



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**BIODEGRADACIÓN DE AMINAS  
AROMÁTICAS POR MEDIO DE UN  
REACTOR DISCONTINUO AEROBIO**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

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

**MARIBEL FLORES MENDOZA**

**Tutor: Dr. IVAN MORENO ANDRADE**

**Co-tutor: Dr. GERMÁN BUITRÓN MÉNDEZ**



**FACULTAD DE CIENCIAS  
UNAM**

**2007**



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.

---

# Apoyos recibidos

---

Este trabajo fue desarrollado en el Grupo de Investigación: Tratamiento Biológico de Aguas Residuales Industriales de la Coordinación de Bioprocesos del Instituto de Ingeniería de la UNAM.



**INSTITUTO DE INGENIERIA**  
**U. N. A. M.**

Agradezco el apoyo financiero para realizar el trabajo experimental proporcionado por CONACYT a través del proyecto “Degradación de compuestos recalcitrantes en aguas residuales por medio de un biorreactor con membranas automatizado” (proyecto 46093Y).

---

# Agradecimientos

---

A la Coordinación de Bioprocesos Ambientales del Instituto de Ingeniería de la UNAM por permitirme realizar esta investigación.

Al Dr. Iván Moreno Andrade por abrirme las puertas y asesorarme durante el desarrollo de esta tesis y sobre todo por su gran amistad.

Al Dr. Germán Buitrón Méndez por permitirme formar parte del grupo de bioprocesos ambientales y por los valiosos consejos y críticas en este trabajo.

A la M. en C. Lety García por su apoyo en los análisis de muestras en HPLC y por las pláticas y sus valiosos consejos.

Al Dr. Wilverth Villatoro por su apoyo en la realización de las técnicas moleculares y al M en B. Jaime Pérez Trevilla por su asistencia técnica.

A los sinodales: M. en C. Ma. de los Angeles Aguilar, Dra. Guadalupe Barajas, Biol. Israel Castillo y mis amigas: Carmen, Marlene, Adry por la revisión, consejos, y críticas en la parte escrita.

Equipo de trabajo de bioprocesos ambientales: Clau, Daf, Rod, Moni, Jaime, Gastón y Alfredo muchas gracias por su apoyo en el laboratorio, por su compañía y por esas pláticas que me ayudaron en el análisis y a desarrollar este trabajo.

A James Bond principalmente por su gran y valiosa amistad, por la magnífica compañía y toda esa ayuda en el laboratorio.

Especialmente Clau por hacerme sentir parte de algo, por su gran compañía en las madrugadas y por todas esas pláticas y consejos no solo en esta tesis

---

# Dedicatorias

---

## **A DIOS.**

Muchas gracias por esta vida, mi familia, mi novio, mis amigos y todos los momentos compartidos con ellos.

## **A mis padres Chente y Mary:**

Muchas gracias por su apoyo incondicional, por todas sus enseñanzas y principalmente por todo su amor.

## **A mis hermanitos:**

Muchas gracias por estar y compartir conmigo las experiencias de toda una vida, también por su apoyo y comprensión.

## **A mis abuelitos:**

Benito y Marinita por ser mi segunda mamá, muchas gracias por cuidarme y permitirme ver toda su vitalidad, entereza, fuerza y sus muchas ganas de seguir viviendo, muchas gracias por regalarnos otro año de tu vida, te quiero mucho abue.

Popis † y Manuel †, aunque ya no están con nosotros, los seguimos recordando.

## **A mis tíos:**

Manuel, Maria y Nacha, gracias por sus consejos y apoyo, y sobretodo por hacerme sentir parte de la familia y aceptarme tal como soy.

## **A mi novio:**

Eliut, muchas gracias por estar conmigo en esta etapa de mi vida, por su gran ayuda y apoyo en este trabajo. TE AMO MUCHISIMO. Y también le agradezco a su familia, a su mamita, a su papito y sus hermanitos: Heri, Bere y Güero, por su amistad y hacerme sentir parte de esta gran familia.

## **A mis primos:**

Pepe Luís, Jorge, Pancho, Emmanuel e Isaac, muchas gracias por cuidarme, por ser mis grandes amigos y sus consejos y apoyo durante toda mi vida.

