelis-Menten. De acuerdo con lo anterior y a los parámetros cinéticos obtenidos del ajuste a la ecuación de Michaelis-Menten (Tabla 5-5), el proceso de biodegradación sin adición de lodos activados es descrito mejor por la ecuación de Michaelis-Menten, en tanto que el bioensayo con adición de lodos activados puede ser descrito por una cinética de primer orden.

Simkins y Alexander (1984) explican, de otra forma, las diversas posibilidades de cinéticas de biodegradación al graficar el logaritmo de la concentración inicial de microorganismos en función de la concentración inicial de sustrato (Figura 5-6). Por ejemplo, los tres sectores por arriba de la línea diagonal indican que la concentración de sustrato es insuficiente para favorecer el crecimiento de la biomasa y los sectores por debajo de la diagonal sugieren que hay suficientes fuentes de carbono disponibles para mantener el crecimiento de la biomasa. La disminución de la concentración de un sustrato específico en función del crecimiento microbiano es explicada por diferentes condiciones como sigue (Blok, 1994a).

- (a) a baja concentración de sustrato y a alta concentración inicial de microorganismos, se sigue una reacción de primer orden ($S = S_0 e(-kt)$), donde $S_0 \ll K_m$, en estas condiciones el sustrato es insuficiente para mantener el crecimiento microbiano.
- (b) Cuando la concentración inicial tanto de microorganismos como de sustrato son bajas, hay suficiente sustrato disponible para el crecimiento celular ($S_0 \ll K_m$), lo que permite una cinética de tipo logístico
$$\left(S = \frac{S_0 + X_0}{1 + (X_0/S_0)e[k(S_0 + X_0)t]} \right).$$

- (c) A una concentración intermedia de sustrato y a una alta concentración inicial de biomasa, las células no se multiplican (Monod sin crecimiento; $K_s \ln(S/S_0) + S - S_0 = -kt$), por lo tanto es posible que $S_0 \sim K_m$; de manera similar, se aplica que en condiciones intermedias de sustrato con una concentración inicial baja de biomasa, las células pueden multiplicarse (Monod con crecimiento; $K_s \ln(S/S_0) = (S_0 + X_0 + K_s) \ln(X/X_0) - (S_0 + X_0) \mu_{\max} t$).
- (d) La cinética de orden cero ($S = S_0 - kt$) se sigue cuando el sustrato y la concentración inicial de células son altos ($S_0 \gg \gg K_m$), porque no hay crecimiento microbiano, sin embargo, a altas concentraciones de sustrato pero a bajas concentraciones de células, también se tienen bajos rendimientos de biomasa y la cinética es de tipo logarítmica ($S = S_0 + X_0 [1 - e(\mu_{\max} t)]$).

Donde: K_s = constante de disociación del complejo enzima-sustrato; μ_{\max} = tasa máxima de crecimiento.

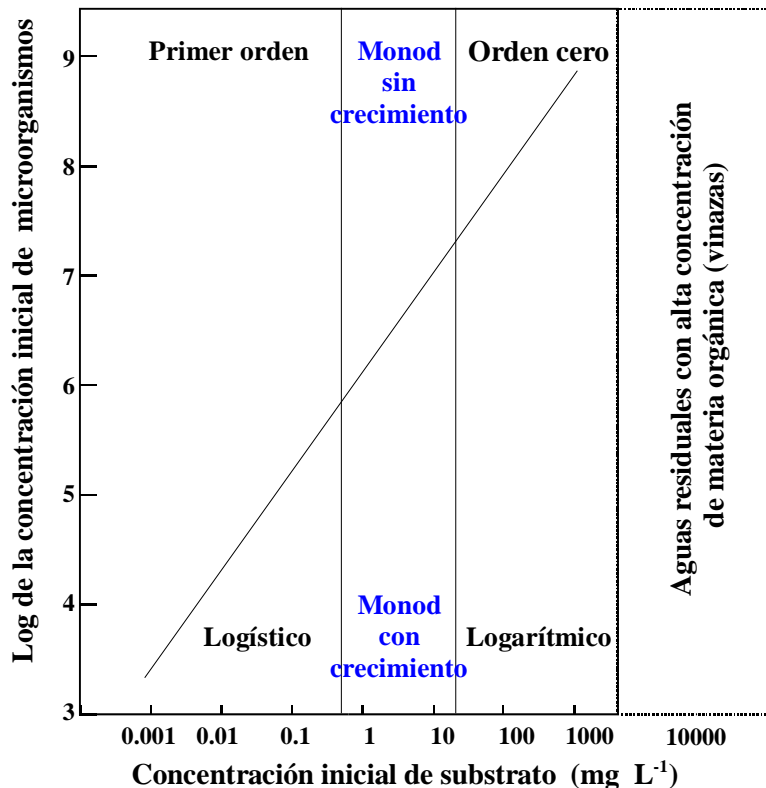


Figura 5-6. Biodegradación la concentración de sustrato en el agua residual (mg L⁻¹) como función del logaritmo de la concentración inicial de microorganismos (número de células mL⁻¹). Simkins y Alexander (1984).

Estos términos y condiciones de biodegradación están establecidos para los procesos cuya concentración de sustrato es menor a 1 g L^{-1} . Sin embargo, pocos estudios relacionados con procesos de biodegradación con aguas residuales a concentraciones mayores, han sido reportados, como es el caso de las vinazas. En el presente trabajo, se usaron vinazas a diferentes concentraciones iniciales de sustrato (100.0 , 50.0 , 25.0 , 10.0 , y 5.0 g L^{-1}) y se analizó el proceso de biodegradación bajo estas condiciones mediante el modelo de Michaelis-Menten. Este modelo permite explicar que el proceso de biodegradación sigue una cinética de primer orden ($S_0 < K_m$) y que el proceso de biodegradación no se inhibe por el incremento de la concentración de DQO en las vinazas, al menos hasta una concentración de $100 \pm 10 \text{ g L}^{-1}$ de DQO. Esto es, si en las vinazas estuviera presente un compuesto tóxico para los microorganismos encargados de la biodegradación o éstos presentaran inhibición por la concentración de DQO en las vinazas, la velocidad de biodegradación aumentaría al diluir las vinazas.

Por otro lado, conjuntamente con la determinación de DQO, durante el proceso de biodegradación, se midió el valor del pH de las vinazas. Los resultados de las mediciones del pH se muestran en la Figura 5-7, en donde se observa que durante el proceso de biodegradación el valor del pH incrementó, debido principalmente a la formación de carbonatos, particularmente de calcio y potasio, lo cual concuerda con la literatura (Ambriz-Rivas *et al.*, 1998; Mahimairaja y Bolan, 2004). Cabe señalar que conforme la concentración de vinazas disminuye, su alcalinización es más rápida, pasando de un pH de 4.5 a uno de 9, con y sin la adición de lodos activados.

Al graficar el porcentaje de biodegradación en función del pH se establece una linealidad sólo hasta alcanzar cierto porcentaje de remoción (Tabla 5-6). Por ejemplo, en el caso de concentración al 5% de vinaza se encontró una relación lineal hasta alcanzar una remoción del 60%, de la misma forma para las concentraciones de 10, 25, 50 y 100%, la linealidad se tuvo hasta una remoción del 70%. Lo anterior se debe a que posterior a estos porcentajes de remoción de materia orgánica, los valores de pH se mantienen constantes. Estos resultados indican que en sistemas de depuración de aguas con poca variabilidad de parámetros y bien caracterizados, la medición del pH puede ser una forma indirecta de monitorear dicho proceso, en los intervalos establecidos.

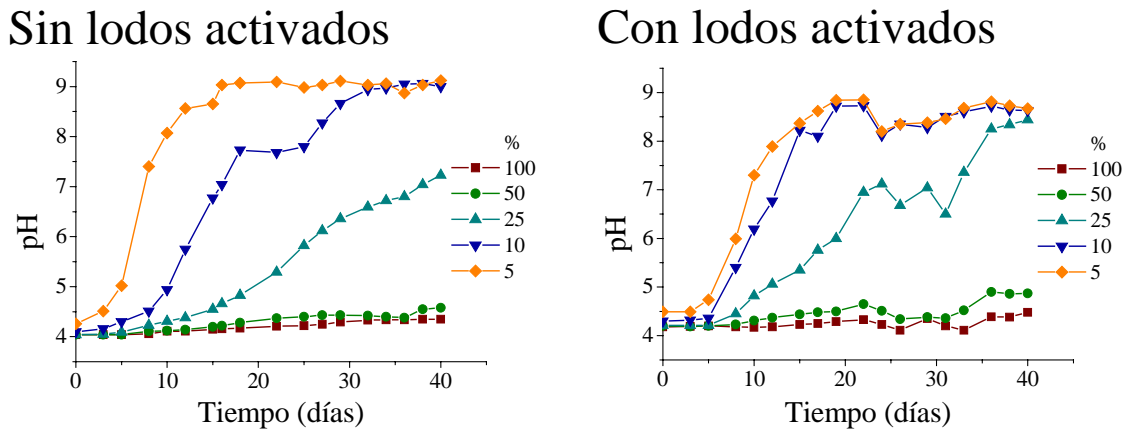


Figura 5-7. Perfil del pH durante el proceso de biodegradación a las diferentes concentraciones de DCO en los bioensayos sin y con la adición de lodos activados.

Tabla 5-6. Valores del coeficiente de correlación (R2) de la regresión lineal de la relación del pH con el porcentaje de biodegradación.

<i>Concentración (%) Sin lodos activados</i>	<i>Con lodos activados</i>
100	0.9644
50	0.9771
25	0.9830
10	0.9764
5	0.9914

De acuerdo con lo anterior es importante tener presente, que si bien las bacterias son capaces de cambiar las condiciones del medio en el que se desarrollan como el pH, el valor de pH del medio afecta también el metabolismo bacteriano. Por ello, para conocer cómo afecta el pH el proceso de biodegradación aerobia de las vinazas, se realizaron bioensayos manteniendo los valores de pH constante en 5, 7 y 9. Estos valores se seleccionaron para tener condiciones ácidas (como salen las vinazas de las destilerías), condiciones neutras y básicas (dado que durante el proceso de biodegradación se alcanzan valores de pH básico. La concentración de vinazas usada fue del 10% para tener las condiciones de $S_0 \ll K_m$, cinética de primer orden. Los resultados experimentales se muestran a continuación.

5.3. PRUEBAS DE BIODEGRADACIÓN AEROBIA DE VINAZAS A TRES VALORES CONSTANTES DE pH (5, 7 y 9)

En este estudio, para todos los bioensayos, el cambio de la DQO con el tiempo siguió una cinética de primer orden. Los resultados del ajuste a la cinética, así como el porcentaje de remoción de DQO se muestran en la Figura 5-8, donde se aprecia que, en los bioensayos a valores de pH constante, gran parte de la materia orgánica fue removida en los primeros 12 días (80% a pH 5 y 9 y 76% a pH 7). Por otro lado, en el bioensayo testigo sólo se alcanzó el 33% de remoción en el mismo tiempo y el 80% de remoción se logró a los 37 días. Los resultados obtenidos de las constantes de velocidad se trataron con un análisis de varianza (ANOVA). No se encontró diferencia significativa ($p = 0.05$) en los bioensayos en los que el pH se mantuvo constante, mientras que en el testigo (sin ajuste de pH), el valor de k fue 4.6 veces menor (Tabla 5-7).

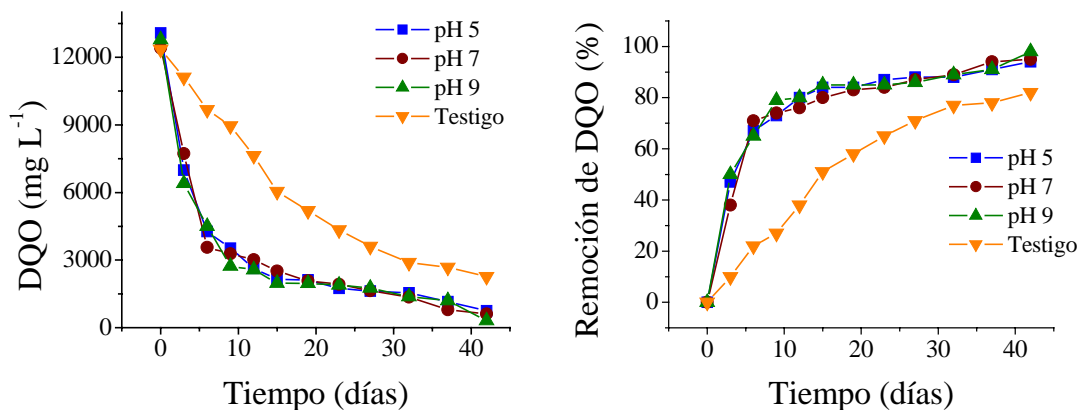


Figura 5-8. Cinéticas de biodegradación y porcentaje de remoción de DQO, en los bioensayos a valores de pH constante (5, 7 y 9) y el testigo (sin ajuste de pH).

Tabla 5-7. Parámetros del ajuste a una cinética de primer orden aplicado a las curvas de biodegradación con pH constante y testigo.

Parámetro	pH 5	pH 7	pH 9	Testigo
k (d^{-1})	0.22 ± 0.02	0.20 ± 0.03	0.23 ± 0.03	0.05 ± 0.01
S_o (g DQO L^{-1})	12.8 ± 0.6	12.4 ± 0.8	12.6 ± 0.7	12.7 ± 1.1
R^2	0.99	0.97	0.98	0.99

El hecho de que se tenga una mayor velocidad de biodegradación cuando se mantiene el pH constante, puede explicarse en parte, mediante la teoría del estado quimio-estático, en donde las variaciones del medio de crecimiento bacteriano son mínimas (Dijkhuizen y Hartle, 1983; Grady *et al.*, 1995). Esto quiere decir que al disminuir las etapas de adaptación, el crecimiento bacteriano será mucho más rápido y, por lo tanto, el proceso de biodegradación. De esta forma, en los bioensayos a valores de pH constante en 5, 7 y 9, las bacterias se desarrollan con mayor velocidad que aquellas presentes en el bioensayo testigo (sin ajuste en el valor del pH).

Por lo anterior, en este estudio también se midió el crecimiento, por cuenta en placa, de 6 grupos bacterianos en medios selectivos (amilolíticos, sacarolíticos, proteolíticos, lipolíticos, mesófilos aerobios y celulolíticos). El hecho de que las bacterias se dividieron en grupos, no significa que una bacteria crezca en un solo medio, sino que puede haber bacterias que se desarrollen en dos o más medios. Por ello, en este estudio se tomó en cuenta el crecimiento de una muestra representativa de las bacterias y no de la biomasa total presente en el proceso de biodegradación.

Las curvas de crecimiento de los grupos bacterianos, durante el proceso depurativo de las vinazas, para cada bioensayo se muestran en la Figura 5-9. En donde se observa que el mayor crecimiento se obtuvo en los primeros 12 días, para los bioensayos a valores de pH constante. Sin embargo, en el bioensayo testigo el máximo crecimiento bacteriano se alcanzó a los 23 días, lo que confirma que al mantener el pH constante las bacterias crecen con mayor velocidad. Esto es, cuando se tiene el mayor crecimiento bacteriano, es cuando se logra la mayor velocidad de biodegradación. Lo anterior se debe a que en esos días se tiene suficiente fuente de alimento (S_0/X_0 alta) para permitir una alta tasa de crecimiento bacteriano (Chudoba *et al.*, 1992; Grady *et al.*, 1995). Al iniciarse el proceso de biodegradación se presentan fenómenos de adaptación de las bacterias, estas consumen la materia orgánica e incrementan su concentración hasta que la mayor parte de la materia orgánica ha sido consumida. En esta etapa, las poblaciones bacterianas decrecen debido a que ya no hay suficiente alimento para mantener el crecimiento y al final del proceso sólo permanecen las aquellas bacterias capaces de degradar la materia orgánica remanente.

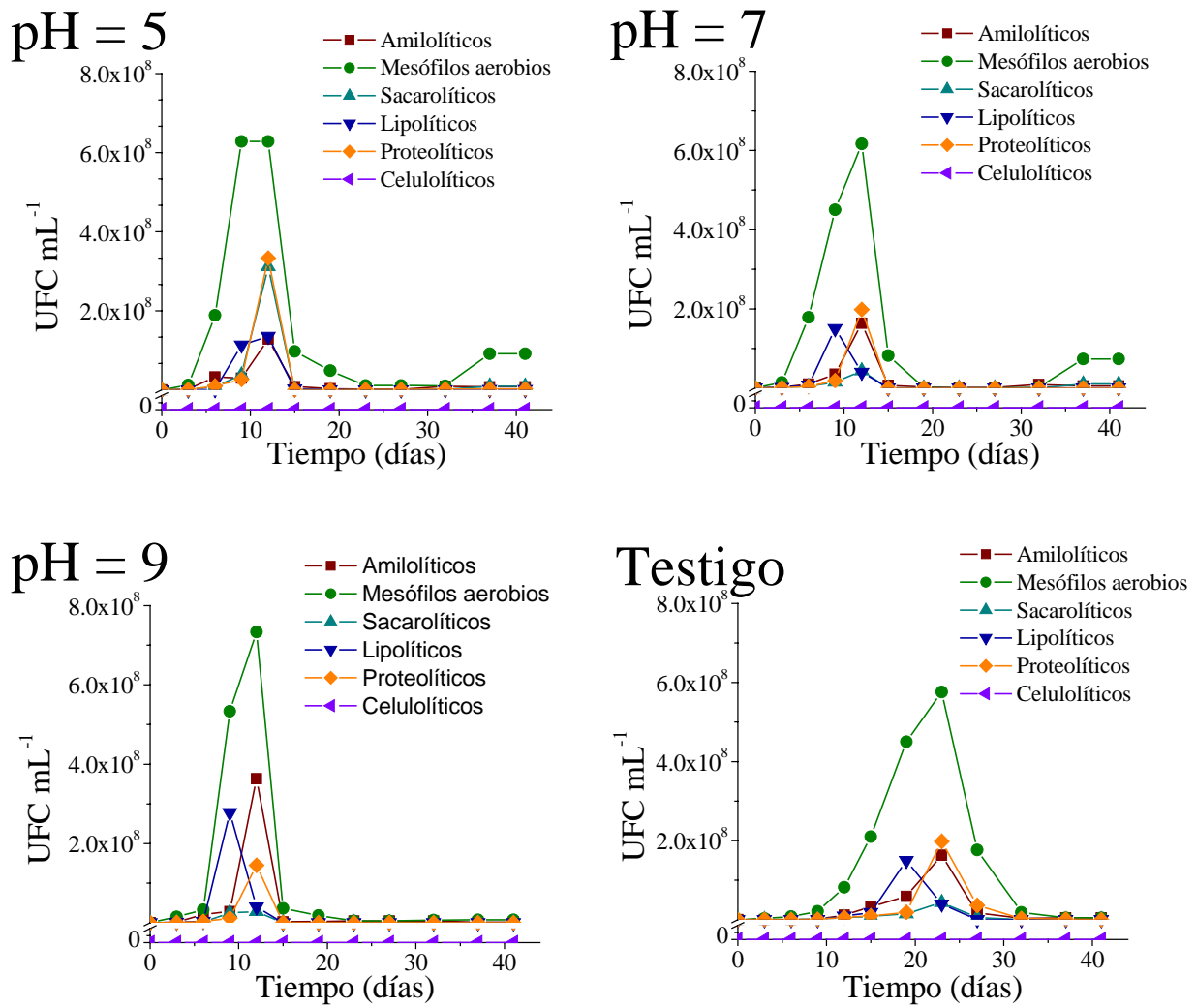


Figura 5-9. Curvas de crecimiento de los 6 grupos bacterianos, durante la biodegradación aerobia de vinazas, en los bioensayos a valores de pH constante (5, 7 y 9) y testigo.

Los resultados, en cuanto al crecimiento de los grupos bacterianos, se encuentran en la Figura 5-10, donde se observa que el grupo con mayor abundancia fue el de los amilolíticos, en los bioensayos a valores constantes de pH 7 y 9 y en el bioensayo testigo. Para el bioensayo a pH constante de 5, la mayor abundancia de bacterias fue el de las sacarolíticas, siendo además este grupo el de menor abundancia en los demás bioensayos. Por consiguiente, el desarrollo de bacterias sacarolíticas se favorece al mantener el pH en un valor constante de 5, en tanto que las bacterias lipolíticas crecen más a pH 9, que en los demás bioensayos. El siguiente grupo con mayor abundancia fue el de las proteolíticas, sin embargo, a valor constante de pH 9, se encuentra

con menor abundancia que las bacterias lipolíticas. En cuanto al grupo de bacterias celulolíticas, bajo las condiciones experimentales, no se encontró evidencia de su presencia.