## **A mis sobrinos:**

Jorge Luis, Panchito, Jorgito, Marinita, Danielito, Jostin, y Pepinito

## **A mis amigas:**

A mis amigos: con los que compartí un gran número de experiencias buenas, malas y divertidas:

Elia Rusely, Jesús, Fernando Fores, Ma. Elena Flores, Diana, Edith Peña, Liliana, Karen, Wendy Luna, Aida, Carmen R. Gonzáles, A. Marlene Flores, Edgardo, Lety, Adrianita Gaitan, Erikiux, Gloria, Lulu, Marisol, Liliana, Claudia Martínez, Clau, Daf y Rod

---

# JURADO

---

**PRESIDENTE:**

Dr. Germán Buitrón Méndez

**VOCAL:**

M. en C. María de los Ángeles Aguilar Santamaría

**SECRETARIO:**

Dr. Ivan Moreno Andrade

**1ER SUPLENTE:**

Dra. María Guadalupe Barajas Guzmán

**2DO SUPLENTE:**

Biol. Israel Castillo Juárez

---

# Índice

---

<b>ÍNDICE.</b> . . . . .	1
<b>ÍNDICE DE TABLAS.</b> . . . . .	5
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.</b> . . . . .	7
<b>NOMENCLATURA.</b> . . . . .	11
<b>RESUMEN.</b> . . . . .	13
<b>INTRODUCCIÓN.</b> . . . . .	15
<b>JUSTIFICACIÓN.</b> . . . . .	19

## **ANTECEDENTES**

1.1 Tratamiento de aguas residuales. . . . .	21
1.2 Tratamiento biológico de aguas residuales. . . . .	23
1.3 Sistema de lodos activados. . . . .	24
1.4 Aclimatación. . . . .	26
1.5 Reactores Discontinuos Secuenciales. . . . .	27
1.6 Tratamiento de efluentes industriales. . . . .	29
1.7 Compuestos amino aromáticos. . . . .	30
1.8 Identificación de cambios en la comunidad microbiana. . . . .	32

## **2 OBJETIVOS E HIPÓTESIS**

2.1 Objetivo general. . . . .	35
2.2 Objetivos particulares. . . . .	35
2.3 Hipótesis. . . . .	35

## **3 METODOLOGÍA**

3.1 Sistema experimental. . . . .	37
3.2 Agua residual empleada. . . . .	37
3.3 Arranque del biorreactor. . . . .	38

3.4	Aclimatación de los microorganismos. . . . .	38
3.5	Cinéticas de degradación. . . . .	39
3.6	Automatización. . . . .	39
3.7	Operación del reactor. . . . .	40
3.8	Métodos de análisis. . . . .	40
3.8.1	p-aminofenol. . . . .	40
3.8.2	p-toluidina. . . . .	40
3.8.3	Nitrógeno amoniacal (N-NH <sub>3</sub> ). . . . .	40
3.8.4	Nitrógeno de nitrito (N-NO <sub>2</sub> ). . . . .	41
3.8.5	Nitrógeno de nitrato (N-NO <sub>3</sub> ). . . . .	41
3.8.6	Demanda química de oxígeno. . . . .	41
3.8.7	Carbono orgánico disuelto. . . . .	42
3.8.8	Respirometría. . . . .	42
3.8.9	Caracterización de los lodos activados. . . . .	42
3.8.9.1	Sólidos suspendidos. . . . .	42
3.8.9.2	Índice volumétrico y velocidad de sedimentación. . . . .	43
3.9	Técnicas de biología molecular. . . . .	44
3.9.1	Extracción del ADN. . . . .	44
3.9.2	Amplificación del ADN. . . . .	44
3.9.3	Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante. . . . .	44

#### 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1	Biodegradación de p-aminofenol. . . . .	45
4.1.1	Tiempo de Reacción. . . . .	45
4.1.2	Eliminación del p-aminofenol. . . . .	46
4.1.3	Operación del biorreactor. . . . .	46
4.1.4	Comportamiento de la biomasa. . . . .	48
4.1.5	Evolución de la comunidad microbiana. . . . .	49
4.2	Biodegradación de p-toluidina. . . . .	51
4.2.1	Aclimatación de la biomasa. . . . .	51
4.2.1.1	Tiempo de reacción. . . . .	51
4.2.1.2	Operación del biorreactor. . . . .	51
4.2.1.3	Actividad de los microorganismos. . . . .	54
4.2.1.4	Comportamiento de la biomasa durante la aclimatación. . . . .	55
4.2.2	Datos operacionales del biorreactor. . . . .	56
4.2.2.1	Tiempos de reacción. . . . .	56
4.2.2.2	Operación del biorreactor. . . . .	58