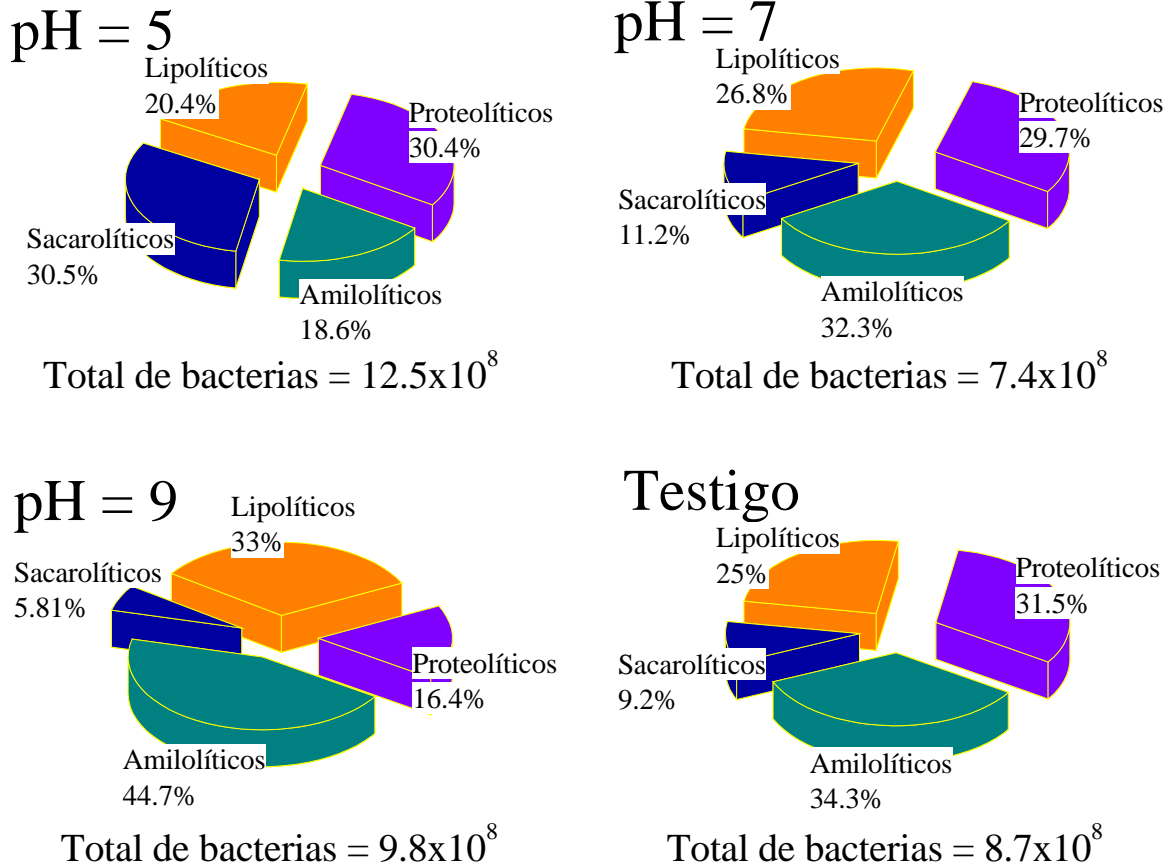
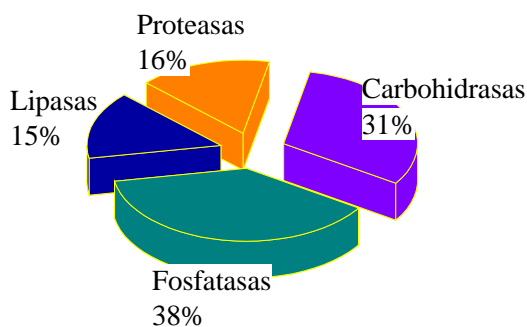


Figura 5-10. Porcentaje de crecimiento de los grupos bacterianos, evaluados durante la biodegradación aerobia de vinazas, en los bioensayos a valores de pH constante (5, 7 y 9) y testigo.

Por otro lado, como medida de la actividad metabólica bacteriana, se realizó la medición de la actividad enzimática, con el sistema de galerías api ZYM. Las enzimas se agruparon en: fosfatasas, lipasas, proteasas y carbohidrasas. En cuanto a los resultados de la medición de AE, la síntesis de los resultados experimentales relativos a la distribución y abundancia se encuentran de la Tabla 8-3 a la Tabla 8-6 del anexo A-2) II (pág. 83). Los valores de abundancia de dichos grupos, medida durante la depuración de vinazas en cada uno de los bioensayos, se encuentran en la Figura 5-11. En donde se observa que el grupo de enzimas con mayor abundancia fue el de fosfatasas (con un nivel de actividad por arriba del 50%, >2.5 unidades), en todos los bioensayos.

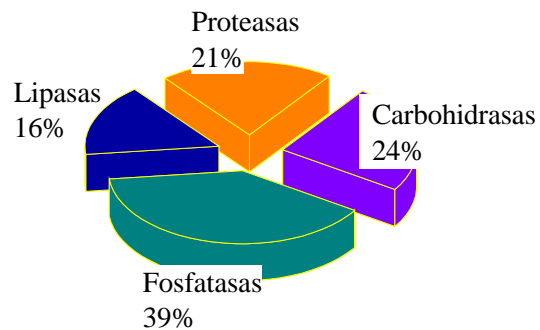
La predominancia del grupo de estas enzimas puede ser explicado, parcialmente, en términos de obtención de fosfato inorgánico a partir de fosfato orgánico, para la obtención de energía. Siguiendo con menor abundancia las carbohidrasas, de las cuales, no se detectó actividad de la β -glucuronidasa (que interviene en la degradación de glicosaminoglicanos y de estructuras del glicano), en todos los bioensayos. Esto indica que los glicanos no están presentes en las vinazas o que hay fuentes de carbono que son asimiladas antes de realizar la degradación de estos compuestos. Posteriormente, en menor abundancia se encuentran las proteasas y al final las lipasas, para todos los bioensayos.

pH = 5



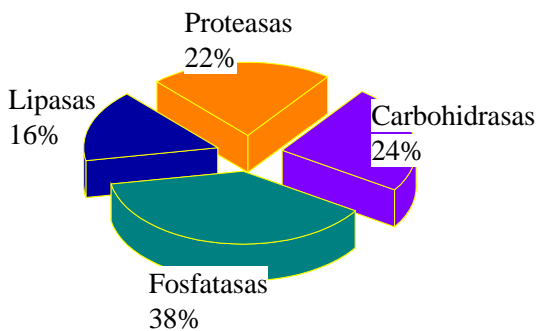
Nivel de actividad total = 403

pH = 7



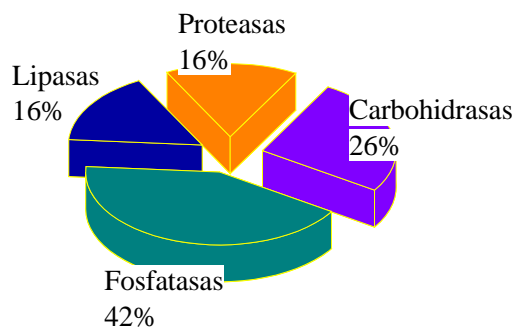
Nivel de actividad total = 392

pH = 9



Nivel de actividad total = 363

Testigo



Nivel de actividad total = 296

Figura 5-11. Gráficas del porcentaje de AE por grupo de enzimas, evaluados durante la biodegradación aerobia de vinazas, en los bioensayos a valores de pH constante (5, 7 y 9) y testigo.

En cuanto al total de la abundancia de bacterianas se encontró, para cada uno de los bioensayos, lo siguiente: a pH = 5, 12.5×10^8 UFC mL⁻¹; a pH = 7, 7.4×10^8 UFC mL⁻¹; a pH = 9, 9.8×10^8 UFC mL⁻¹ y en el bioensayo testigo 8.7×10^8 UFC mL⁻¹. Con el siguiente orden, de acuerdo con la abundancia, por bioensayo: pH 5 > pH 9 > Testigo > pH 7. Sin embargo, en comparación con el total de los niveles de la AE, se encontró para cada bioensayo lo siguiente, a pH = 5, 403 unidades; para pH = 7, 392 unidades; para pH = 9, 363 unidades y para el bioensayo testigo 296 unidades. Con el siguiente orden: pH 5 > pH 7 > pH 9 > Testigo. En cuanto a los porcentajes de remoción los resultados fueron: para pH = 5, 94.3; para pH = 7, 95.0; para pH = 9, 97.6 y para el bioensayo testigo 81.6, quedando en el siguiente orden: pH 9 > pH 7 > pH 5 > Testigo. De acuerdo con lo anterior y bajo las condiciones experimentales establecidas, los valores obtenidos de abundancia total de AE, siguen un mismo orden que los resultados obtenidos de remoción de materia orgánica en cada bioensayo, en términos generales.

Analizando los resultados por etapas del proceso de biodegradación aerobia de vinazas al inicio, al día donde se tiene la mayor remoción de DQO (día 12 para los bioensayos a pH constante y día 23 para el bioensayo testigo) y al final, tanto para el crecimiento bacteriano como para la actividad enzimática (Tabla 5-8) se encuentra lo siguiente. En cuanto al crecimiento bacteriano, puede observarse que al inicio de los bioensayos a pH ácido (pH = 5 y testigo), las bacterias amilolíticas y las sacarolíticas son las que presentan mayor abundancia, mientras que para los bioensayos a pH neutro o básico (pH = 7 y 9), las bacterias con mayor abundancia son las amilolíticas y las lipolíticas. Al día 12, para los bioensayos a pH constante y al día 23 para el bioensayo testigo, las bacterias sacarolíticas y proteolíticas son las de mayor abundancia a valores de pH ácido (pH = 5), en tanto que para los bioensayos a pH 7, 9 y testigo (para el día 23 el testigo alcanzó un valor de pH = 9), las bacterias amilolíticas y las proteolíticas son las de mayor abundancia. Al final del bioensayo las bacterias con mayor abundancia, a valores de pH neutros o ácidos (pH = 5 y 7), son las amilolíticas y las proteolíticas, en tanto que valores de pH alcalino (pH = 9 y bioensayo testigo), con mayor abundancia se encuentran las amilolíticas. De forma similar, para los resultados de AE, se observa que al inicio, en todos los bioensayos, las enzimas con mayor nivel de actividad son las fosfatasas y las proteasas. Al avanzar el proceso de depuración, éstas enzimas se mantienen con mayor actividad en los bioensayos a valores de pH constante de 7 y 9, en tanto que en el bioensayo a pH constante de 5 y el testigo, son las fosfatasas y carbohidrasas. Al final del proceso en los bioensayos a pH constante de 7 y 5, las

enzimas con mayor abundancia son las fosfatasas y carbohidrasas, mientras que las fosfatasas y las proteasas son las que se encuentran en mayor abundancia en los bioensayos a pH constante de 9 y el bioensayo testigo.

De esta forma es posible estimar de manera cualitativa la calidad del proceso de biodegradación, bajo cada una de las condiciones establecidas, dado que en cada etapa del proceso de biodegradación se encuentran diferentes proporciones de bacterias y de actividades enzimáticas. El ejemplo más claro se observa en los bioensayos a valor constante de pH 9 y testigo, en donde el porcentaje de bacterias amilolíticas es mayor cuando se ha removido más del 80% de DQO. Por otro lado, es posible que el diagnóstico de una etapa del proceso de biodegradación, en sistemas bien caracterizados, se realice mediante los resultados de la abundancia de bacterias y de AE. Por ejemplo, en el bioensayo a valor constante de pH 5, se encuentran con mayor abundancia las bacterias amilolíticas y las sacarolíticas cuando se tiene 0.0 y 94.3 de remoción, sin embargo, la abundancia de actividades enzimáticas es diferente, teniendo al inicio de la biodegradación mayor abundancia de fosfatasas y proteasas, mientras que al final del proceso se tiene mayor abundancia de fosfatasas y carbohidrasas.

Es importante resaltar que no se mide la totalidad de las bacterias ni la totalidad de la actividad enzimática, sino solo una muestra representativa de ambas. Por ello, se realizó el análisis de los datos de forma integral, mediante la diversidad tanto bacteriana como de la AE. De acuerdo con el cálculo numérico del índice de diversidad de Shannon-Wiener (H), es posible conocer la magnitud de orden o desorden de un sistema y asociarlo con el grado de contaminación presente en el cuerpo de agua de donde fueron extraídas las muestras. De esta forma, al encontrar una mayor complejidad tanto de comunidades bacterianas como de AE, se tendrá una mejor calidad del proceso depurativo o una mejor calidad de agua tratada. Cabe mencionar que el valor de H, relaciona tanto el número de especies presente en una comunidad, como la abundancia relativa de las mismas. De manera complementaria, debe considerarse que la diversidad o heterogeneidad de una comunidad será mayor cuando existan mayor número de especies (riqueza) y que dichas especies sean igualmente abundantes.

De esta forma, la diversidad bacteriana y de AE se evaluó a lo largo del proceso de depuración (H, Ecuación 5-3).

Tabla 5-8. Porcentaje de grupos bacterianos y enzimáticos encontrados al inicio, al día de mayor remoción y al final del proceso de depuración, para cada uno de los bioensayos a valores de pH constante (5, 7y 9) y el testigo.

<i>Grupos bacterianos</i>	<i>Tiempo (días)</i>											
	0	12	41	0	12	41	0	12	41	0	23	41
	<i>Bioensayo a pH = 5</i>			<i>Bioensayo a pH = 7</i>			<i>Bioensayo a pH = 9</i>			<i>Bioensayo Testigo</i>		
% Amilolíticos	48.3	14.1	39.6	34.9	36.7	33.7	36.8	63.0	93.0	51.0	36.7	99.9
% Sacarolíticos	36.8	34.3	45.0	26.3	9.7	65.8	25.7	4.9	4.7	38.9	9.7	0.0
% Lipolíticos	5.1	14.9	4.2	29.3	9.0	0.3	30.2	6.9	2.1	5.0	9.0	0.0
% Proteolíticos	9.8	36.7	11.1	9.4	44.6	0.2	7.3	25.1	0.3	5.0	44.6	0.1
% Celulolíticos	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Total de UFC mL⁻¹	2.9×10⁴	9.1×10⁸	2.0×10⁷	4.0×10⁴	4.4×10⁸	1.5×10⁷	3.9×10⁴	5.8×10⁸	1.9×10⁶	2.7×10⁴	4.4×10⁸	4.5×10⁶
<i>Grupos enzimáticos</i>												
% Fosfatasas	30.6	41.9	46.2	27.6	48.3	41.2	32.7	34.0	45.9	26.7	39.2	40.0
% Lipasas	20.4	9.7	15.4	19.0	13.8	9.8	18.4	18.0	13.5	17.8	11.8	30.0
% Proteasas	28.6	16.1	15.4	29.3	24.1	23.5	28.6	28.0	21.6	31.1	9.8	23.3
% Carbohidrasas	20.4	32.3	23.1	24.1	13.8	25.5	20.4	20.0	18.9	24.4	39.2	6.7
Total	24.5	31.0	26.0	29.0	29.0	25.5	24.5	25.0	18.5	22.5	25.5	15.0
% de remoción de DQO	0.0	79.8	94.3	0.0	75.5	95.0	0.0	79.9	97.6	0.0	76.6	81.6

$$H = - \sum_{i=1}^S (p'_i \times \log_2 p'_i)$$

Ecuación 5-3.

Donde: H = índice de diversidad acumulado, S = número de enzimas, p'_i = proporción total de la muestra que corresponde a la enzima i acumulado al tiempo t .

Los resultados de diversidad, tanto para el crecimiento bacteriano y la AE, se encuentran en la Figura 5-12. En cuanto a los valores de H , para el crecimiento bacteriano en los bioensayos a valores de pH constante, el máximo valor se alcanzó en el día 12, mientras que para el bioensayo testigo, se logró en el día 23. Posteriormente el valor de H es prácticamente constante. De igual forma ocurre con la diversidad enzimática, sólo que posterior a esos días la diversidad enzimática decae. Esto ocurre por la disminución en la síntesis de algunas enzimas, como una adaptación de las bacterias debido a la poca disponibilidad de materia orgánica remanente del proceso de biodegradación aerobia de las vinazas. Lo anterior indica que la remoción de la materia orgánica ocurre por el incremento en la población y diversidad bacterianas. Una vez que se ha removido la mayor parte de DQO, la diversidad bacteriana permanece casi constante y por arriba del valor inicial, aunque la población general disminuye por la falta de fuente materia orgánica. Esto coincide con la literatura (Luna-Pabello *et al.*, 1994), en donde aguas con menor contaminación permiten una mayor diversidad de comunidades microbianas que aguas con mayor contaminación.

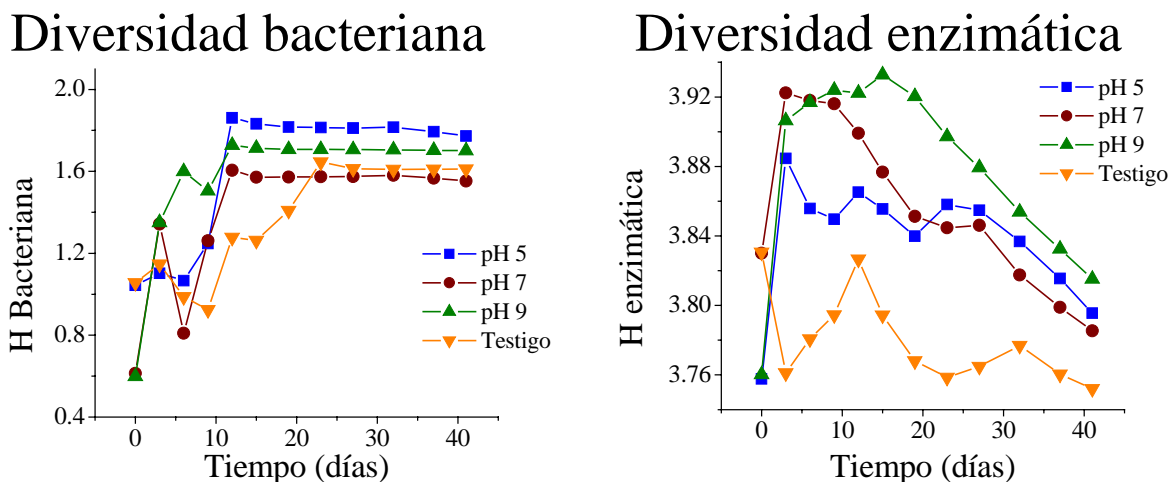


Figura 5-12. Diversidad del crecimiento bacteriano y de la AE en los bioensayos a valores constantes de pH (5, 7 y 9) y el testigo.

Tomando en cuenta lo anteriormente expuesto, puede decirse que existe una correlación entre la diversidad bacteriana y enzimática y el porcentaje de biodegradación. Esto se ilustra en la Figura 5-13 y en la Figura 5-14, en donde se observa que la calidad del agua resulta mejor cuando la diversidad de bacterias incrementa, lo que denotaría menor complejidad en la estructura comunitaria, a consecuencia de ambientes poco favorables, como es la presencia de una alta carga orgánica.