4.2.2.3	Cinéticas de degradación. . . . .	60
4.2.2.3.1	<i>Cinética de degradación del ciclo 16.</i> . . . . .	60
4.2.2.3.2	<i>Cinética de degradación del ciclo 40.</i> . . . . .	62
4.2.2.3.3	<i>Cinética de degradación del ciclo 70.</i> . . . . .	63
4.2.2.3.4	<i>Cinética de degradación del ciclo 114.</i> . . . . .	64
4.2.2.3.5	<i>Cinética de degradación del ciclo 142.</i> . . . . .	65
4.2.2.4	Actividad de los microorganismos. . . . .	66
4.2.2.5	Comportamiento de la biomasa. . . . .	67
4.2.3	Evolución de la comunidad microbiana. . . . .	69
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONES.</b> . . . . .	<b>71</b>
<b>6</b>	<b>REFERENCIAS.</b> . . . . .	<b>73</b>
<b>7</b>	<b>PUBLICACIONES.</b> . . . . .	<b>81</b>
<b>8</b>	<b>ANEXOS</b>	
8.1	Características del Agua Residual. . . . .	83
8.2	Pruebas abióticas de los compuestos. . . . .	83
8.3	Protocolos de las técnicas moleculares. . . . .	
8.3.1	Extracción del ADN. . . . .	84
8.3.2	Amplificación del ADN. . . . .	85



---

# Índice de tablas

---

<b>Tabla 1. 1.</b>	Procesos físicos para el tratamiento de aguas residuales. . . . .	<b>21</b>
<b>Tabla 1. 2.</b>	Principales procesos químicos para el tratamiento de aguas residuales. . . . .	<b>22</b>
<b>Tabla 1. 3.</b>	Principales procesos biológicos para el tratamiento de aguas residuales. . . . .	<b>22</b>
<b>Tabla 1. 4.</b>	Clasificación de interacciones entre microorganismos basada en sus efectos. . . .	<b>26</b>
<b>Tabla 3. 1.</b>	Composición del medio mineral. . . . .	<b>38</b>
<b>Tabla 3. 2.</b>	Soluciones para la preparación del gel de acrilamida con gradiente desnaturalizante. Las concentraciones de 42.5 y 62.5% de formamida y urea se prepararon por separado. . . . .	<b>44</b>
<b>Tabla 4. 1.</b>	Índice volumétrico de lodos (IVL) y velocidad de sedimentación (VS) durante la operación del reactor. . . . .	<b>69</b>
<b>Tabla 8. 1.</b>	Promedio de los análisis del agua utilizada sin los compuestos tóxicos. . . . .	<b>83</b>



---

# Índice de figuras

---

<b>Figura 1. 1.</b>	Etapas de un reactor discontinuo secuencial. . . . .	29
<b>Figura 1. 2.</b>	Estructura química del p-aminofenol. . . . .	31
<b>Figura 1. 3.</b>	Ruta de degradación del p-aminofenol propuesta por Takenaka <i>et al.</i> (2003). .	31
<b>Figura 1. 4.</b>	Estructura química de la p-toluidina. . . . .	32
<b>Figura 1. 5.</b>	Estructura secundaria del ARNr 16S de <i>Escherichia coli.</i> (Brosius <i>et al.</i> , 1978). .	33
<b>Figura 3. 1.</b>	Sistema utilizado para la biodegradación de los compuestos amino aromáticos.	37
<b>Figura 3. 2.</b>	Sistema automatizado utilizado para la biodegradación de los compuestos amino aromáticos. . . . .	39
<b>Figura 4. 1.</b>	Tiempo de reacción que se requirió para llevar a cabo la degradación del p-aminofenol durante la aclimatación (ciclos 1 al 6) y operación del reactor (7 al 11). . . . .	45
<b>Figura 4. 2.</b>	Concentración del PAF al inicio y final de cada ciclo durante la aclimatación (ciclos 1 al 6) y operación del reactor (7 al 11). . . . .	46
<b>Figura 4. 3.</b>	Concentración de la DQO al inicio y final de cada ciclo durante la aclimatación y operación del reactor. . . . .	47
<b>Figura 4. 4.</b>	Concentración de la COD al inicio y final de cada ciclo durante la aclimatación y operación del reactor. . . . .	47
<b>Figura 4. 5.</b>	Tasa específica de degradación durante la remoción del PAF en cada ciclo en la aclimatación y operación del reactor. . . . .	48
<b>Figura 4. 6.</b>	Evolución de los SST y SSV durante la aclimatación y operación del reactor; y cantidad de SSTe en la salida del agua residual tratada. . . . .	48
<b>Figura 4. 7.</b>	Comportamiento del IVL y VS de la biomasa durante la aclimatación y operación del reactor. . . . .	49
<b>Figura 4. 8.</b>	Evolución de la comunidad microbiana durante la degradación del PAF, la muestra A corresponde al inóculo, la B al ciclo 5 (14 h), la C al ciclo 9 (70 h) y la D al fin de la operación del reactor (114 h). . . . .	49
<b>Figura 4. 9.</b>	Tiempo de reacción de cada ciclo para llevar a cabo la degradación de la PT durante la aclimatación. . . . .	51
<b>Figura 4. 10.</b>	Concentración de la DQO al inicio y final de cada ciclo durante la aclimatación	52
<b>Figura 4. 11.</b>	Concentración de la COD al inicio y final de cada ciclo durante la aclimatación.	52
<b>Figura 4. 12.</b>	Concentración de los nitratos y amoniaco al inicio y final de cada ciclo durante la aclimatación. . . . .	53
<b>Figura 4. 13.</b>	Nitrógeno obtenido en el balance al inicio y final de cada ciclo durante la aclimatación. . . . .	53