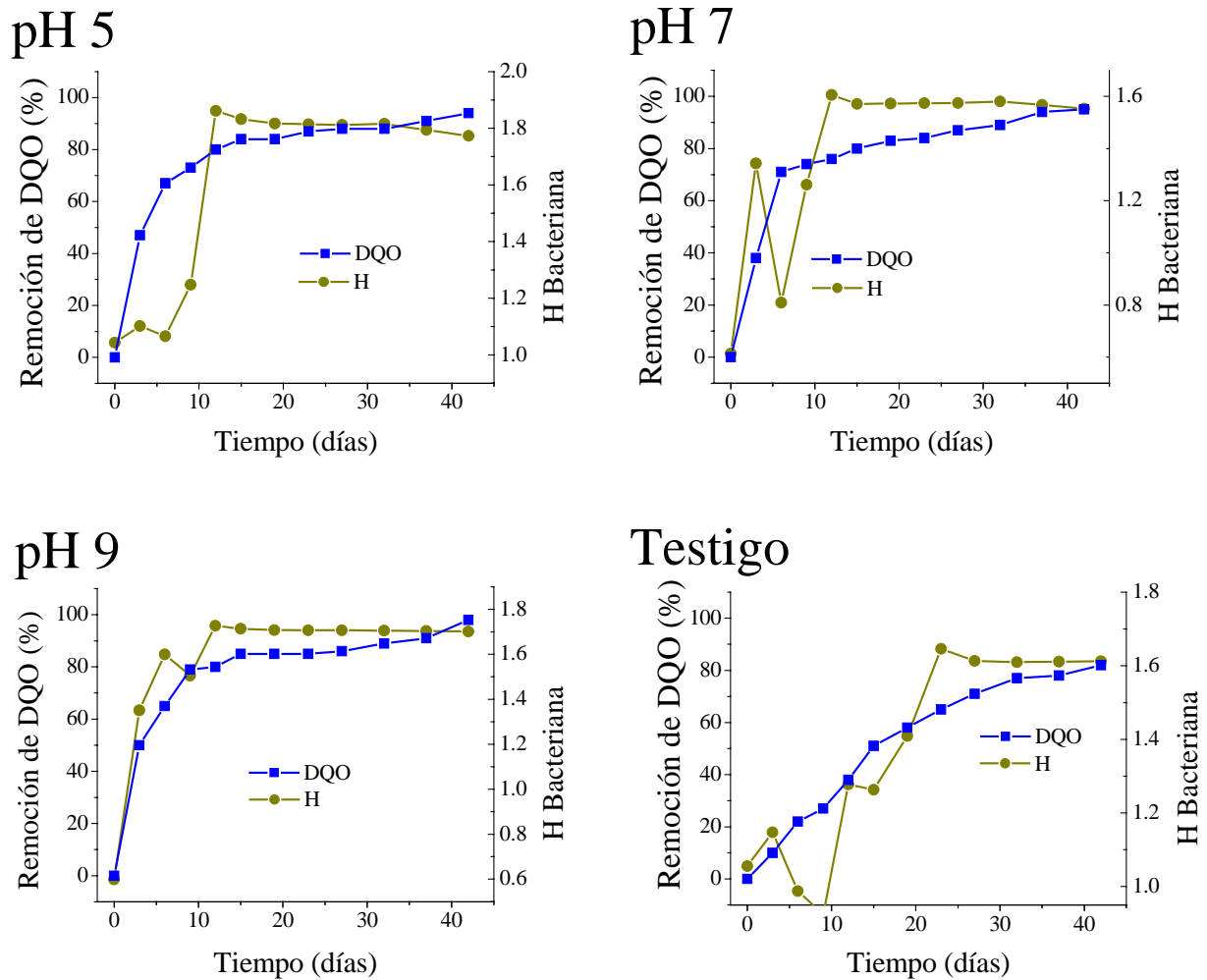


Figura 5-13. Graficas de la correlación entre el porcentaje de remoción de DQO y la diversidad bacteriana.

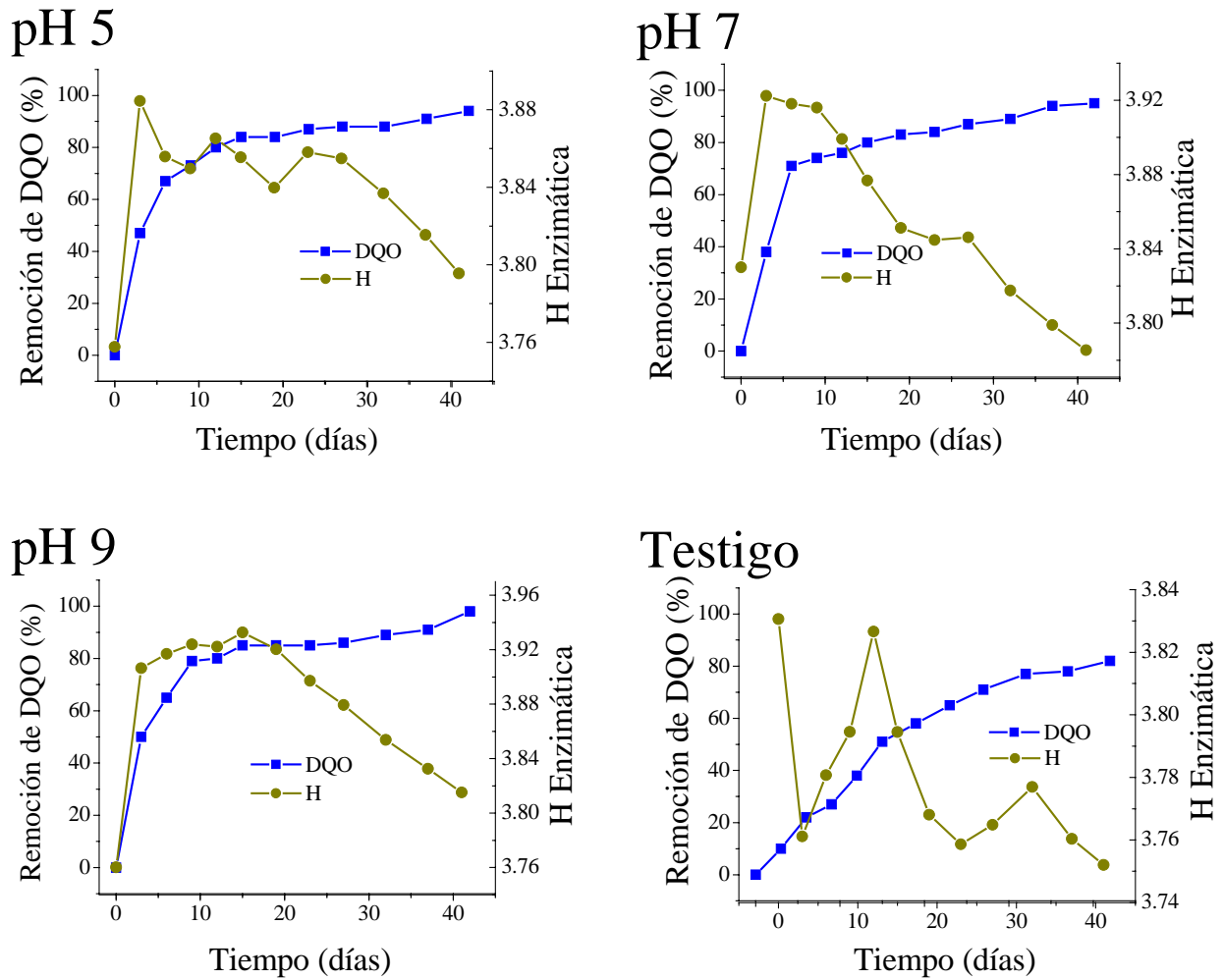


Figura 5-14. Graficas de la correlación entre el porcentaje de remoción de DQO y la diversidad enzimática.

De acuerdo con los valores obtenidos al final del proceso de depuración, para cada uno de los bioensayos, de porcentaje de remoción, abundancia total de bacterias y de AE y valores de diversidad bacteriana y enzimática, se encuentran ordenados los bioensayos como sigue:

% de remoción de DQO	pH 9 > pH 5 > pH 7 > Testigo
Abundancia bacteriana	pH 5 > pH 9 > Testigo > pH 7
Abundancia enzimática	pH 9 > pH 7 > pH 5 > Testigo
Diversidad bacteriana	pH 5 > pH 9 > Testigo > pH 7
Diversidad enzimática	pH 9 > pH 5 > pH 7 > Testigo

encontrándose mayor relación entre los valores del porcentaje de remoción y los de diversidad enzimática, por lo que dichos valores pueden ser empleados como una herramienta alterna para el seguimiento del proceso de depuración, así como también, para evaluar la calidad de dicho proceso.

Aunado a la información obtenida de los valores de diversidad tanto para la comunidad bacteriana como para la AE, es posible inferir que existe el potencial para incrementar dichos valores. Esto, dado que los valores de H_{\max} (el valor potencialmente alcanzable de diversidad) para las comunidades bacterianas y AE son 2.58 y 4.25, respectivamente. Lo anterior refleja que pueden existir limitantes para el desarrollo bacteriano y/o de la AE, como pueden ser la presencia o generación de compuestos tóxicos y la presencia de materia orgánica de difícil biodegradación, durante el proceso de depuración de las vinazas (Alexander, 1999; Baran *et al.*, 2004; Boopathy, 2000). Para lo cual, si se desea mejorar el proceso, se puede realizar un proceso de bioestimulación (ajuste del medio para proveer a las comunidades bacterianas de un ambiente favorable para la degradación de los contaminantes) o bioaumentación (adición de microorganismos capaces de degradar cierto contaminante), que son prácticas comúnmente usadas para incrementar el proceso de biorremediación de sitios contaminados, principalmente la bioaumentación, por proporcionar mejores resultados a menor costo, tanto en tecnologías *in situ* (tratamiento del material contaminando en el lugar: principalmente en suelos) como las biopilas y en tecnologías *ex situ* (remoción del material contaminado para un tratamiento; principalmente en tratamiento de aguas residuales) como los bioreactores o biofiltros (Bento *et al.*, 2005; Boopathy, 2000; Jézéquel *et al.*, 2005; Olaniran *et al.*, 2005; Scow y Hicks, 2005; Simon *et al.*, 2004).

De forma similar, se procedió a evaluar el proceso de biodegradación en los BE como se describe a continuación.

5.4. PRUEBAS DE BIODEGRADACIÓN AEROBIA DE LAS VINAZAS EN LOS BIOFILTROS EXPERIMENTALES

En la Figura 5-15, se muestran los BE en los que se realizaron las pruebas de biodegradación. Los biofiltros fueron empacados con una mezcla de escoria volcánica roja y gravilla blanca en una proporción de 6:4 (v/v), respectivamente. Esta mezcla presentó un porcentaje de porosidad del 56.77%. En la literatura, se ha reportado que las características del material de empaque son importantes para la remoción de los contaminantes y dependiendo del tipo de contaminantes es el tipo de material a usar (Scholz y Xu, 2002b). La caracterización de las propiedades hidráulicas de cada uno de los materiales se encuentra detallada en el anexo A-2) IV (pág. 90).

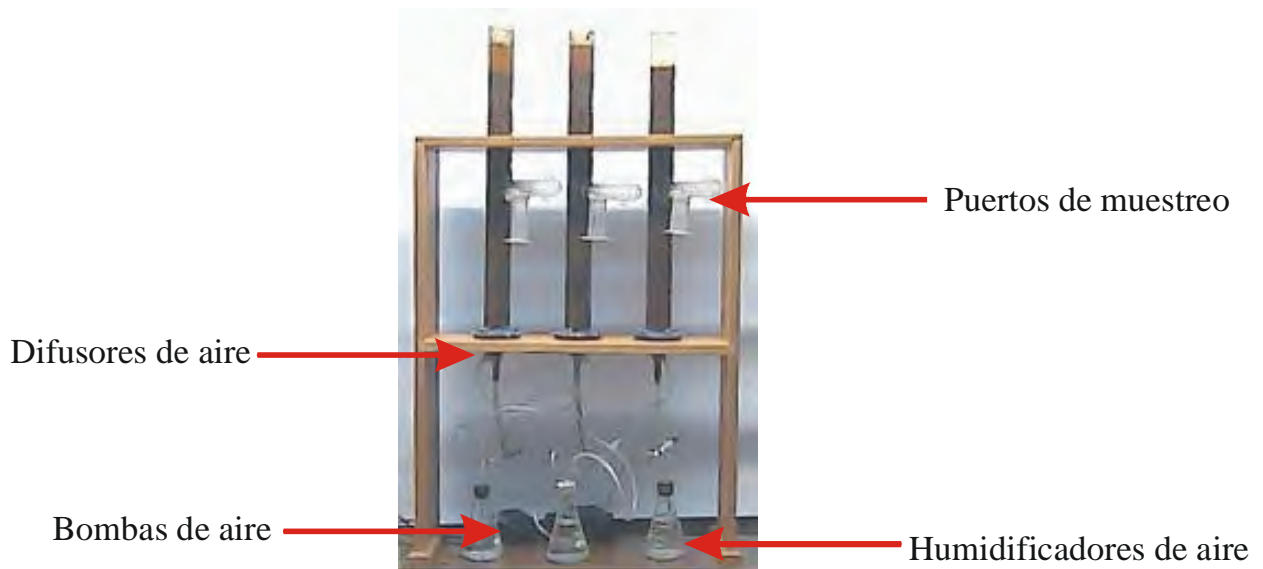


Figura 5-15. Biofiltros experimentales empleados para las pruebas de biodegradación aerobia de vinazas.

Para las pruebas de biodegradación aerobia de las vinazas, los biofiltros fueron alimentados con vinazas a una concentración del 10% (11 g DQO L⁻¹). En el primer lote de vinazas se adicionaron lodos activados en las condiciones ya establecidas. Se midió la concentración de oxígeno disuelto a una muestra de vinaza extraída de los biofiltros. Para evaluar las condiciones aerobias (> 2 mg L⁻¹), la concentración medida durante todo el tiempo de operación de los biofiltros se mantuvo por arriba de los 4 mg L⁻¹.

En un primer ensayo, se estableció el tiempo de saturación de materia orgánica (taponamiento) de los BE el cual fue de 12 días. Al término de estos días, la carga hidráulica disminuyó en un 17% y en un 33% a los 28 días. De acuerdo con estos resultados previos, se estableció un periodo de operación de los biofiltros de 32 días y con una alimentación cada 4 días y un TRH del mismo lapso, que corresponden al tiempo en que se tuvo la máxima velocidad de biodegradación (en los experimentos previos). De esta forma, se tomaron muestras del influente al inicio (día 0) y en los días 4, 8, 12, 16, 20, 24 y 28, que corresponden al último día de operación y cuando se adicionaba nuevamente vinaza al 10%. Se tomó también una muestra diaria durante todo periodo de operación, a las que se les determinó la DQO, presencia de grupos bacterianos y la AE.

Las etapas de operación de los biofiltros se dividieron en: inicial (días 0 a 8), intermedia (días 12 a 20) y final (días 24 a 32). En la Figura 5-16 se muestran las curvas de biodegradación y los resultados del ajuste a la cinética de primer orden se encuentran en la Tabla 5-9. De acuerdo con estos resultados, la velocidad de biodegradación incrementó del día 0 al día 12 y se mantuvo hasta el día 16, siendo los días 12 y 16 de adición cuando se obtuvo la mayor velocidad de biodegradación. Posteriormente, la velocidad de biodegradación disminuyó progresivamente del día 24 hasta el día 28 de operación. La disminución en la velocidad de biodegradación, en los días de operación posteriores al día 24, se debió al taponamiento de los biofiltros por la acumulación de materia orgánica y a la formación de la biopelícula sobre el material de empaque. Lo cual corresponde con lo reportado por otros autores. Por ejemplo, Semmens *et al.* (2003) encontró que el exceso de biopelícula contribuye a la disminución de la eficiencia del proceso, debido a que disminuye la difusión tanto de OD como de carbono. Cao y Alaerts (1995) demostraron que el consumo de oxígeno disminuye del 50% al 10% cuando se incrementa la superficie de la biopelícula. Lo anterior indica que al irse estableciendo las poblaciones de microorganismos el proceso de biodegradación aumenta. Sin embargo, la formación de la biopelícula retarda la transferencia de los nutrientes y del oxígeno, reduciendo la biodisponibilidad de éstos para los microorganismos y, por lo tanto, la velocidad de biodegradación (Boopathy, 2000).

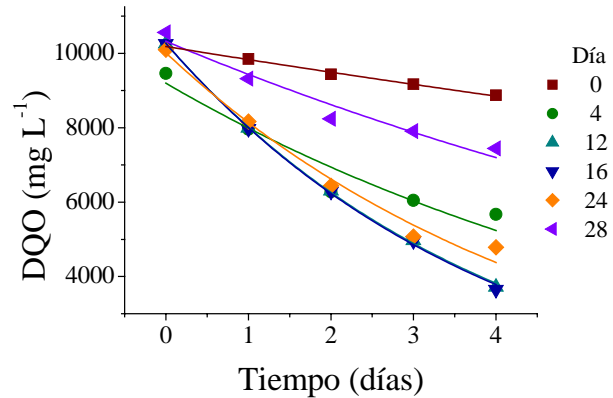


Figura 5-16. Curvas de biodegradación aerobia de las vinazas en los BE. Los días 0, 4, 12, 16, 24 y 28 son los días que se adicionaron vinazas a una concentración de 10%.

Tabla 5-9. Parámetros del ajuste a una cinética de primer orden, de las curvas de biodegradación aerobia de vinazas en los BE.

Parámetro	Día 0	Día 4	Día 12	Día 16	Día 24	Día 28
k (d^{-1})	0.04 ± 0.00	0.14 ± 0.02	0.25 ± 0.00	0.25 ± 0.01	0.21 ± 0.02	0.09 ± 0.01
S_0 (g DQO L^{-1})	10.2 ± 0.1	9.2 ± 0.1	10.3 ± 0.1	10.3 ± 0.1	10.0 ± 0.3	10.3 ± 0.2
R^2	0.996	0.931	0.999	0.999	0.985	0.956

El valor máximo de la constante de velocidad de biodegradación de las vinazas, en los biofiltros, fue de $0.25 \pm 0.01 d^{-1}$, similar a la constante de velocidad de biodegradación evaluada en los bioensayos a valores de pH constante (0.23 ± 0.03). En comparación, Cao y Alaerts (1995) encontraron que la velocidad de biodegradación de biomasa suspendida es mayor que la de biomasa adherida. Sin embargo, en los bioensayos realizados en los biofiltros, el valor de biodegradación alcanzado hasta el día 16 no se mantuvo y para el día 28 decayó 2.8 veces. Dicha disminución en la velocidad de biodegradación se debe, en parte, al efecto de taponamiento, que se presentó con una disminución en la carga hidráulica de 300 mL a 250 mL a partir del día 12 y para el día 24 disminuyó de 300 a 200 mL. En relación con otros estudios, los tiempos de taponamiento son muy variados (10, 80 y 253 días), lo que se debe principalmente al tipo de bacterias y hongos presentes en la biopelícula, la producción de exopolisacáridos y a la cantidad de materia orgánica suministrada (Liu *et al.*, 2003; Mattison *et al.*, 2002; Tanner y Skuinas, 1995; Vandevivere y Baveye, 2002b). En otros casos, el taponamiento se presenta en tiempos más prolongados, debido a la predación de bacterias (por protozoos), presencia de plantas vasculares

(como en los humedales artificiales) y/o a la adición de surfactantes biodegradables (Boopathy, 2000; Liu *et al.*, 2003; Mattison *et al.*, 2002; Rodgers *et al.*, 2003; Scholz y Xu, 2002a; Weber-Shirk y Dick, 1999). Por lo tanto, en sistemas de película fija, como los biofiltros, para el tratamiento de vinazas, una posible opción para retardar el taponamiento es el uso de surfactantes, previos estudios.

Los porcentajes de remoción de DQO se muestran en la Figura 5-17, para cada una de las etapas del proceso de biodegradación en los BE. Puesto que se parte de una misma concentración inicial, las velocidades de biodegradación corresponden con los porcentajes de remoción, es decir, a baja velocidad de biodegradación, bajos porcentajes de remoción.

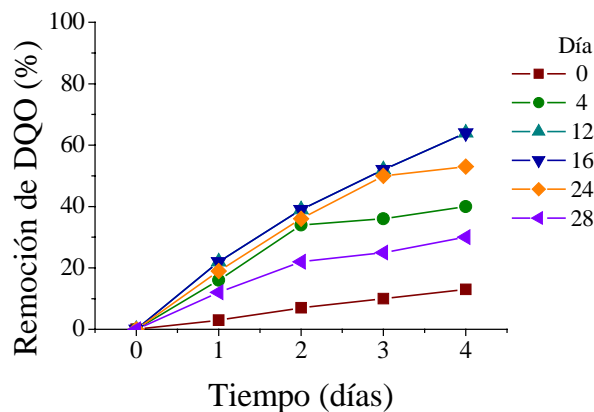


Figura 5-17. Porcentaje de remoción de DQO durante los 4 días de retención hidráulica, para los días de adición de vinazas: 0, 4, 12, 16, 24 y 28, en los BE.

Para evaluar la cantidad de materia orgánica removida en los BE, se obtuvo por integración del área bajo la curva de los valores de DQO obtenidos del influente y efluente, para las columnas alimentadas con vinazas y la alimentada con agua de la llave, como se muestra en la Figura 5-18. La cantidad de DQO removida, se calculó como la diferencia de la concentración de la materia orgánica alimentada menos la del efluente. Los resultados en cuanto a la remoción de DQO, se encuentran en la Tabla 5-10. La cantidad de materia orgánica aportada por el material de empaque, no fue significativa con respecto a la aportada por las vinazas, siendo apenas del 0.7%. El porcentaje de DQO, que se removió durante los 32 días de operación de los biofiltros, fue del 50.5%. Estos resultados son consistentes con otros estudios reportados en la literatura. Por ejemplo, para aguas residuales con detergentes y grasa de la industria láctea, el porcentaje de

remoción alcanzado fue del 53%, utilizando biofiltros empacados con arena y con un tiempo de taponamiento de 131 días (Liu *et al.*, 2003). En los bioensayos realizados en los biofiltros, la cantidad de materia orgánica removida por gramo de material de empaque fue de 12.2 mg, en tanto que la removida en ausencia de biopelícula fue de 37.5×10^{-3} mg, resultado que la remoción por biodegradación es más importante que la remoción por adsorción. Del trabajo de Liu *et al.* (2003), se deduce que por centímetro cúbico de sistema se logran remover 9.7 mg de DQO, mientras que para los biofiltros empleados en este trabajo fue de 8.5 mg de DQO. De lo que se infiere que las diferencias en la remoción de materia orgánica se debe al tipo de agua tratada y al material de empaque.

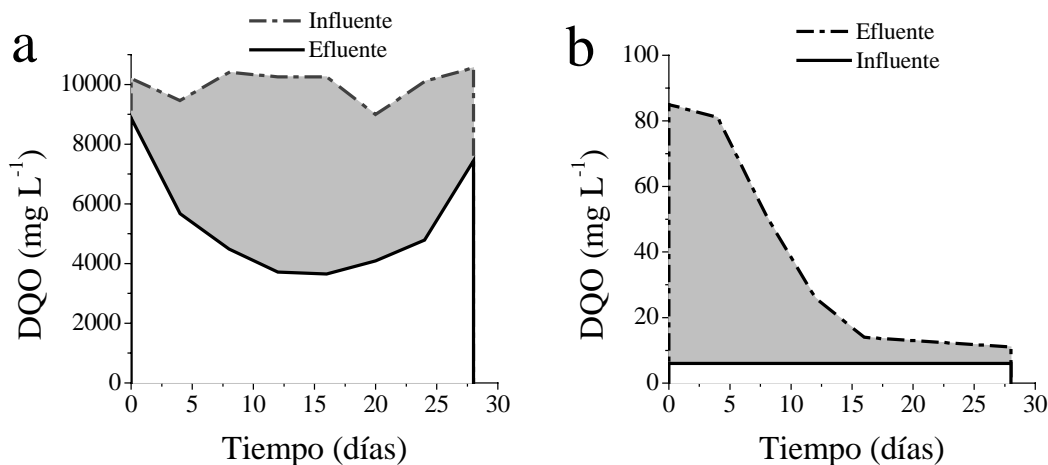


Figura 5-18. Remoción de materia orgánica (DQO) en los BE: a) alimentados con vinazas; b) alimentados con agua de la llave.

Tabla 5-10. Resultados del contenido total de materia orgánica disuelta (mg DQO) en las pruebas realizadas en los BE alimentados con vinazas y con agua de la llave.

	Vinazas	Agua de la llave
Influente	21 031	14
Efluente	11 259	88
Removida	9 772	-74

El valor negativo, en el valor correspondiente al de remoción en la columna alimentada con agua de la llave, indica que hubo un aporte de materia orgánica por parte del material de empaque.

De igual forma que en los bioensayos a valores de pH constante, se evaluó el crecimiento bacteriano. Las curvas de crecimiento de los grupos bacterianos se encuentran en la Figura 5-19.

En general, hay un incremento del crecimiento en la etapa inicial alcanzando su máximo valor en la etapa intermedia y, posteriormente, en la etapa final se observó un ligero decaimiento. El incremento de la biomasa provoca que se tenga una mayor velocidad de biodegradación de DQO. Así, en la etapa intermedia, en donde se tiene el mayor crecimiento de biomasa, es donde se tiene la mayor velocidad de biodegradación. Sin embargo, el decaimiento en la abundancia de todos los grupos bacterianos, se debe, en parte, a los procesos de adaptación y eliminación de las bacterias menos competentes en una biopelícula madura (Liu *et al.*, 2003; Luna-Pabello, 1990; Roy, 1993; Shaw *et al.*, 1985; Vandevivere y Kirchman, 1993).

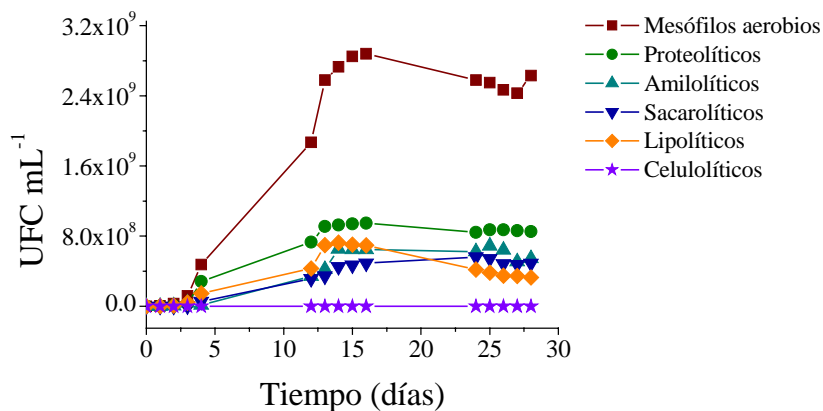
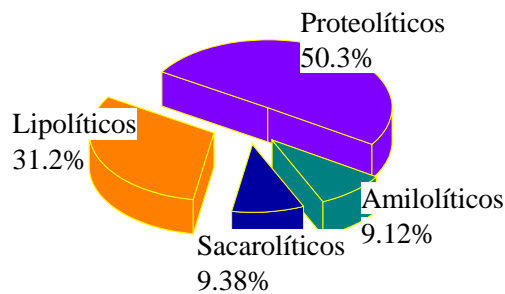


Figura 5-19. Curvas de crecimiento de los 6 grupos bacterianos durante la biodegradación aerobia de vinazas en los BE.

Los resultados, en cuanto a la abundancia de bacterias por grupo trófico, se encuentran en la Figura 5-20, donde se observa que el grupo con mayor abundancia en todas las etapas de operación fue el de las bacterias proteolíticas. El grupo de bacterias lipolíticas es el siguiente con mayor abundancia al inicio del proceso. Posteriormente, va disminuyendo en las siguientes etapas y al final del proceso es el grupo de menor abundancia. Por otro lado, los grupos de bacterias amilolíticas y sacarolíticas son los de menor abundancia en la etapa inicial, incrementando posteriormente. El hecho de que se tenga una mayor concentración de bacterias proteolíticas que lipolíticas, se debe posiblemente a que en las vinazas la principal fuente de carbono son las proteínas (74%), posteriormente los carbohidratos (16%) y al final los lípidos (10%) (Vlyssides *et al.*, 1997). El aumento en bacterias amilolíticas y sacarolíticas, en la última etapa de operación de los biofiltros, se debe a que la acumulación de fuentes de carbono como polisacáridos, servirá de

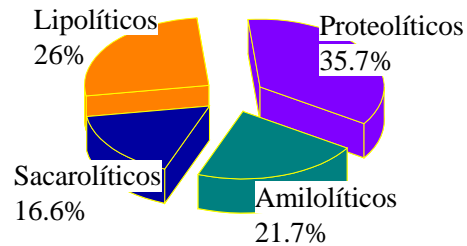
alimento a estas bacterias. Puede apreciarse que la abundancia de bacterias, encontradas en los bioensayos de biodegradación aerobia de vinazas a valores de pH constante y la encontrada en los BE, es totalmente diferente. Siendo, por abundancia, las bacterias amilolíticas el grupo mas importante en los bioensayos a valores de pH constante, en tanto que para los biofiltros fue el de las proteolíticas. Por lo anterior, bajo las condiciones experimentales en las que se operaron los biofiltros, la formación de la biopelícula, favorece el crecimiento de bacterias proteolíticas, más que el de los otros grupos.

Inicial



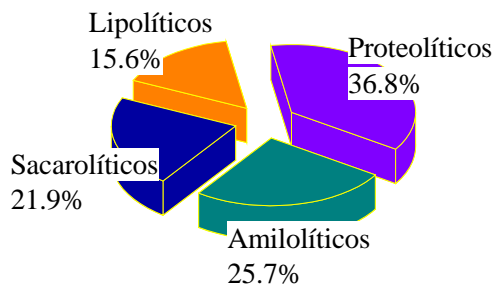
Total de bacterias = 6.4×10^8

Intermedia



Total de bacterias = 1.3×10^{10}

Final



Total de bacterias = 1.2×10^{10}

Figura 5-20. Porcentaje de crecimiento de los grupos bacterianos, evaluados durante la biodegradación aerobia de vinazas en los BE.

En cuanto a los resultados de distribución y abundancia de AE, los resultados se encuentran de la Tabla 8-7 a la Tabla 8-9 del anexo A-2) III (pág. 87). Los valores de porcentaje de abundancia de los grupos enzimáticos, que se encontraron en las tres etapas de operación de los BE, se encuentran en la Figura 5-21. En donde se observa que el grupo de enzimas con mayor

abundancia fue el de fosfatasas, con una actividad por arriba del 50% (>2.5 unidades), lo que coincide con lo encontrado en los bioensayos de biodegradación de vinazas a valores de pH constante y tampoco se encontró actividad de la β -glucuronidasa. En la etapa inicial, las proteasas son las siguientes en abundancia, mientras que en las etapas intermedia y final, son las que se encuentran con menor abundancia. En la etapa intermedia y final, las carbohidrasas y lipasas se mantuvieron con mayor abundancia que las proteasas. El que no se encuentre mayor actividad de proteasas que de lipasas o carbohidrasas, puesto que el grupo de bacterias proteolíticas es el de mayor abundancia, se debe a que estas bacterias pueden usar otras proteasas diferentes a las evaluadas con las galerías api ZYM.

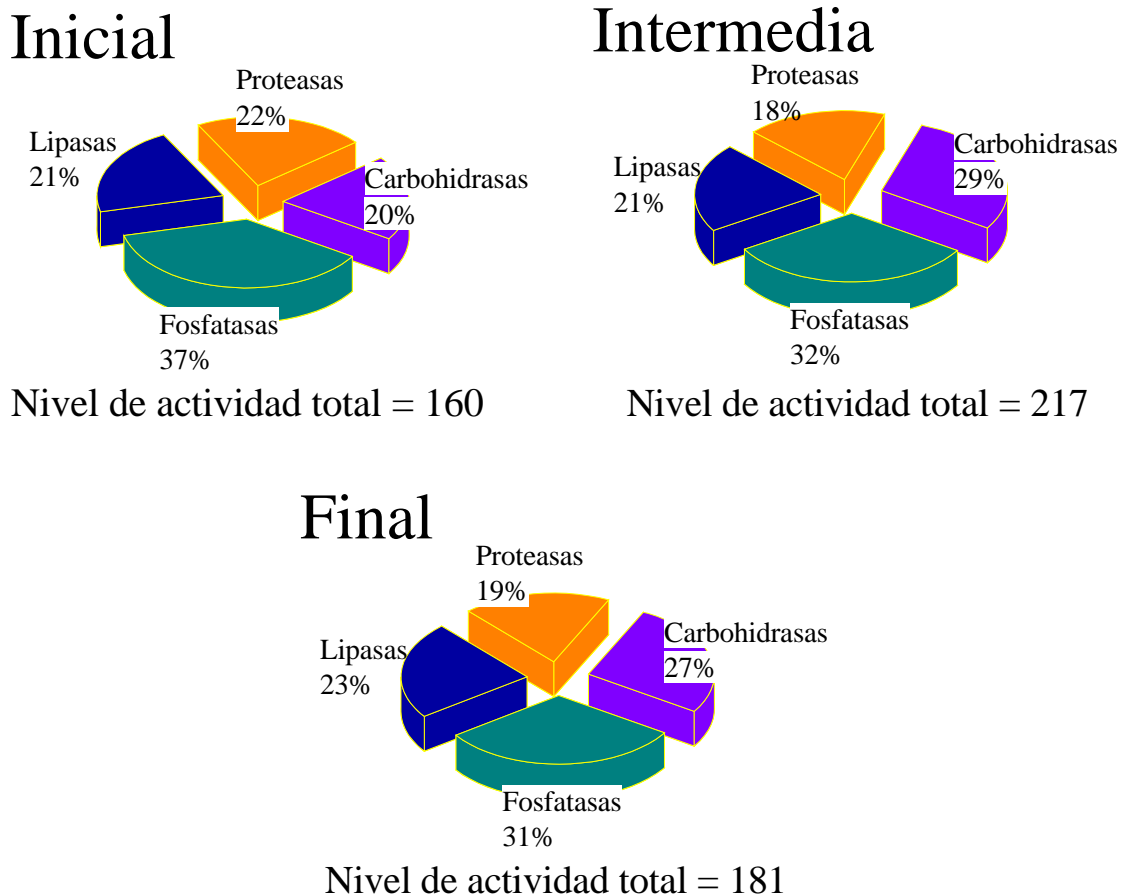


Figura 5-21. Porcentaje de actividad de las enzimas evaluadas durante el proceso de biodegradación aerobia de las vinazas en los biofiltros experimentales, durante las etapas inicial, intermedia y final, del proceso.

También, se analizando el proceso de biodegradación en los BE, mediante las abundancias bacteriana y enzimática (Tabla 5-11), para cada una de las etapas del proceso. Por ejemplo, en cuanto al crecimiento bacteriano, en la etapa inicial de operación de los BE, las bacterias que se mantienen con mayor abundancia (excepto el día 0) son las proteolíticas, manteniéndose hasta el final de la etapa final de operación de los biofiltros. Las bacterias lipolíticas también se encuentran con mayor abundancia pero solo en las etapas inicial e intermedia, en tanto que las amilolíticas sólo están en mayor abundancia (junto con las proteolíticas) en la etapa final de operación de los biofiltros. De forma similar, la actividad de las fosfatasas es las más abundante durante toda la operación de los biofiltros y las carbohidrasas también se encuentran con mayor abundancia solo en la etapa intermedia. De acuerdo con lo expuesto anteriormente, la mayor velocidad de biodegradación aerobia de vinazas en el biofiltro, bajo las condiciones experimentales establecidas, estará indicado por una mayor abundancia de bacterias lipolíticas y proteolíticas, así como de las actividades de fosfatasas y carbohidrasas.

Tabla 5-11. Porcentaje de grupos bacterianos y enzimáticos, encontrados en las diferentes etapas del proceso de biodegradación aerobia de las vinazas, en los BE.

<i>Grupos bacterianos</i>	<i>Tiempo (días)</i>								
	0	2	4	12	14	16	24	26	28
	<i>Etapas inicial</i>			<i>Etapas intermedia</i>			<i>Etapas final</i>		
% Amilolíticos	31.3	24.4	2.8	18.8	23.7	23.3	25.5	27.3	24.6
% Sacarolíticos	30.5	1.6	11.1	17.3	16.4	17.7	23.0	20.6	22.1
% Lipolíticos	30.3	33.9	29.3	23.6	26.3	25.0	17.1	14.9	14.8
% Proteolíticos	7.8	40.1	56.8	40.2	33.6	34.0	34.5	37.2	38.4
% Celulolíticos	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Total de UFC mL⁻¹	3.4x⁴	2.5x⁷	5.0x⁸	1.8x⁹	2.8x⁹	2.8x⁹	2.4x⁹	2.3x⁹	2.2x⁹
<i>Grupos enzimáticos</i>									
% Fosfatasas	37	41	34	34	32	33	32	29	32
% Lipasas	24	20	20	18	22	22	25	28	22
% Proteasas	24	23	22	18	19	16	17	18	19
% Carbohidrasas	16	16	24	30	27	29	26	25	26
Total	19	35	41	39	47	46	39	36	36
<i>% remoción de DQO</i>	<i>0</i>	<i>7</i>	<i>13</i>	<i>0</i>	<i>39</i>	<i>64</i>	<i>0</i>	<i>36</i>	<i>53</i>

De igual forma que los bioensayos de biodegradación de vinazas a valores de pH constante, se analizó la diversidad bacteriana y enzimática. Los resultados se encuentran graficados en la Figura 5-22. Los valores más altos de diversidad, para el crecimiento bacteriano, se alcanzaron durante la etapa de operación intermedia de los biofiltros (entre los días 12 y 25). Con un incremento en la etapa inicial y un decremento en los últimos días de operación de los biofiltros. En tanto que para los valores de diversidad encontrados para la AE, los máximos valores se alcanzaron entre los días 12 y 16. De igual forma que los resultados encontrados en los bioensayos de biodegradación de las vinazas a valores de pH constante, las etapas donde se tiene el mayor porcentaje de remoción de DQO, están indicados por el aumento en los valores de diversidad tanto para el crecimiento bacteriano, como para la AE.

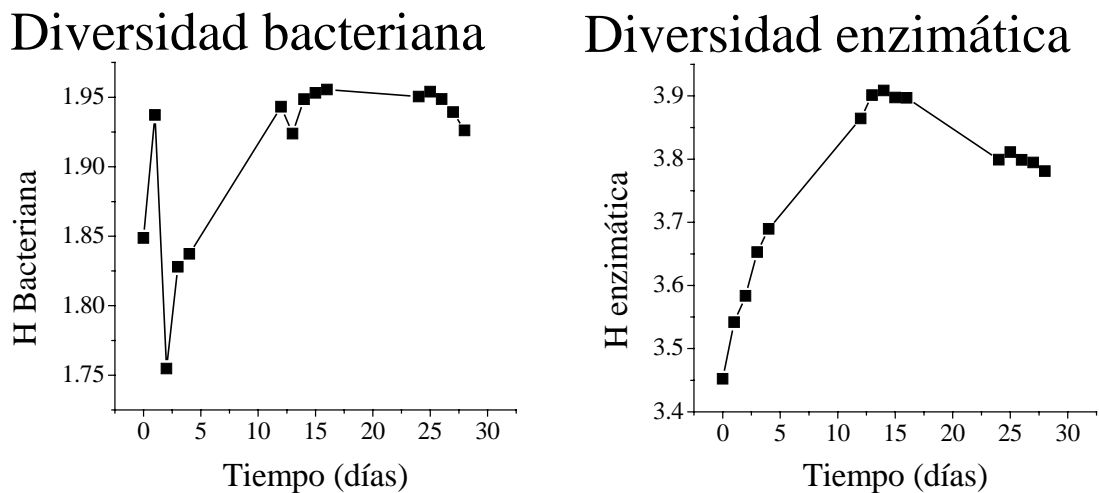
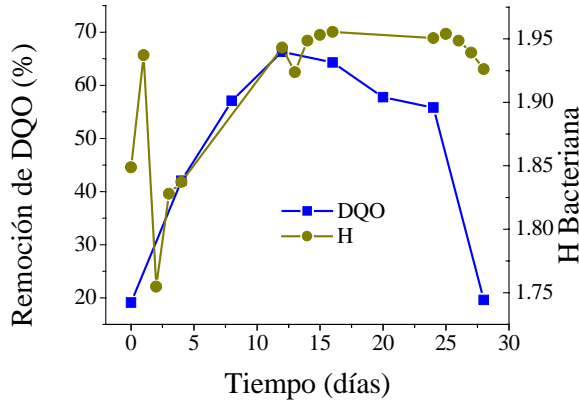


Figura 5-22. Diversidad del crecimiento bacteriano y de la AE, durante la biodegradación aerobia de las vinazas en los BE.

La correlación entre los valores de diversidad bacteriana y enzimática se ilustra en la Figura 5-23. En donde se al aumentar la diversidad bacteriana y enzimática, la calidad del agua tratada resulta mejor. Sin embargo, este incremento en diversidad es posible por la presencia de materia orgánica, que permite el crecimiento de las comunidades bacterianas. De igual forma que en los bioensayos de biodegradación de vinazas a valores constantes de pH, la mayor biodegradación se tendrá cuando la complejidad en la estructura comunitaria sea mayor.

Diversidad bacteriana



Diversidad enzimática

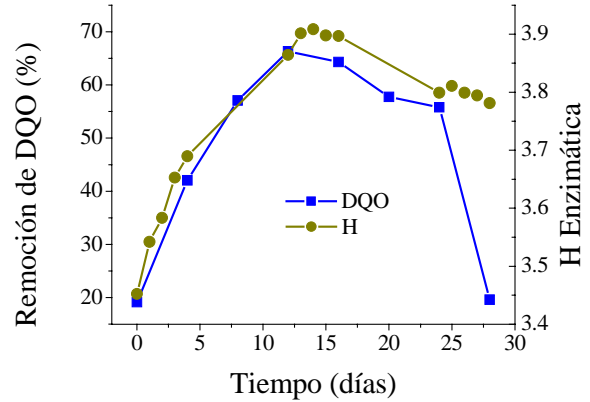


Figura 5-23. Graficas de la correlación entre el porcentaje de remoción de DQO y la diversidad bacteriana y enzimática.

En consecuencia, cuando la diversidad bacterias y de AE es mayor, la calidad del proceso de depuración y, por lo tanto, del agua tratada, resultan mejor. De esta forma, debe considerarse que al formarse la biopelícula, quedarán únicamente aquellas especies con mejor capacidad de adaptación, lo que denotaría menor complejidad en la estructura comunitaria y, por lo tanto, la velocidad de biodegradación disminuye.

6. CONCLUSIONES

La biodegradación aerobia de las vinazas se ajusta a una cinética de primer orden y la dependencia de la velocidad de biodegradación con la concentración inicial de DQO, es descrito por el modelo de Michaelis-Menten, lo que indica que no hay inhibición de la biodegradación por el aumento de la concentración de DQO, dentro del intervalo empleado en la experimentación.

La velocidad de biodegradación es independiente del pH de las vinazas, siempre que éste último se mantenga en valores constantes a 5, 7 y 9. Sin embargo, cuando el pH durante el proceso de biodegradación no es ajustado, para evitar su cambio, la velocidad de biodegradación disminuye. Dicha disminución se debe a que las bacterias tardan más tiempo en adaptarse metabólicamente en un medio con pH fluctuante que en uno constante, por lo que crecen a menor velocidad.

El proceso de biodegradación de las vinazas en los biofiltros sigue una cinética de primer orden. La máxima velocidad de biodegradación que se alcanzó, fue en la etapa de operación intermedia. A los 28 días de operación, el taponamiento de los biofiltros ocasionó una disminución en la capacidad de suministro de las vinazas. Sin embargo, la cantidad de materia orgánica removida, por centímetro cúbico de biofiltro (8.6 mg de DQO), corresponde a lo encontrado en otras investigaciones (Liu *et al.*, 2003) (9 mg de DQO cm⁻³ de biofiltro) usando aguas residuales industriales con alta carga de materia orgánica.

Dado que el grado de remoción de materia orgánica logrado se ve reflejado tanto en la diversidad bacteriana, como en la enzimática, presentes en el proceso de biodegradación, representan una herramienta útil para la evaluación del proceso de biodegradación aerobia de vinazas. En consecuencia, poseen un amplio potencial de aplicación para el diagnóstico de la operación de sistemas con biomasa en suspensión y biofiltros, en la biodegradación de materia orgánica.

7. REFERENCIAS

- Ahtiainen J., Aalto M. y Pessala P. (2003) Biodegradation of Chemicals in a Standardized Test and in Environmental Conditions. *Chemosphere*, **51**, 529-537.
- Alam M. Z., Fakhru'I-Razi A. y Molla A. H. (2003) Biosolids Accumulation and Biodegradation of Domestic Wastewater Treatment Plant Sludge by Developed Liquid State Bioconversion Process Using a Batch Fermenter. *Water Res.*, **37**, 3569-3587.
- Alexander M. (1999) *Biodegradation and Bioremediation*. Academic Press. San Diego, California. 443 Pp.
- Álvarez-Fajardo E. (2003) Evaluación de la Remoción de Ortofosfatos Empleando Columnas a Pequeña Escala Empacadas con Diferentes Materiales Pétreos. *Tesis de licenciatura (Ingeniero Químico)*. Facultad de Química, UNAM, México, D. F.
- Ambriz-Rivas K. T., Armendáriz-Galvan F., Luna-Pabello V. M. y Durán C. (1998) Estudio de Biodegradabilidad Aerobia Rápida OECD 301-A para Aguas Residuales. Caso Tipo: Efluentes del Proceso de Cempasúchil (*Tagetes erecta*) Pretratadas Anaerobiamente. *ALDEQ*, 127-132.
- APHA. (1998) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater Analysis*. American Public Health Association. 20th edition. AWWA and WPF, Washington D. C. E.E.U.U.A.
- Atkins G. I. y Nimmo I. A. (1980) Current Trends in the Estimation of Michaelis-Menten Parameters. *Anal. Biochem.*, **104**, 1-9.
- Bahgat M., Dewedar A. y Zayed A. (1999) Sand-Filters Used for Wastewater Treatment: Buildup and Distribution of Microorganisms. *Water Res.*, **33**(8), 1949-1955.
- Bandick A. K. y Dick R. P. (1999) Field Management effects on Soil Enzyme Activities. *Soil Biol. Biochem.*, **31**, 1471-1479.
- Baran S., Bielińska J. E. y Oleszczuk P. (2004) Enzymatic Activity in an Airfield Soil Polluted with Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Geoderma*, **118**, 221-232.
- Bento F. M., Camargo F. A. O., Okeke B. C. y Frankenberger W. T. (2005) Comparative Bioremediation of Soils Contaminated with Diesel Oil by Natural Attenuation, Biostimulation and Bioaugmentation. *Bioresource Technol.*, **96**, 1049-1055
- Billore S. K., Singh N., Ram H. K., Sharma J. K., Singh V. P., Nelson R. M. y Dass P. (2001) Treatment of Molasses Based Distillery Effluent in a Constructed Wetland in Central India. *Water Sci. Technol.*, **44**(11), 441-448.
- Blok J. (1994a) Classification of Biodegradability by Growth Kinetic Parameters. *Ecotox. Environ. Safe.*, **27**, 294-305.
- Blok J.: (1994b) Extrapolation of Biodegradability Test Data by Use of Growth Kinetic Parameters. *Ecotox. Environ. Safe.*, **27**, 306-315.
- Boopathy R. (2000) Factors Limiting Bioremediation Technologies. *Bioresource Technol.*, **74**, 63-67.

- Bueno-De-Paula M., Rodríguez-Holanda F. S., Adelande-Mesquita H. y Déa-De-Carvalho V. (1999) Uso da Vinhaça no Abacaxizeiro nm Solo de Baixo Potencial de Produção. *Pesqui. Agropecu. Bras.*, **34**(7), 1217-1222.
- Cámara Azucarera, *Cámara Nacional de las Industrias Azucarera y Alcoholera*, México (2005) <http://www.camaraazucarera.org.mx>
- Campos L. C., Su M. F. J., Graham N. J. D. y Smith S. R. (2002) Biomass Development in Slow Sand Filters. *Water Res.*, **36**, 4543-4551.
- Cao Y. S. y Alaerts G. J. (1995) Aerobic Biodegradation and Microbial Population of a Synthetic Wastewater in a Channel with Suspended and Attached Biomass. *Water Sci. Technol.*, **31**(7), 181-189.
- Chudoba P., Capdeville B. y Chudoba J. (1992) Explanation of Biological Meaning of the S_0/X_0 Ratio in Batch Cultivation. *Water Sci. Technol.*, **26**(3/4), 743-751.
- Ciria M. P., Solano M. L. y Soriano P. (2005) Role of Macrophyte *Typha latifolia* in a Constructed Wetland for Wastewater Treatment and Assessment of Its Potential as a Biomass Fuel. *Biosystems Eng.*, **92**(4), 535-544.
- CNA (Comisión Nacional del Agua), México. *Estadísticas* (2004). <http://www.cna.gob.mx>
- Cortez L. A. B. y Pérez L. E. B. (1997) Experiences on Vinasse Disposal. Part III: Combustion of Vinasse #6 Fuel Oil Emulsions. *Braz. J. Chem. Eng.* **14**(1).
- Decloux M., Bories A., Lewandowski R., Fargues C., Mersad A., Lameloise M. L., Bonnet F., Dherbecourt B. y Osuna L. N. (2002) Interest of Electrodialysis to Reduce Potassium Level in Vinasses. Preliminary Experiments. *Desalination*, **146**, 393-398.
- Dijkhuizen D. E. y Hartle D. L. (1983) Selection in Chemostats. *Microbiol. Rev.*, **47**, 150-168.
- Fenoglio-Limón F. E. (2000) Bases de Diseño para la Construcción de un Reactor Biológico Experimental Basado en los Sistemas de Humedales Artificiales de Flujo Vertical. *Tesis de licenciatura (Ingeniero Químico)*. Facultad de Química, UNAM, México, D. F.
- García G. I., Venceslada B. J. L., Peña J. P. R. y Ramos-Gómez E. (1997) Biodegradation of Phenol Compounds in Vinasse Using *Aspergillus terreus* and *Geotrichum candium*. *Water Res.*, **31**(8), 2005-2011.
- García J., Aguirre P., Mujeriego R., Huang Y., Ortiz L. y Bayona J. M. (2004) Initial Contaminant Removal Performance Factors in Horizontal flow Reed Beds Used for Treating Urban Wastewater. *Water Res.*, **38**, 1669-1678.
- García J., Viviar J., Aromir M. y Mujeriego R. (2003) Role of Hydraulic Retention Time and Granular Medium in Microbial Removal in Tertiary Treatment Redd Beds. *Water Res.*, **37**, 2645-2653.
- Ghosh M., Ganguli A. y Tripathi A. K. (2002) Treatment of Anaerobically Digested Distillery Spentwash in a Two-Stage Bioreactor Using *Pseudomonas putida* and *Aeromonas sp.* *Process Biochem.*, **37**, 857-862.
- Giraldo E. y Zárata E. (2001) Development of a Conceptual Model for Vertical Flow Wetland Metabolism. *Water Sci. Technol.*, **44**(11-12), 273-280.

- Grady C. P. L., Smets B. F. y Barbeau D. S. (1995) Variability in Kinetic Parameters Estimates: a Review of Possible Causes and a Proposed Terminology. *Water Res.*, **30**(3), 742-748.
- Ibekwe A. M., Grieve C. M. y Lyon S. R. (2003) Characterization of Microbial Communities and Composition in Constructed Dairy Wetland Wastewater Effluent. *Appl. Environ. Microb.*, **69**(9), 5060-5069.
- Jézéquel K., Perrin J. y Lebeau T. (2005) Bioaugmentation with a *Bacillus sp.* to Reduce the Phytoavailable Cd of an Agricultural Soil. *Chemosphere*, **59**, 1323-1331.
- Jiménez A. M., Borja R. y Martín A. (2003) Aerobic-Anaerobic Biodegradation of Beet Molasses Alcoholic Fermentation Wastewater. *Process Biochem.*, **38**, 1275-1284.
- Jiménez A. M., Borja R., Alonso V. y Martín A. (1997) Influence of Aerobic Pretreatment with *Penicillium Decumbens* on the Anaerobic Digestion of Beet Molasses Alcoholic Fermentation Wastewater in Suspended and Immobilized Cell Bioreactors. *J. Chem. Technol. Biot.*, **69**, 193-202.
- Jiménez A. M., Borja R., Martín A., y Raposo F. (2005) Mathematical Modeling of Aerobic Degradation of Vinasses with *Penicillium decumbens*. *Process Biochem.*, **40**, 2805-2811.
- Jiménez-Ambriz R. M. y Martínez-Garza M. A. (1995) Instalación y Arranque de un Reactor Anaerobio en un Tren Anaerobio-Aerobio de una Planta Piloto de Tratamiento de Vinazas. *Tesis de licenciatura (Ingeniero Químico)*. Facultad de Química, UNAM, México, D. F.
- Kao C. M., Chen S. C. y Su M. C. (2001) Laboratory Column Studies for Evaluating a Barrier System for Providing Oxygen and Substrate for TCE Biodegradation. *Chemosphere*, **44**, 925-934.
- Långmark J., Storey M. V., Ashbolt N. J. y Stenström T. A. (2004) Artificial Groundwater Treatment: Biofilm Activity and Organic Carbon Removal Performance. *Water Res.*, **38**, 740-748.
- Lardon L., Punal A., Steyer J. P., Roca E., Lema J., Lambert S., Ratine P., Frattesi S. y Bernard O. (2002) Specifications of Modular Internet-Based Remote Supervision Systems for Wastewater Treatment Plants. http://www.ercim.org/telemac/pub/besai_telemac_supervision.pdf.
- Ledakowicz S., Solecka M. y Zylla R. (2001) Biodegradation, Decolourisation and Detoxification of Textile Wastewater Enhanced by Advanced Oxidation Processes. *J. Biotechnol.*, **89**, 175-184.
- Lehninger A. L., Nelson D. L. y Cox M. M. (1995). *Principles of Biochemistry*, Worth Publishers, Inc. Second Edition. New York, USA.
- Leirós M. C., Trasar-Cepeda C., García-Fernández F. y Gil-Sotres F. (1999) Defining the Validity of a Biochemical Index of Soil Quality. *Biol. Fert. Soils*, **30**, 140-146.
- Liu Q., Mancl K. y Tuovinen O. H. (2003) Biomass Accumulation and Carbon Utilization in Layered Sand Filter Biofilm Systems Receiving Milk Fat and Detergent Mixtures. *Bioresource Technol.*, **89**, 275-279.

- Luederitz V., Eckert E., Lange-Weber M., Lange A. y Gersberg R. M. (2001) Nutrient Removal Efficiency and Resource Economics of Vertical Flow and Horizontal Flow Constructed Wetlands. *Ecol. Eng.*, **18**, 157-171.
- Luna-Pabello V. M. (1990) Efecto de la Temperatura en las Poblaciones de Protozoarios Ciliados en un Reactor de Biodiscos. *Tesis de maestría (Maestría en Ciencias Biológicas)*. Facultad de Ciencias, UNAM, México, D. F.
- Luna-Pabello V. M., Aladro-Lubel M. A. y Durán de Bazúa C. (1994) Efecto del Substrato Sobre las Poblaciones de Ciliados en un Reactor de Biodiscos. Casos Tipo: Nejayote, Vinazas y Aguas Blancas de Papel. *Programa de Ingeniería Química y Química Ambiental*. Pub. Facultad de Química, UNAM, México, D. F.
- Maeda M., Itoh A. y Kawase Y. (2005) Kinetics for Aerobic Biological Treatment of *o*-cresol Containing Wastewaters in a Slurry Bioreactor: Biodegradation by Utilizing Waste Activated Sludge. *Biochem. Eng. J.*, **22**, 97-103.
- Mahimairaja S. y Bolan N. S. (2004) Problems and Prospects of Agricultural Use of Distillery Spentwash in India. *SuperSoil*. 3rd Australian New Zeland Soils Conference, University of Sydney, Australia, p:1-6.
- Malandra L., Wolfaardt G., Zietsman A. y Viljoen-Bloom M. (2003) Microbiology of a Biological Contactor for Winery Wastewater Treatment. *Water Res.*, **37**, 4125-4134.
- Mantovi P., Marmiroli M., Maestri E., Tagliavini S., Piccinini S. y Marmiroli N. (2003) Application of a Horizontal Subsurface Flow Constructed Wetland on Treatment of Dairy Parlor Wastewater. *Bioresource Technol.*, **88**, 8-94.
- Mao H. y Smith D. W. (1995) A Mechanistic Model for Assessing Biodegradability of Complex Wastewaters. *Water Res.*, **29**(8), 1957-1975.
- Margesin R., Zimmerbauer A. y Schinner F. (2000) Monitoring of Bioremediation by Soil Biological Activities. *Chemosphere*, **40**, 339-346.
- Mattison R. G., Taki H. y Harayama S. (2002) The Bacterivorous Soil Flagellate *Heteromita globosa* Reduces Bacterial Clogging under Denitrifying Conditions in Sand-Filled Aquifer Columns. *Appl. Environ. Microb.*, **68**(9), 4539-4545.
- Meuleman A. F. M., van-Logtestijn R., Rijs G. B. J. y Verhoeven J. T. A. (2003) Water and Mass Budgets of a Vertical-Flow Constructed Wetland Used for Wastewater treatment. *Ecol. Eng.*, **20**, 31-44.
- Ministerio de ciencia, tecnología y medio ambiente. Agencia de medio ambiente. Centro de información, divulgación y educación ambiental. Cuba (1998). Elementos metodológicos para la introducción de prácticas de producción más limpia. Alternativas para el aprovechamiento económico de residuales. Documento de trabajo. Pp. 48. <http://www.redpml.cu/bibliotecavirtual/temasgenerales/elementosmetodologicosparalaintroduccióndepracticadep+l.pdf>

- Miranda-Ríos M. y Luna-Pabello V. M. (2001). Estado del Arte y Perspectivas de Aplicación de los Humedales Artificiales de Flujo Horizontal en México. Serie: Tratamiento Biológico de las Aguas Residuales. *Departamento de Ingeniería Química*. 1ª ed. Facultad de Química, UNAM, México, D. F. ISBN 968-36-8195-6, 145p.
- Monod J. (1949) The Growth of Bacterial Cultures. *Ann. Rev. Microbiol.*, **3**, 371-394.
- Nakhla G., Liu V. y Bassi A. (2006) Kinetic Modeling of Aerobic Biodegradation of High Oil and Grease Rendering Wastewater. *Bioresource Technol.*, **97**, 131-139.
- Nguyen L. (2001) Accumulation of Organic Matter Fractions in Gravel-Bed Constructed Wetland. *Water Sci. Technol.*, **44**(11-12), 281-287.
- NOM-001-SEMARNAT-1996. Que Establece los Límites Máximos Permisibles de Contaminantes en las Descargas de Aguas Residuales en Aguas y Bienes Nacionales. *Diario Oficial de la Federación*.
- Nuissier G., Bourgeois P., Grignon-Dobois M. G., Pardon P. y Lescure M. H. (2002) Composition of Sugarcane Waxes in Rum Factory Wastes. *Phytochemistry*, **61**, 721-726.
- Nyholm N. (1996) Biodegradability Characterization of Mixtures of Chemical Contaminants in Wastewater - The Utility of Biotests. *Water Sci. Technol.*, **33**(6), 221-229.
- OECD (1993) *Guidelines for the Testing of Chemicals. Ready biodegradability, 301 A. "DOC Die-away test"*. Published by the Organization for Economic Co- operation and Development, Paris, Francia, pp1-18.
- Olaniran A. O., Pillay D. y Pillay B. (2005) Biostimulation and Bioaugmentation Enhances Aerobic Biodegradation of Dichloroethenes. *Chemosphere*, **63**, 600-608.
- Omar M. N. A., Mostafa A. T. y Ahmed A. S. (2002) Concentrated Vinasse as a Novel Diazotrophs Growth Medium (Biovinasse Inoculant) and Soil Conditioner to Improve Bean Yield Under Dripping Irrigation System. *17 th WCSS*, Thailand. 14-21.
- Önorm B 2505. 1997 Bepflanzter Bodenfilter (Pflanzenkläranlagen) Anwendung, Gemesung, Bu and Betrieb. Viena Austria.
- Pagga U. (1997) Testing Biodegradability with Standardized Methods. *Chemosphere*, **35**(12), 2953-2972.
- Pandiyani T., Durán de Bazúa C., Ilangovan K. y Noyola A. (1999) ¹³C NMR Studies on Vinasses Effluent Treated with Iron. *Water Res.*, **33**(1), 189-195.
- Pascual J. A., García C., Hernández T., Moreno J. L. y Ros M. (2000) Soil Microbial Activity as a Biomarker of Degradation and Remediation Processes. *Soil Biol. Biochem.*, **32**, 1877-1883.
- Percherancier H., Volat B. y Montuelle B. (1996) Testing the Biodegradability of Wastewater Treatment Plant Outfalls: Role of Bacterial Inocula. *Water Sci. Technol.*, **33**(6), 221-229.
- Pérez M., Romero L. I. y Sales D. (1999) Anaerobic Thermophilic Fluidized Treatment of Industrial Wastewater: Effect of F:M Relationship. *Chemosphere*, **38**(14), 3443-3461.

-
- Pérez M., Romero L. I. y Sales D. (2001) Organic Matter Degradation Kinetics in an Anaerobic Thermophilic Fluidized Bed Bioreactor. *Anaerobe*, **7**, 25-35.
- Petruccioli M., Duarte C. J. y Federici F. (2000) High-Rate Aerobic Treatment of Winery Wastewater Using Bioreactors with Free and Immobilized Activated Sludge. *J. Biosci. Bioeng.*, **90**(4) 381-386.
- Petruccioli M., Duarte C. J., Eusebio A. y Federici F. (2002) Aerobic Treatment of Winery Wastewater Using a Jet-Loop Activated Sludge Reactor. *Process Biochem.*, **37**, 821-829.
- Pinney M. L., Westerhoff P. K. y Baker L. (2000) Transformations in Dissolved Organic Carbon Through Constructed Wetlands. *Water Res.*, **34**(6), 1897-1911.
- Quiroga J. M., Perales J. A., Romero L. I. y Sales D. (1999) Biodegradation Kinetics of Surfactants in Seawater. *Chemosphere*, **39**(11), 1957-1969.
- Ramírez-Carrillo H. F. (1998). Desarrollo de la Ingeniería Básica para el Diseño de una Planta de Tratamiento de Aguas residuales a Base de un Humedal Artificial de Flujo Horizontal. *Tesis de licenciatura (Ingeniero Químico)*. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, México.
- Reuschenbach P., Pagga U. y Strotmann U. (2003) A Critical Comparison of Respirometric Biodegradation Test Based on OECD 301 and Related Test Methods. *Water Res.*, **37**, 1571-1582.
- Rodgers M., Zhan X. M. y Gallagher B. (2003) A Pilot Plant Study Using a Vertically Moving Biofilm Process to Treat Municipal Wastewater. *Bioresource Technol.*, **89**, 139-143.
- Roy C. D. (1993) *Practical Manual of Groundwater Microbiology*. Lewis Publishers. E.E.U.U.A. 412p.
- Sangave P. C. y Pandit A. B. (2004) Ultrasound Pre-Treatment for Enhanced Biodegradability of the Distillery Wastewater. *Ultrason. Sonochem.*, **11**, 197-2003.
- Sangave P. C. y Pandit A. B. (2006) Enhancement in biodegradability of Distillery Wastewater Using Enzymatic Pretreatment. *J. Environ. Manage.*, **78**, 77-85.
- Scholz M. y Xu J. (2002a) Comparison of constructed reed beds with different filter media and macrophytes treating urban stream water contaminated with lead and copper. *Ecol. Eng.*, **18**, 385-390.
- Scholz M. y Xu J. (2002b) Performance Comparison of Experimental Constructed Wetlands with Different Filter Media and Macrophytes Treating Industrial Wastewater Contaminated with Lead and Copper. *Bioresource Technol.*, **83**, 71-79.
- Schulz C., Gelbrecht J. y Rennert B. (2003) Treatment of Rainbow Trout Farm Effluents in Constructed Wetland with Emergent Plants and Subsurface Horizontal Water Flow. *Aquaculture*, **217**, 207-221.
- Scott M. J. y Jones M. N. (2000) The Biodegradation of Surfactants in the Environment. *Biochim. Biophys. Acta.* **1508**, 235-251.
- Scow K. M. y Hicks K. A. (2005) Natural attenuation and enhanced bioremediation of organic contaminants in groundwater. *Curr. Opin. Biotech.*, **16**, 246-253.

- Segel I. H. (1975) *Enzyme Kinetics*. John Wiley and Sons. New York. E.E.U.U.A. Pp 27.
- Semmens M. J., Dahm K., Shanahan J. y Christianson A. (2003) COD and Nitrogen Removal by Biofilms Growing on Gas Permeable Membranes. *Water Res.*, **37**, 4343-4350.
- Shackle V. J., Freeman C. y Reynolds B. (2000) Carbon Supply and the Regulation of Enzyme Activity in Constructed Wetlands. *Soil Biol. Biochem.*, **32**, 1935-1940.
- Shaw J. C., Bramhill B, Wardlaw N. C. y Costerton J. W. (1985) Bacterial Fouling in a Model Core System. *Appl. Environ. Microb.*, **49**(3), 693-701.
- Simkins S. y Alexander M. (1984) Models for Mineralization Kinetics with the Variables of Substrate Concentration and Population Density. *Appl. Environ. Microb.*, **47**(6), 1299-1306.
- Simon M. A., Bonner J. S., Page C. A., Townsend R. T., Mueller D. C., Fuller C. B. y Autenrieth R. L. (2004) Evaluation of Two Commercial Bioaugmentation Products for Enhanced Removal of Petroleum from a Wetland. *Ecol. Eng.*, **22**, 263-277.
- Solera R., Romero L. I. y Sales D. (2002) The Evolution of Biomass in a Two-Phase Anaerobic Treatment Process During Start-Up. *Chem. Biochem. Eng. Q.*, **16**(1), 25-29.
- Stewart T. L. y Fogler S. (2001) Biomass Plug Development and Propagation in Porous Media. *Biotechnol. Bioeng.*, **72**(3), 353-363.
- Steyer J. P., Bouvier J. C., Conte T. Gras P. y Sousbie P. (2002) Evaluation of a Four Year Experience with a Fully Instrumented Anaerobic Digestion Process. *Water Sci. Technol.*, **45**(4-5), 495-502.
- Stottmeister U., Wießner A., Kusch P., Kappelmeyer U., Kästner M., Bederski O., Müller R. A. y Moormann H. (2003) Effects of Plants and Microorganisms in Constructed Wetlands for Wastewater Treatment. *Biotechnol. Adv.*, **22**, 93-117.
- Tanner C. C. y Skunias J. P. S. (1995) Accumulation of Organic Solids in Gravel-Bed Constructed Wetlands Treating Faro Dairy Wastewaters. *Water Res.*, **32**, 3046-3054.
- Taylor J. P., Wilson B., Mills. y Burns R. G. (2002) Comparison of Microbial Numbers and Enzymatic Activities in Surface Soils and Subsoils Using Various Techniques. *Soil Biol. Biochem.*, **34**, 387-401.
- Tenorio Z., Silveira-Carvalho O., Ferreira-da-Silva O. R. R., Gascó-Montes J. M. y Guerrero-López F. (2000) Estudio de la Actividad Biologica de dos Suelos de los Tableros Costeros del Ne de Brasil Enmendados con Residuos Agrícolas: Vinaza y Torta de Caña de Azúcar. *Rev. Bras. Engenharia Agrícola e Ambiental*, **4**(1), 70-74.
- Torrijos M. y Moletta R. (1997) Winery Wastewater Depollution by Sequencing Batch Reactor. *Water Sci. Technol.*, **35**(1), 249-257.
- Trasar-Cepeda C., Leirós C., Gil-Sotres E. y Seoane S. (1998) Towards a Biochemical Quality Index for Soils: an Expression Relating Several Biological and Biochemical Properties. *Biol. Fert. Soils*, **26**, 100-106.
- Trejo G. T. (1981) *Experimentos en Microbiología de Suelo*. Compañía Editorial Continental. S. A. de C. V. México D. F. pp 28-31.

-
- Vandevivere P. y Baveye P. (1992a) Effect o Bacterial Extracellular Polymers on the Saturated Hydraulic Conductivity of Sand Columns. *Appl. Environ. Microb.*, **58**(5), 1690-1698.
- Vandevivere P. y Baveye P. (1992b) Relationship Between Transport of Bacteria and Their Clogging Efficiency in Sand Columns. *Appl. Environ. Microb.*, **58**(8), 1690-1698.
- Vandevivere P. y Kirchman L. (1993) Attachment Stimulates Exopolysaccharide Synthesis by a Bacterium. *Appl. Environ. Microb.*, **59**(10), 3280-3286.
- Vezzulli L., Pruzzo C. y Fabiano M. (2004) Response of the Bacterial Community to in Situ Bioremediation of Organic-Rich Sediments. *Mar. Pollut. Bull.*, **49**, 740-751.
- Vlyssides A. G., Israilides C. J., Loizidou M., Karvouni G. y Mourafeti V. (1997) Electrochemical Treatment of Vinasse from Beet Molasses. *Water Sci. Technol.*, **36**(2-3), 271-278.
- Weber-Shirk M. L. y Dick R. I. (1999) Bacterivory by a Chrysophyte in Slow Sand Filters. *Water Res.*, **33**(3), 631-638.
- Wetzel R.G. (2001) Fundamental Processes within Natural and Constructed Wetland Ecosystems: Short-Term Versus Long-term Objectives. *Water Sci. Technol.*, **44**(11-12), 1-8.
- Wilkinson G. N. (1961) Statistical Estimation in Enzyme Kinetics. *Biochem. J.* **80**, 324-331.
- Zgajnar-Gotvajn A. y Zagorc-Koncan J. (1996) Comparison of Biodegradability Assessment Tests for Chemical Substances in Water. *Water Sci. Technol.*, **33**(6), 207-212.
- Zgajnar-Gotvajn A. y Zagorc-Koncan J. (1999) Biodegradation Studies as an Important Way to Estimate the Environmental Fate of Chemicals. *Water Sci. Technol.*, **39**(10-11), 375-382.
- Zhou Q. H., Wu Z. B., Cheng S. P., He F. y Fu G. P. (2005) Enzymatic Activities in Constructed Wetlands and Di-*n*-butyl Phthalate (DBP) Biodegradation. *Soil Biol. Biochem.*, **37**, 1454-1459.

8. ANEXOS

A-1) TÉCNICAS ANALÍTICAS

I DETERMINACIÓN DE DQO

MÉTODO DE REFLUJO CERRADO COLORIMÉTRICO

DISCUSIÓN GENERAL

La DQO determina la cantidad de oxígeno necesario para oxidar la materia orgánica presente en una muestra. Cuando la materia orgánica es oxidada (por el ión dicromato), el cromo cambia del estado hexavalente (VI) al estado trivalente (III). Ambas especies del cromo tienen coloración y absorben en la región visible del espectro, por ejemplo, el ión dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) absorbe fuertemente en la región de 400 nm, aquí la absorción del ión cromato (Cr^{3+}) es mucho menor, mientras que en la región de 600 nm, el ión cromato absorbe fuertemente y la absorción del dicromato es cercana a cero. En una solución 9M de ácido sulfúrico el coeficiente de extinción molar aproximado es como sigue: Cr^{3+} - $50 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 604 nm; $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ - $380 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

APARATOS

- Horno con capacidad para alcanzar 150°C .
- Espectrofotómetro, para uso a 600 nm y/o 420 nm.

REACTIVOS

- Solución de digestión de alto rango, adicionar a aproximadamente 500 mL de agua destilada 10.216 g de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, grado estándar primario, previamente secado a 150°C por 2 h, 167 mL de H_2SO_4 y 33.3 g de HgSO_4 disolver de frío a temperatura ambiente y diluir a 1000 mL.
- Solución de digestión de bajo rango, preparar como la de alto rango pero usando únicamente 1.022 g de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$.
- Reactivo de ácido sulfúrico, agregar Ag_2SO_4 grado reactivo o técnico, cristales o polvo, a H_2SO_4 concentrado a razón de 5.5 g de Ag_2SO_4 por kg de H_2SO_4 , dejar reposar de 1 a 2 días para disolver, posteriormente mezclar.
- Estándar de biftalato de potasio (KHP) $\text{HOCC}_6\text{H}_4\text{COOK}$: ligeramente triturar y secar a peso constante a 110°C . Disolver 425 mg en agua destilada y diluir a 1 L. El KHP tiene un contenido teórico de $1.176 \text{ mg O}_2 \text{ mg}^{-1}$ de DQO y esta solución tiene un valor teórico de $500 \mu\text{g O}_2 \text{ mL}^{-1}$. Esta solución es estable cuando es refrigerada, pero no indefinidamente. Se debe tomar precaución de que no haya crecimiento microbiológico, si resulta práctico se puede esterilizar la muestra.

PROCEDIMIENTO

Tratamiento de la muestra: medir un volumen conveniente de la muestra añadir los reactivos dentro del tubo de reacción o ampollita como se indica en la Tabla 8-1.

Tabla 8-1. Cantidades de muestras y reactivos para tubos de digestión de dos tamaños.

<i>Tubo de digestión</i>	<i>Muestra (mL)</i>	<i>Solución de digestión (mL)</i>	<i>Reactivo de ácido sulfúrico (mL)</i>	<i>Volumen final total (mL)</i>
16 x 100 mm	2.5	1.5	3.5	7.5
20 x 150 mm	5.0	3.0	7.0	15.0

Lavar los tubos de ensaye y tapas con 20% H₂SO₄ antes del primer uso para prevenir contaminación. Hacer medidas volumétricas par mayor exactitud. Los volúmenes críticos son los de las muestras y de la solución de digestión. Coloque la muestra en el tubo de ensaye o ampollita y añada la solución de digestión. Cuidadosamente deslice el reactivo de ácido sulfúrico dentro del envase de tal manera que se forme una capa de ácido bajo la capa de la muestra-solución de digestión. Cierre herméticamente los tubos o ampollitas e invierta cada uno muchas veces para mezclar completamente.

Coloque los tubos en un digestor precalentado a 150°C y con reflujo por 2 h, enfríe a temperatura ambiente y coloque los tubos en una gradilla. Algo de sulfato de mercurio puede precipitar pero este no afecta el análisis. Es crítico que el volumen de cada componente sea conocido y que el total volumen sea el mismo para cada reacción.

Medida de la reducción del dicromato. Enfríe la muestra a temperatura ambiente lentamente para permitir la formación del precipitado. Una vez que las muestras han sido enfriadas y ventiladas, de ser necesario para liberar la presión generada durante la digestión. Mezcle el contenido de los tubos de reacción para combinar el agua condensada y disgregar la materia insoluble. Permita la suspensión de la materia y asegúrese de que el paso óptico este claro. Mida la absorción de cada muestra blanco y de los estándares a la longitud de onda seleccionada (420 ó 600 nm). A 600 nm, use una muestra no digerida como blanco, analice una muestra blanco digerida para confirmar la calidad de los reactivos analíticos y ara determinar el blanco de DQO, reste el blanco de DQO a la muestra analizada. Alternativamente use el blanco digerido como solución de referencia, una vez que se establece que el blanco tiene baja DQO.

A 420 nm use agua destilada como solución de referencia. Mida todas las muestras, el blanco y las muestras estándar, la medida de absorción de un blanco no digerido conteniendo dicromato con agua destilada puede dar el valor inicial de absorción del dicromato. Algunas muestras digeridas, el blanco o las soluciones estándar, que tengan DQO, el valor de absorbancia disminuirá debido al decremento del ión dicromato. Analice un blanco digerido únicamente con agua destilada para asegurar la calidad de los reactivos y para determinar la contribución de los reactivos al decremento de la absorbancia durante una digestión dada. La diferencia entre las absorbancias de una muestra digerida y el blanco digerido es la cantidad de DQO. Cuando las soluciones estándar se corren, grafique las diferencias de absorbancia de un blanco digerido y la absorbancia de las muestras estándar contra los valores de DQO de cada estándar.

Preparación de la curva de calibración. Prepare por lo menos cinco soluciones estándar de la solución de KHP con equivalentes de DQO para cubrir cada rango de concentración. Use agua destilada para llevar las soluciones a un mismo volumen y proceda a la digestión. Prepare la curva de calibración para cada nuevo lote de tubos o ampolletas o cuando la solución estándar sea preparada, las curvas deben ser lineares, sin embargo, alguna irregularidad puede ocurrir dependiendo de los instrumentos usados y de la exactitud necesaria.

CÁLCULOS

Si las muestras, los estándares y los blancos son corridos bajo las mismas condiciones de volumen y paso óptico, calcule la cantidad de DQO como sigue:

$$DQO \text{ como } mg O_2 L^{-1} = \frac{mg O_2 \text{ en el volumen final} \times 1000}{mL \text{ de muestra}}$$

Preferentemente analice muestras por duplicado debido a la poca cantidad de muestra. Las muestras que no son homogéneas pueden requerir de múltiples determinaciones para mejorar la exactitud del análisis. Las muestras no deben diferir del promedio en más de $\pm 5\%$.

II DETERMINACIÓN DE DBO₅

DISCUSIÓN GENERAL

Este método mide el oxígeno molecular utilizado durante un periodo de incubación especificado, para la degradación bioquímica de material orgánico y el oxígeno usado para oxidar material inorgánico. Esta prueba mide el oxígeno consumido durante el periodo de incubación de 5 días.

APARATOS

- a) Envases de incubación: usar envases de vidrio con 300 mL de capacidad con tapón esmerilado y una boca acampanada. Lavar los envases con un detergente, enjuagar lo suficiente con agua destilada y secar antes de usarse. Como precaución para evitar la entrada de aire dentro de la solución dentro del envase durante la incubación use un sello de agua. Se obtiene un sello conveniente si los envases son invertidos en un baño de agua o añadiendo agua a la boca acampanada de los envases especiales para DBO, colocar un papel o un sello plástico en la boca del envase para reducir la evaporación del sello de agua durante la incubación.
- b) Incubadora de aire o baño maría, controlado por un termostato a $20 \pm 1^\circ\text{C}$, evite la entrada de luz para prevenir la producción de O₂ por fotosíntesis.

REACTIVOS

- a) Solución buffer de fosfatos: disolver 8.5 g de KH₂PO₄, 21.75 g K₂HPO₄, 33.4 g de Na₂HPO₄ y 1.7 g de NH₄Cl en aproximadamente 500 mL de agua destilada y posteriormente diluir a 1 L. El pH deberá estar en 7.2 sin ajustes. Por otro lado, disuelva 42.5 g de KH₂PO₄ ó 54.3 g de K₂HPO₄ en aproximadamente 700 mL de agua destilada, ajuste el pH a 7.2 con NaOH al 30% y afore a 1L.
- b) Solución de sulfato de manganeso, disolver 27.5 g de MgSO₄·7H₂O en agua destilada y diluya a 1 L.
- c) Solución de cloruro de calcio, disolver 27.5 g de CaCl₂ en agua destilada y aforar a 1 L.
- d) Solución de cloruro férrico, disolver 0.25 g de FeCl₃·6H₂O en agua destilada y aforar a 1 L.
- e) Soluciones ácidas y alcalinas. 1) ácida: lentamente y con agitación agregue 28 mL de ácido sulfúrico concentrado a un contenedor con agua destilada, posteriormente afore a 1 L; 2) alcalina: disuelva 40 g de hidróxido de sodio en agua destilada y afore a 1 L.
- f) Solución de sulfito de sodio, disolver 1.575 g de Na₂SO₃ en 1 L de agua destilada. Esta es una solución no estable por lo que se debe preparar diariamente.
- g) Inhibidor de nitrificación: 2-cloro-6-(triclorometil) piridina.
- h) Solución de glucosa-ácido glutámico, seque la glucosa grado reactivo y el ácido glutámico grado reactivo a 103°C por 1 h, disuelva 150 mg de glucosa y 150 mg de ácido glutámico en agua destilada y afore a 1 L, ésta solución debe prepararse en fresco antes de usarse.
- i) Solución de cloruro de amonio, disuelva 1.15 g de NH₄Cl en aproximadamente 500 mL de agua destilada, ajuste el pH a 7.2 con la solución de sosa y afore a 1 L, ésta solución tiene un contenido de 0.3 mg de N por mL.

PROCEDIMIENTO

- a) *Preparación del agua de dilución.* Coloque el volumen de agua deseado en un vaso de precipitados y añada 1 mL de cada una de las siguientes soluciones: amortiguador de fosfatos, $MgSO_4$, $CaCl$ y $FeCl_3$, aforar a 1 L. Antes de usar el agua de dilución se debe atemperar a $20 \pm 3^\circ C$, llevar a saturación de oxígeno disuelto por agitación o por aireación con un filtro de aire libre de materia orgánica. De manera alterna, los envases se deben almacenar con un tapón de algodón para asegurar que se mantenga la saturación de O_2 , además todo el material que se use debe estar limpio.
- b) *Verificación de la solución ácido glutámico-glucosa.* Debido a que la prueba de DBO es un bioensayo sus resultados pueden ser influenciados por la presencia de agentes tóxicos o por el uso de una fuente pobre de inóculo, por lo que se debe verificar periódicamente la calidad del agua de dilución, la fuente de inóculo y las técnicas analíticas, realizando medidas de DBO con la solución de ácido glutámico-glucosa.
- c) *Inoculación.* 1) Fuente de inóculo. Es necesario tener una población de microorganismos capaz de oxidar la materia orgánica biodegradable en la muestra. Una fuente preferida de inóculo es un efluente de un sistema de tratamiento biológico de aguas residuales, también se puede desarrollar un inóculo adaptado en el laboratorio aireando una muestra de aguas residuales a la que se le va añadiendo diariamente una muestra del agua residual a analizar. 2) Control del inóculo. Determine el valor de DBO del material de inóculo, así como de cualquier otra muestra, este es el valor del control de inóculo. Del valor de control del inóculo y del valor conocido del material de dilución del inóculo, determine la toma de OD del inóculo.
- d) *Determinación del OD inicial.* Si la muestra contiene material que reacciona rápidamente con el OD, determinar el OD inmediatamente después de llenar los frascos. Si la toma de OD inicial es insignificante, el periodo de tiempo para la medición del OD, a partir de la preparación de la muestra, no debe exceder de 30 minutos.
- e) *Blanco del agua de dilución.* Usar un blanco del agua de dilución para verificar su calidad sin la adición de inóculo, así como para verificar la limpieza de los frascos. Determinar el OD inicial y final, la diferencia no debe exceder de 0.2 mg L^{-1} .
- f) *Incubación.* Incubar los frascos a $20^\circ C$, en oscuridad.
- g) *Determinación del OD final.* Después de 5 días de incubación determinar el OD en todas las muestras.

CÁLCULOS

Para cada frasco de prueba es preferible medir una disminución de 2.0 mg L^{-1} de OD y una cantidad residual de 1.0 mg L^{-1} de OD. La cantidad de DBO_5 se calcula de la siguiente manera.

$$DBO_5 \left(\text{mg L}^{-1} \right) = \frac{(D_1 - D_2) - (B_1 - B_2)}{P}$$

Donde D_1 = OD de la muestra diluida inmediatamente después de la preparación; D_2 = OD de la muestra después de los 5 días de incubación; P = fracción decimal del volumen de la muestra usado; B_1 = OD del control de inóculo antes de la incubación; B_2 = OD del control del inóculo después del periodo de incubación.

III AISLAMIENTO Y CUENTA DE GRUPOS BACTERIANOS

PREPARACIÓN Y ESTERILIZACIÓN DEL MATERIAL

1. Lavar todo el material de vidrio con detergente, 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 en estufa o a temperatura ambiente.
3. Esterilizar el material de vidrio en horno a temperatura de 170-180°C durante 1 a 2 horas.
4. Las puntas de plástico para micropipetas se esterilizan envueltas en papel kraftín en autoclave a 115°C durante 15 minutos.

SOLUCIÓN SALINA ISOTÓNICA

En un matraz Erlenmeyer, agregar la cantidad de cloruro necesario para tener una solución al 0.8%, distribuir 9 mL de ésta solución en tubos y taponarlos con una torunda de algodón y esterilizar en autoclave a 115°C durante 15 minutos.

PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

Agar nutritivo o gelosa (Mesófilos Aerobios)

Rehidratar 23 g del agar bacteriológico en 1 L de agua destilada. Calentar hasta disolución total. Esterilizar en autoclave a 115°C durante 15 minutos.

Agar almidón (amilolíticos)

Peptona de carne	5.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
K ₂ HPO ₄	5.0 g
Almidón soluble	3.0 g
Agar bacteriológico	15.0 g

En 300 mL de agua solubilizar el almidón calentando y agitando; solubilizar los otros ingredientes en los 700 mL de agua 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 Petri.

Agar leche descremada (proteolíticos)

Solución "A"

Dextrosa	10.0 g
Agar bacteriológico	15.0 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”, homogeneizar y dejar enfriar aproximadamente a 45°C y vaciar de 15 a 20 ml de medio en cajas Petri.

Medio Mínimo (Sacarolíticos)

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	15.0 g
---------------------	--------

Disolver en 500 mL de agua destilada y fundir

Solución 3

Sacarosa

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). Homogeneizar y dejar enfriar aproximadamente a 45°C y vaciar de 15 a 20 ml de medio en cajas Petri.

Agar celulosa (celulolíticos)

Agar	15.0 g
Celulosa microcristalina	10.0 g

Disolver por calentamiento en 1 L de agua, esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Homogeneizar y dejar enfriar aproximadamente a 45°C y vaciar de 15 a 20 ml de medio en cajas Petri.

Agar para bacterias lipolíticas

Peptona	10.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Cloruro de calcio	0.1 g
Agar bacteriológico	16.0 g
Polisorbato 80	10 mL

Disolver por calentamiento en 1 L de agua, esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Homogeneizar y dejar enfriar aproximadamente a 45°C y vaciar de 15 a 20 ml de medio en cajas Petri.

APARATOS

- a) Incubadora con capacidad para alcanzar 37°C.
- b) Cuenta colonias.

PROCEDIMIENTO

Al desarrollar las técnicas en superficie para el recuento de microorganismos, debe ponerse especial atención 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, lo que permite una definición clara de las colonias.

Preparación de las diluciones

1. En condiciones de asepsia, colocar cada uno de los tubos que contienen 9.0 mL exactos del diluyente (solución isotónica) en una gradilla e identificarlos con la dilución correspondiente.
2. Mezclar la muestra mediante agitación energética.
3. En condiciones de asepsia, introducir la punta de la micropipeta a 2.5 cm de profundidad, tomar 1 mL y transferirlo al primer tubo con 9 mL del diluyente (dilución 1:10), teniendo cuidado de colocar la punta 1 cm arriba de la superficie del líquido y vaciar por completo el líquido.
4. Tapar el tubo y agitar vigorosamente.
5. Introducir la micropipeta con una nueva punta estéril, tomar 1 mL y transferirlo al siguiente tubo de dilución (1:100). Repetir este procedimiento para preparar las siguientes diluciones, transfiriendo en cada ocasión 1 mL de muestra de la dilución anterior al siguiente tubo que contiene 9 mL del diluyente.
6. Con una punta limpia y estéril, mezclar y tomar 0.2 mL de la dilución y colocarlo en el centro de la placa con el medio correspondiente.
7. En condiciones de asepsia, con un asa estéril, extender la gota sobre toda la superficie del medio.
8. Repetir los pasos 6 y 7 para inocular las cajas con los medios y diluciones de interés.
9. Invertir la caja e incubar a 35° C durante 24 y 48 horas.
10. Después de la incubación, observar el efecto de la dilución. Seleccionar las placas que muestren una cantidad aproximada de 30 a 300 colonias.
11. Colocar la caja con la tapa hacia abajo y la base hacia arriba, en el cuanta colonias, contar las colonias y marcarlas con un plumón.
12. Calcular el número de microorganismos por mL de muestra con la siguiente fórmula.

$$UFC\ mL^{-1} = \text{promedio de las colonias contadas} \times 10 \times \text{recíproco de la dilución}$$

El resultado se expresa como Unidades Formadoras de Colonias (UFC).

IV CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES DE EMPAQUE

Respecto al origen de los materiales de empaque, los lotes de escoria volcánica roja y gravilla blanca, ambos materiales típicos de construcción en la parte centro de México, se obtuvieron de una casa de materiales ubicada en el sur de la Ciudad de México. Estos materiales se consideraron de acuerdo a resultados obtenidos por Ramírez-Carrillo (1998). La escoria volcánica roja posee una alta capacidad de retención de materia orgánica y porosidad, lo que proporciona mayor superficie para el desarrollo microbiano, además es un material barato y de fácil obtención, por otro lado la gravilla blanca, debido a su dureza mantiene las condiciones de conductividad hidráulica en los BE.

Dichos materiales se molieron en un molino de bolas, adecuado para uso con rocas. Posteriormente se tamizaron a través de mallas de 4 y 2 mm², seleccionando las rocas que quedaron entre ambas mallas. Las rocas así seleccionadas, se lavaron con agua corriente hasta que no se observaron impurezas ni coloración en el agua de desecho y se dejaron secar a temperatura ambiente.

ÁREA APARENTE

Se tomaron muestras representativas de un gramo, de cada tipo de rocas tamizadas, éstas se esparcieron en una hoja blanca y se fotografiaron con una cámara digital Motic®. Esta cámara cuenta con un soporte para que las fotos sean tomadas a la misma distancia y un Software Motic Image Plus 2.0. Este software permite hacer el análisis de las imágenes planas y es posible obtener el área de una o varias imágenes específicas. Para ello es necesario realizar una calibración tomando la fotografía de un círculo con dimensiones conocidas. Posteriormente, en el Software Motic Image Plus 2.0 se selecciona, del menú **Medir**, *Guía de calibración* y “Calibrar con escala en cruz”, se da clic en el botón *Cargar imagen*, se selecciona la imagen del círculo y el tipo de objetivo con el que fue capturada la imagen, se agregan las dimensiones de ancho y alto de la circunferencia. Posteriormente se da clic en el botón *Calibración*, se le da un nombre al tipo de calibración y clic en el botón *Guardar*.

Para la medición del área de las rocas se abren las imágenes capturadas con el programa Motic Image Plus 2.0, en la parte inferior de la ventana aparecen varias opciones y se selecciona **Medir** y del lado izquierdo del botón *Precisión* se selecciona el nombre de la calibración guardada. También se pueden seleccionar las unidades en las que se desea que aparezcan las mediciones. Para la medición del área se selecciona *Auto-segmentar* del menú **Medir** y posteriormente *Auto-calcular*, los datos se pueden exportar a una hoja de Excel dando clic en el botón *Exportar* en el recuadro de “Resultado de Auto-cálculo”, para su posterior análisis. Cada medición se realizó por triplicado para cada uno de los materiales de empaque.

DENSIDAD APARENTE, REAL Y POROSIDAD

La densidad aparente (DA) y real (DR), de los materiales de empaque, se evaluó de acuerdo con la técnica establecida en literatura especializada para suelos (Trejo, 1981). Para la determinación de la DA, de cada uno de los materiales de empaque, a una probeta de 100 mL se le adicionó material hasta obtener el volumen de 100 mL, la probeta se pesó sin y con material. La DA se calculó de acuerdo con la Ecuación 8-1.

$$DA = \frac{mP - mPS}{100mL} \quad \text{Ecuación 8-1.}$$

Donde: mP = peso de la probeta más el peso del material en gramos; mPS = peso de la probeta sin material en gramos.

En cuanto al parámetro de DR, se determinó pesando 10 g, de cada uno de los materiales de empaque, en un matraz aforado de 100 mL. Posteriormente, se agregó agua hasta llegar a los 100 mL de aforo. El matraz aforado se pesó solo y con el material más el agua, la determinación de la DR se hizo de acuerdo con la Ecuación 8-2 y la porosidad se calculó mediante la Ecuación 8-3.

$$DR = \frac{mM}{100 - \frac{mA}{0.999}} \quad \text{Ecuación 8-2.}$$

Donde: mM = masa de la muestra en gramos; 100 = volumen del matraz en mL; mA = masa del agua agregada al matraz con material; 0.999 = densidad del agua.

$$\% \text{ de Porosidad} = 100 \left(1 - \frac{DA}{DR} \right) \quad \text{Ecuación 8-3.}$$

PERFIL DE VELOCIDAD DE INFILTRACIÓN DE AGUA EN LAS COLUMNAS

Una vez que se determinaron los parámetros arriba mencionados, debido a que estos influyen en la velocidad de infiltración del líquido y el tiempo de retención hidráulico, se procedió a determinar el perfil de velocidad de infiltración. Para ello se pesó la cantidad, en gramos, de cada uno de los materiales de empaque, necesarios para tener un área superficial de 2 500 cm², de acuerdo al área obtenida por gramo de material (Tabla 8-10, pág 91). La cantidad correspondiente de cada material se colocó en las columnas diferentes. A cada columna con el material de empaque se le adicionó 600 mL de agua, la cual se dejó fluir y se tomó el tiempo cada 100 mL hasta obtener los 600 mL. El perfil de velocidad de infiltración se obtuvo de graficar los mililitros de agua filtrada, en función del tiempo de flujo requerido para obtener el volumen de agua cada 100 mL (Fenoglio-Limón, *et al.* 2000).

CAPACIDAD DEL MATERIAL DE EMPAQUE PARA ADSORBER LA MATERIA ORGÁNICA DE LAS VINAZAS

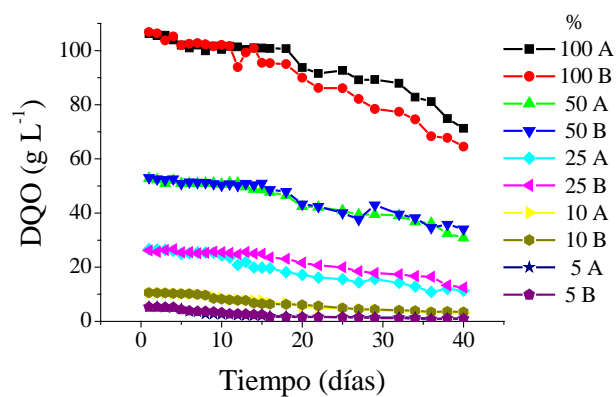
Se determinó la capacidad de adsorción de materia orgánica, para 10 g del material de empaque, mediante el paso de vinazas a una concentración de 1 g L⁻¹ de DQO, por las columnas con el material. Adicionando 100 mL de vinazas en dosis de 5 mL y colectando la muestra para su posterior análisis de DQO.

A-2) RESULTADOS EXPERIMENTALES DE SOPORTE

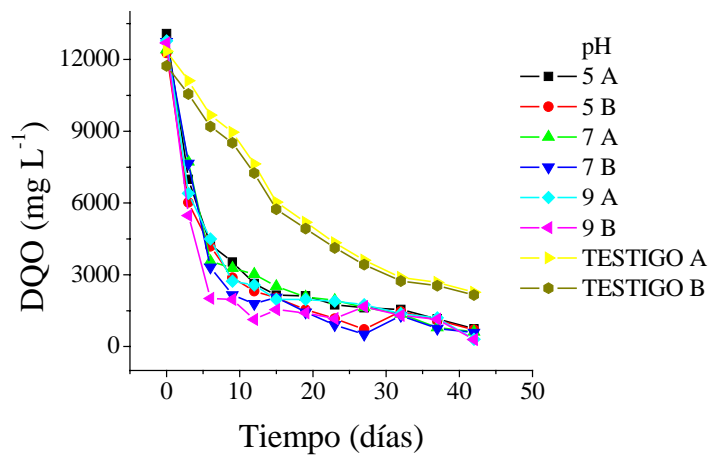
I REPRODUCIBILIDAD DE LOS RESULTADOS

PRUEBAS DE BIODEGRADACIÓN A DIFERENTES CONCENTRACIONES

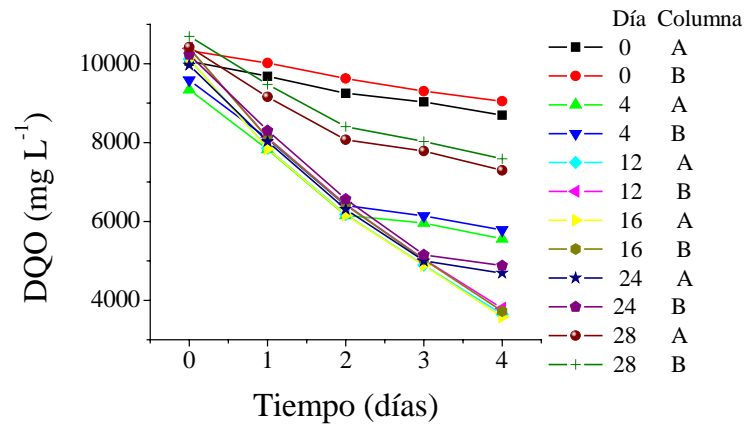
Sin lodos activados



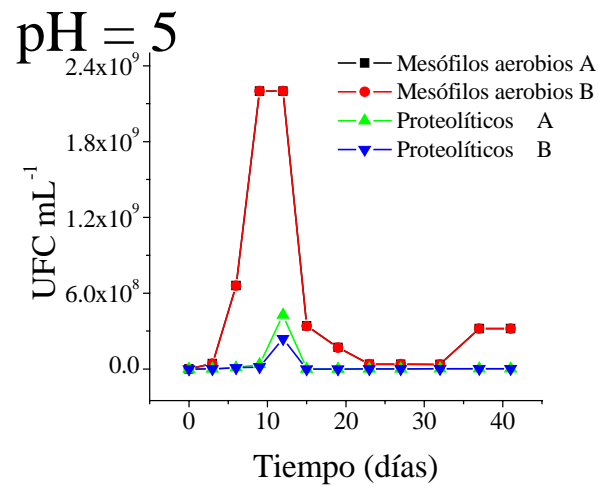
PRUEBAS DE BIODEGRADACIÓN A DIFERENTES VALORES DE pH



PRUEBAS DE BIODEGRADACIÓN A DIFERENTES VALORES DE pH



CUENTA EN PLACA DEL CRECIMIENTO BACTERIANO



MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

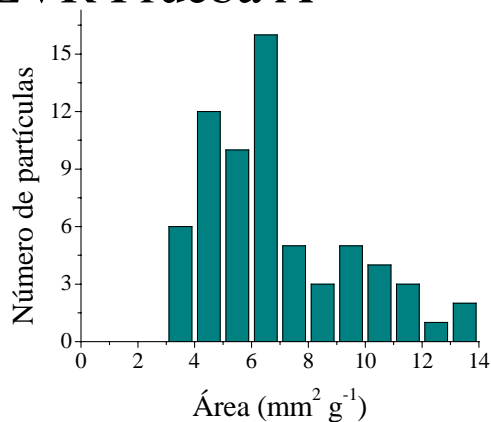
En la Tabla 8-2 se encuentran los valores de la medición de la actividad de la fosfatasa alcalina en el proceso de biodegradación aerobia de las vinazas en los bioensayos a valores constantes de pH, con el error respectivo, para todos los casos el error no fue más de 0.7 unidades.

Tabla 8-2. Valores de la medición de la actividad de la fosfatasa alcalina durante el proceso de biodegradación de las vinazas, en los bioensayos a valores de pH constante de 5, 7 y 9 y el testigo

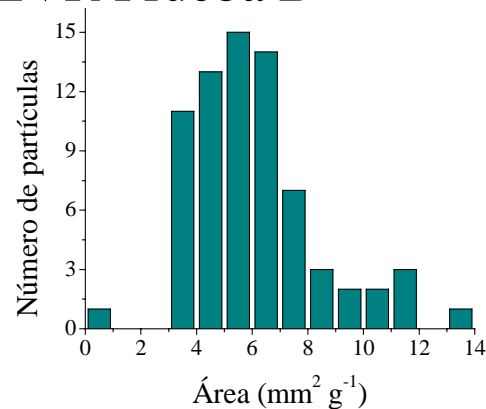
<i>Tiempo (días)</i>	<i>pH 5</i>	<i>pH 7</i>	<i>pH 9</i>	<i>control</i>
0	3.0 ± 0.0	2.5 ± 0.7	2.5 ± 0.7	2.0 ± 0.0
3	5.0 ± 0.0	5.0 ± 0.0	5.0 ± 0.0	4.5 ± 0.7
6	5.0 ± 0.0	5.0 ± 0.0	5.0 ± 0.0	2.5 ± 0.7
9	5.0 ± 0.0	5.0 ± 0.0	5.0 ± 0.0	2.0 ± 0.0
12	3.0 ± 0.0	4.0 ± 0.0	4.5 ± 0.7	2.5 ± 0.7
15	5.0 ± 0.0	5.0 ± 0.0	5.0 ± 0.0	3.0 ± 0.0
19	5.0 ± 0.0	5.0 ± 0.0	5.0 ± 0.0	3.0 ± 0.0
23	4.0 ± 0.0	3.0 ± 0.0	4.0 ± 0.0	3.0 ± 0.0
27	4.0 ± 0.0	3.5 ± 0.7	4.0 ± 0.7	3.5 ± 0.7
32	4.0 ± 0.0	3.5 ± 0.7	3.0 ± 0.0	3.5 ± 0.7
37	4.0 ± 0.0	3.5 ± 0.7	3.0 ± 0.0	3.5 ± 0.7
41	4.0 ± 0.0	2.5 ± 0.7	2.5 ± 0.7	2.0 ± 0.7

DISTRIBUCIÓN DEL ÁERA DEL MATERIAL DE EMPAQUE

EVR Prueba A



EVR Prueba B



II RESULTADOS DE LA MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN LOS BIOENSAYOS A VALORES DE pH CONSTANTE (5, 7 Y 9)

Tabla 8-3. Distribución y abundancia de la AE durante el proceso de biodegradación en el bioensayo a valor constante de pH 5.

<i>Enzima</i>	<i>Tiempo (días)</i>											
	0	3	6	9	12	15	19	23	27	32	37	41
Fosfatasa alcalina	3.0	5.0	5.0	5.0	3.0	5.0	5.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
Fosfatasa ácida	1.5	4.0	5.0	4.0	5.0	5.0	5.0	4.0	4.0	3.5	4.0	4.0
Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa	3.0	5.0	5.0	4.0	5.0	5.0	5.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
Estearasa (C4)	2.5	4.0	3.5	2.5	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	2.0	2.0	2.0
Estearasa Lipasa (C8)	2.5	4.0	4.0	4.0	2.0	2.0	2.0	2.5	2.0	2.0	2.5	2.0
Lipasa (C 14)	0.0	1.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	2.0	2.0	0.0	0.0	0.0
Leucina arilamidasa	1.0	1.5	2.0	2.0	2.0	3.0	3.0	4.0	3.0	3.0	3.5	3.0
Valina arilamidasa	1.0	1.0	0.0	0.0	2.0	0.0	0.0	2.5	2.0	2.0	1.0	1.0
Cistina arilamidasa	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Tripsina	2.0	1.0	1.0	1.0	0.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0
α -quimiotripsina	2.0	1.0	1.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
α -galactosidasa	0.0	1.0	1.5	1.5	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0
β -galactosidasa	1.0	3.0	1.0	1.0	2.0	3.0	3.0	3.5	4.0	1.5	1.5	1.0
β -glucuronidasa	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
α -glucosidasa	1.0	3.0	1.5	1.5	2.0	4.0	4.0	3.5	3.5	1.5	1.5	1.0
β -glucosidasa	1.0	2.0	1.5	1.5	2.0	3.0	3.0	3.5	4.0	2.0	2.5	2.0
N-acetil-b-glucosaminidasas	1.0	2.0	1.5	1.5	2.0	3.0	3.0	3.0	3.0	2.0	2.5	2.0
α -manosidasas	1.0	0.0	0.0	0.0	1.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
α -fucosidasa	0.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0
% de remoción de DQO	0.0	46.5	67.4	73.0	79.8	83.6	83.8	86.7	87.6	88.2	91.2	94.3

Tabla 8-4. Distribución y abundancia de la AE durante el proceso de biodegradación en el bioensayo a valor constante de pH 7.

<i>Enzima</i>	<i>Tiempo (días)</i>											
	0	3	6	9	12	15	19	23	27	32	37	41
Fosfatasa alcalina	2.5	5.0	5.0	5.0	4.0	5.0	5.0	3.0	3.5	3.5	3.5	2.5
Fosfatasa ácida	2.5	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	4.0	4.0	4.0	3.5	4.0
Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa	3.0	5.0	5.0	4.0	5.0	5.0	5.0	4.0	4.0	4.0	3.5	4.0
Estearasa (C4)	3.0	4.5	4.0	4.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.5	2.5	2.0	1.0
Estearasa Lipasa (C8)	2.5	4.5	4.5	4.5	2.0	2.0	2.0	2.0	3.0	2.0	2.0	1.5
Lipasa (C 14)	0.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.0	0.0	1.0	2.0	0.0	0.0	0.0
Leucina arilamidasa	1.5	3.0	3.0	3.0	2.0	2.5	2.5	4.0	3.5	3.0	3.5	4.0
Valina arilamidasa	1.5	1.0	1.0	1.0	1.0	0.0	0.0	2.0	1.5	0.0	1.0	2.0
Cistina arilamidasa	1.5	1.0	1.0	1.0	2.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Tripsina	2.0	3.0	3.0	3.0	1.0	1.0	1.0	0.5	1.0	0.0	0.0	0.0
α -quimiotripsina	2.0	3.0	3.0	2.5	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
α -galactosidasa	0.0	1.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0
β -galactosidasa	1.5	3.0	3.0	3.0	1.0	0.5	0.5	1.0	2.0	0.0	1.0	1.0
β -glucuronidasa	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
α -glucosidasa	1.0	3.0	3.0	3.0	1.0	1.0	1.0	2.0	2.0	0.5	1.0	0.5
β -glucosidasa	2.0	2.0	2.0	2.0	1.0	3.0	3.0	2.0	3.5	1.0	1.0	3.0
N-acetil-b-glucosaminidasas	1.5	2.5	2.5	2.5	1.0	1.5	1.5	1.5	2.5	1.0	1.0	2.0
α -manosidasas	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
α -fucosidasa	0.0	1.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
% de remoción de DQO	0.0	37.8	71.3	73.6	75.7	79.7	83.3	84.5	86.8	89.0	93.6	95.0

Tabla 8-5. Distribución y abundancia de la AE durante el proceso de biodegradación en el bioensayo a valor constante de pH 9.

<i>Enzima</i>	<i>Tiempo (días)</i>											
	0	3	6	9	12	15	19	23	27	32	37	41
Fosfatasa alcalina	2.5	5.0	5.0	5.0	4.5	5.0	5.0	4.0	4.0	3.0	3.0	2.5
Fosfatasa ácida	2.0	4.0	4.0	3.5	2.0	5.0	5.0	3.5	4.0	3.0	3.0	3.0
Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa	3.5	5.0	5.0	4.0	2.0	5.0	5.0	4.0	4.0	4.0	3.0	3.0
Estearasa (C4)	2.5	4.0	4.0	4.0	2.5	1.0	1.0	1.0	0.5	2.0	3.0	1.0
Estearasa Lipasa (C8)	2.0	4.0	4.0	4.0	2.0	2.0	2.0	2.0	1.5	2.0	2.0	1.5
Lipasa (C 14)	0.0	1.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Leucina arilamidasa	1.0	3.0	3.0	3.0	1.0	3.0	3.0	3.0	4.0	3.0	2.5	3.5
Valina arilamidasa	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.5	2.0	0.5	1.0	0.5
Cistina arilamidasa	1.0	1.0	2.0	2.0	1.0	1.5	1.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Tripsina	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	1.5	1.5	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0
α -quimiotripsina	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
α -galactosidasa	0.0	1.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
β -galactosidasa	1.0	3.0	3.0	3.0	1.0	1.0	1.0	1.0	2.0	0.0	0.0	1.0
β -glucuronidasa	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
α -glucosidasa	1.0	3.0	3.0	3.0	1.0	1.0	1.0	1.0	2.0	0.0	1.0	0.5
β -glucosidasa	1.0	2.0	2.0	2.0	1.0	3.0	3.0	1.5	2.0	1.0	0.0	1.0
N-acetil-b-glucosaminidasas	1.0	2.0	2.0	2.0	1.0	2.0	2.0	1.5	2.0	1.0	0.0	1.0
α -manosidasas	1.0	0.0	0.0	0.0	1.0	2.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
α -fucosidasa	0.0	1.0	1.0	1.0	0.0	2.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
% de remoción de DQO	0.0	49.9	64.8	78.6	79.9	84.6	84.6	85.2	86.3	89.2	90.6	97.6

Tabla 8-6. Distribución y abundancia de la AE durante el proceso de biodegradación en el bioensayo testigo.

<i>Enzima</i>	<i>Tiempo (días)</i>											
	0	3	6	9	12	15	19	23	27	32	37	41
Fosfatasa alcalina	2.5	5.0	5.0	5.0	4.0	5.0	5.0	3.0	3.5	3.5	3.5	2.0
Fosfatasa ácida	2.5	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	4.0	4.0	3.0	3.0	2.0
Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa	3.0	5.0	5.0	4.0	5.0	5.0	5.0	4.0	4.0	3.0	3.0	2.0
Estearasa (C4)	3.0	4.5	4.0	4.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.5	2.0	2.0	2.0
Estearasa Lipasa (C8)	2.5	4.5	4.5	4.5	2.0	2.0	2.0	2.0	3.0	1.5	2.0	2.5
Lipasa (C 14)	0.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.0	0.0	1.0	2.0	0.0	0.0	0.0
Leucina arilamidasa	1.5	3.0	3.0	3.0	2.0	2.5	2.5	4.0	3.5	2.0	2.0	2.0
Valina arilamidasa	1.5	1.0	1.0	1.0	1.0	0.0	0.0	2.0	1.5	1.0	1.0	1.5
Cistina arilamidasa	1.5	1.0	1.0	1.0	2.0	1.0	1.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0
Tripsina	2.0	3.0	3.0	3.0	1.0	1.0	1.0	0.5	1.0	0.0	0.0	0.0
α -quimiotripsina	2.0	3.0	3.0	2.5	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
α -galactosidasa	0.0	1.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0
β -galactosidasa	1.5	3.0	3.0	3.0	1.0	0.5	0.5	1.0	2.0	0.0	0.0	0.0
β -glucuronidasa	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
α -glucosidasa	1.0	3.0	3.0	3.0	1.0	1.0	1.0	2.0	2.0	1.0	1.0	0.0
β -glucosidasa	2.0	2.0	2.0	2.0	1.0	3.0	3.0	2.0	3.5	0.5	0.0	0.0
N-acetil-b-glucosaminidasas	1.5	2.5	2.5	2.5	1.0	1.5	1.5	1.5	2.5	1.0	1.0	1.0
α -manosidasas	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	1.0	0.0	0.0	1.5	0.5	0.0
α -fucosidasa	0.0	1.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0
% de remoción de DQO	0.0	10.0	21.6	27.4	38.2	51.1	58.0	64.9	70.8	76.6	78.3	81.6

III RESULTADOS DE LA MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN LOS BIOFILTROS EXPERIMENTALES

Tabla 8-7. Distribución y abundancia de la AE, durante el proceso depurativo de vinazas, en la etapa inicial de operación de los BE.

<i>Enzima</i>	<i>Tiempo (días)</i>				
	0	1	2	3	4
Fosfatasa alcalina	2.5	2.5	5.0	5.0	5.0
Fosfatasa ácida	1.5	3.0	4.0	4.0	4.0
Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa	3.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Estearasa (C4)	2.0	2.5	3.0	3.0	3.0
Estearasa Lipasa (C8)	2.5	3.0	3.0	4.0	4.0
Lipasa (C 14)	0.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Leucina arilamidasa	1.5	2.0	3.0	3.0	3.0
Valina arilamidasa	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Cistina arilamidasa	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Tripsina	1.0	1.0	2.0	2.0	3.0
α -quimiotripsina	0.0	0.0	1.0	1.0	1.0
α -galactosidasa	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
β -galactosidasa	0.0	0.0	0.0	1.0	1.0
β -glucuronidasa	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
α -glucosidasa	1.0	1.0	1.0	2.0	2.0
β -glucosidasa	1.0	2.0	3.5	4.0	4.0
N-acetil-b-glucosaminidasas	0.0	1.0	1.0	1.0	2.0
α -manosidasas	1.0	0.0	0.0	1.0	1.0
α -fucosidasa	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
% de remoción de DQO	0	3	7	10	13

Tabla 8-8. Distribución y abundancia de la AE, durante el proceso depurativo de vinazas, en la etapa intermedia de operación de los BE.

<i>Enzima</i>	<i>Tiempo (días)</i>				
	12	13	14	15	16
Fosfatasa alcalina	4.0	4.0	5.0	5.0	5.0
Fosfatasa ácida	5.0	4.0	5.0	4.5	5.0
Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa	4.0	4.0	5.0	5.0	5.0
Estearasa (C4)	3.0	4.0	4.5	4.0	4.0
Estearasa Lipasa (C8)	3.0	3.0	4.0	4.0	4.0
Lipasa (C 14)	1.0	1.0	2.0	1.0	2.0
Leucina arilamidasa	2.0	3.0	2.5	3.0	2.5
Valina arilamidasa	1.0	1.5	1.5	1.5	2.0
Cistina arilamidasa	1.0	1.0	2.0	1.0	1.0
Tripsina	2.0	2.0	2.0	1.5	1.0
α -quimiotripsina	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
α -galactosidasa	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
β -galactosidasa	1.0	1.5	1.5	1.5	2.0
β -glucuronidasa	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
α -glucosidasa	1.5	2.0	2.0	2.0	2.0
β -glucosidasa	4.0	3.5	3.5	4.0	4.0
N-acetil-b-glucosaminidasas	2.0	3.0	3.0	2.5	2.5
α -manosidasas	2.0	2.0	1.5	1.5	1.5
α -fucosidasa	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
% de remoción de DQO	0	22	39	52	64

Tabla 8-9. Distribución y abundancia de la AE, durante el proceso depurativo de vinazas, en la etapa final de operación de los BE.

<i>Enzima</i>	<i>Tiempo (días)</i>				
	24	25	26	27	28
Fosfatasa alcalina	3.5	3.5	3.5	2.5	2.5
Fosfatasa ácida	4.0	4.5	3.5	4.0	4.0
Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa	5.0	4.0	3.5	4.0	5.0
Estearasa (C4)	3.5	3.0	4.0	3.5	3.0
Estearasa Lipasa (C8)	4.0	3.0	4.0	3.0	4.0
Lipasa (C 14)	2.0	1.0	2.0	1.0	1.0
Leucina arilamidasa	2.5	3.0	3.5	3.5	4.0
Valina arilamidasa	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Cistina arilamidasa	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Tripsina	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0
α -quimiotripsina	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
α -galactosidasa	1.0	1.5	1.5	2.0	2.0
β -galactosidasa	2.0	1.5	1.5	1.5	1.5
β -glucuronidasa	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
α -glucosidasa	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
β -glucosidasa	3.0	3.0	3.5	3.0	3.0
N-acetil-b-glucosaminidasas	2.5	2.5	1.5	2.0	2.0
α -manosidasas	1.5	1.5	1.0	1.5	1.0
α -fucosidasa	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
% de remoción de DQO	0	19	36	50	53

IV PROPIEDADES DE LOS MATERIALES DE EMPAQUE

ÁREA SUPERFICIAL, DENSIDAD APARENTE, DENSIDAD REAL Y POROSIDAD

La distribución y tamaño de partícula de los materiales de empaque, son propiedades importantes para controlar las propiedades hidráulicas de los biofiltros (García *et al.*, 2003; Pinney *et al.*, 2000; Scholz y Xu, 2002b; Stottmeister *et al.*, 2003). En la Figura 8-1, se muestran las fotografías de los materiales de empaque evaluados, después de haber sido molidos, tamizados y lavados.

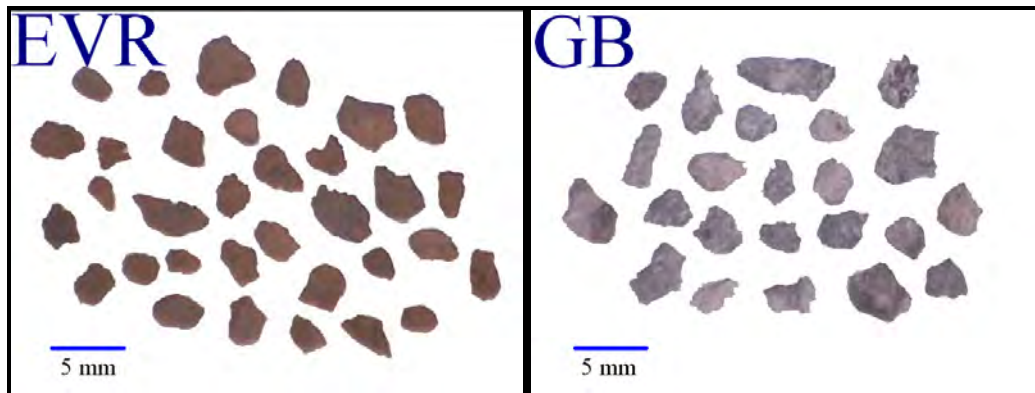


Figura 8-1. Fotografías de los materiales de empaque, escoria volcánica roja y gravilla blanca, después de la molienda, tamizado y lavado.

Posteriormente, para la obtención de las dimensiones del área de las rocas, dichas imágenes fueron procesadas con el software Motic Image 2.0. En la Figura 8-2 se encuentran los resultados de la distribución de acuerdo al número de partículas por área de un gramo de rocas de cada material. Se hizo la consideración de que la superficie total de las rocas es directamente proporcional al área de la imagen, por lo que se consideró solamente esta medición en la caracterización de los materiales.

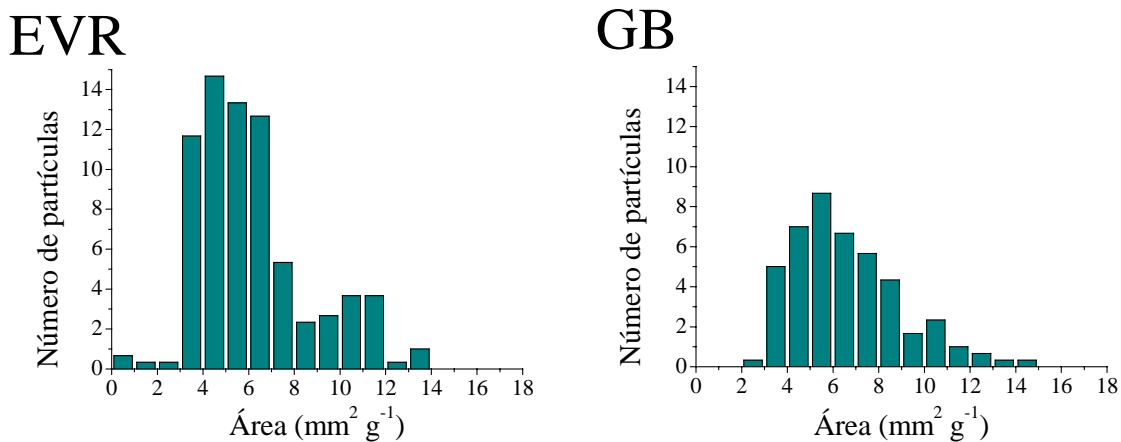


Figura 8-2. Distribución del área superficial de los materiales de empaque, escoria volcánica roja y gravilla blanca.

Los resultados que se presentan en la Tabla 8-10, son los correspondientes al número de partículas por área por gramo de material, la DA, DR y porosidad. La diferencia de estos parámetros, entre cada uno de los materiales varía de acuerdo con su dureza y resistencia a la molienda y al proceso de tamizado. Se encontró que el área para la GB se tiene un intervalo 3-9 mm², en tanto que para la EVR se encontró un número mayor de partículas con un área superficial de 3-7 mm². La EVR es un material más frágil, que durante la molienda gran parte se hace polvo, por lo que la distribución del área queda en un intervalo menor, mientras que para la GB, son rocas más resistentes a la molienda, tienen una distribución con un intervalo más amplio de áreas superficiales.

Es importante considerar estas propiedades para la construcción de los biofiltros, por las condiciones de fricción y la presión que produce por el mismo material dentro de estos sistemas. Esto puede provocar que la presencia de las partículas muy pequeñas tapen el sistema, disminuyendo tanto la eficiencia como calidad de remoción de contaminantes, en sistemas empacados.

Tabla 8-10. Resultados de los parámetros evaluados a los materiales de empaque.

<i>Parámetro</i>	<i>EVR</i>	<i>GB</i>
Área total (mm ² g ⁻¹ de material)	446.1 ± 26.8	290.7 ± 29.7
# promedio de partículas g ⁻¹	73.0 ± 15.0	44.0 ± 2.5
Media del área (mm ²) de cada material)	6.6 ± 0.2	7.3 ± 0.2
DA (g mL ⁻¹)	0.9 ± 0.1	1.2 ± 0.0
DR (g mL ⁻¹)	2.3 ± 0.1	2.6 ± 0.1
Porosidad (%)	59.0 ± 2.0	51.0 ± 3.0

La EVR es fue la roca más porosa y, por lo tanto, la que tuvo una DA y DR significativamente menor, en comparación con las obtenidas para la GB. La GB tiene menor porosidad, en comparación con la EVR, por lo que la EVR aporta una mayor superficie para el desarrollo microbiano y la adsorción de contaminantes, utilizando menor masa y volumen.

Sin embargo, la acumulación de materia orgánica o el desarrollo microbiano, en exceso, puede llevar al taponamiento del sistema y con ello disminuir su vida útil de los sistemas empacados (Långmark *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2003; Mattison *et al.*, 2002; Shaw *et al.*, 1985; Stewart y Fogler, 2001; Vandevivere y Baveye, 1992a; Vandevivere y Baveye, 1992b). Por lo que el uso de la GB puede disminuir el tiempo de taponamiento de los biofiltros.

PERFIL DE VELOCIDAD DE INFILTRACIÓN

Debido a que los parámetros evaluados anteriormente influyen en la velocidad de infiltración del líquido y el tiempo de retención hidráulico, en los BE, se determinó el perfil de la velocidad de infiltración del agua por gravedad. Los resultados se muestran en la Figura 8-3. En donde se observa que ambos materiales presentan un mismo perfil, sin embargo se uso una cantidad menor de EVR que de GB. El GB ocupa mayor volumen que la EVR, sin embargo, el agua pasa con mayor rapidez debido a su superficie lisa y a la menor porosidad, el agua encuentra menor resistencia a su paso y se desliza con mayor velocidad. Por estas características permitirá una mejor conductividad de agua en el biofiltro.

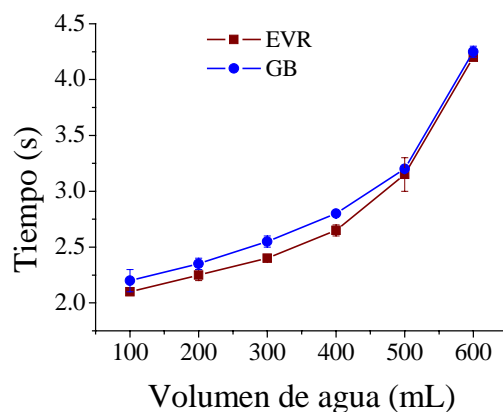


Figura 8-3. Perfiles de velocidad para cada uno de los materiales de empaque: EVR y GB.

CAPACIDAD DEL MATERIAL DE EMPAQUE PARA ADSORBER LA MATERIA ORGÁNICA DE LAS VINAZAS

En los biofiltros se usó una mezcla de EVR y GB de 6:4 en volumen. La cantidad de materia orgánica adsorbida por esta mezcla de materiales de empaque, se calculó por la diferencia de la integral del influente con la integral del efluente, como se muestra en la Figura 8-4. Siendo, la cantidad de DQO adsorbida de 37.5 pg de materia orgánica por gramo de material.

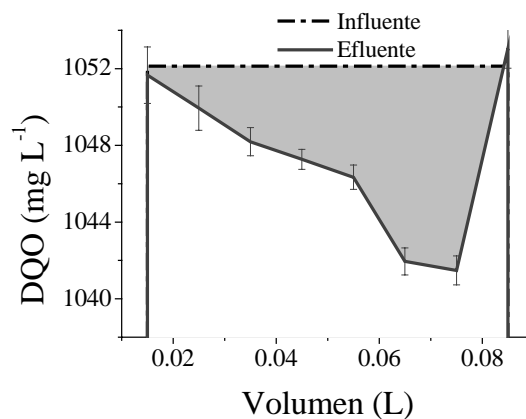


Figura 8-4. Adsorción de materia orgánica (DQO), de las vinazas, en 10 g de mezcla de material de empaque de los biofiltros.