<b>Figura 4. 14.</b>	Evolución de la tasa específica de degradación durante la aclimatación de los lodos a la PAF. . . . .	<b>54</b>
<b>Figura 4. 15.</b>	Evolución de la tasa específica de consumo de oxígeno (TECO) durante la aclimatación de los microorganismos. . . . .	<b>54</b>
<b>Figura 4. 16.</b>	Evolución de los sólidos suspendidos totales y volátiles en el biorreactor y solidos suspendidos totales en el efluente en cada ciclo durante la acimatación a la PT. . . . .	<b>55</b>
<b>Figura 4. 17.</b>	Evolución de la capacidad de sedimentación (IVL) y la velocidad de sedimentación de la biomasa en cada ciclo durante la aclimatación a la PT. . .	<b>56</b>
<b>Figura 4. 18.</b>	Tiempos de reacción para llevar a cabo la degradación de la PT en cada uno de los ciclos durante la operación del reactor, en los ciclos del 9 al 5 el tiempo de reaccion vario entre 26 a 21 h, del 16 al 45 fueron de 11 h, del 46-117 de 5 h, del 118 al 153 de 3 h y del 154-289 de 2 h. . . . .	<b>57</b>
<b>Figura 4. 19.</b>	Cinéticas de degradación para observar los cambios de los tiempos de reacción para remover 50 mgPT/L en cinco diferentes ciclos durante la operación del reactor. . . . .	<b>57</b>
<b>Figura 4. 20.</b>	Concentración de la DQO al inicio y final de cada ciclo durante la operación del reactor; los ciclos del 9 al 5 (26 a 21 h), 16 al 45 (11 h), 46-117 (5 h), 118 al 153 (3 h) y 154-289 (2 h). . . . .	<b>58</b>
<b>Figura 4. 21.</b>	Concentración de la COD al inicio y final de cada ciclo durante la operación del reactor. . . . .	<b>59</b>
<b>Figura 4. 22.</b>	Concentración del NH <sub>3</sub> y NO <sub>3</sub> al inicio y final de cada ciclo durante la operación del reactor. . . . .	<b>59</b>
<b>Figura 4. 23.</b>	Nitrógeno al inicio y final de cada ciclo de operación del reactor (balance). . .	<b>60</b>
<b>Figura 4. 24.</b>	Eficiencia de transformación de PT a NO <sub>3</sub> durante la operación del reactor. . .	<b>60</b>
<b>Figura 4. 25.</b>	Cinéticas de degradación para la remoción de 50 PTmg/L, el análisis de la eliminación el compuesto también se siguió con la DQO y COD en el ciclo 16. . .	<b>61</b>
<b>Figura 4. 26.</b>	Evolución del N-NH <sub>3</sub> , N-NO <sub>2</sub> y N-NO <sub>3</sub> durante la cinética de degradación de la PT (ciclo 16). . . . .	<b>61</b>
<b>Figura 4. 27.</b>	Cinéticas de degradación para la remoción de 50 PTmg/L, el análisis de la eliminación el compuesto también se siguió con la DQO y COD en el ciclo 40. . .	<b>62</b>
<b>Figura 4. 28.</b>	Evolución del N-NH <sub>3</sub> , N-NO <sub>2</sub> y N-NO <sub>3</sub> durante la cinética de degradación de la PT (ciclo 40). . . . .	<b>62</b>
<b>Figura 4. 29.</b>	Cinéticas de degradación para la remoción de 50 PTmg/L, el análisis de la eliminación el compuesto también se siguió con la DQO y COD en el ciclo 70. . .	<b>63</b>
<b>Figura 4. 30.</b>	Evolución del N-NH <sub>3</sub> , N-NO <sub>2</sub> y N-NO <sub>3</sub> durante la cinética de degradación de la PT (ciclo 70). . . . .	<b>63</b>
<b>Figura 4. 31.</b>	Cinéticas de degradación para la remoción de 50 PTmg/L, el análisis de la eliminación el compuesto también se siguió con la DQO y COD en el ciclo 114. . .	<b>64</b>
<b>Figura 4. 32.</b>	Evolución del N-NH <sub>3</sub> , N-NO <sub>2</sub> y N-NO <sub>3</sub> durante la cinética de degradación de la PT (ciclo 114). . . . .	<b>64</b>

<b>Figura 4. 33.</b>	Cinéticas de degradación para la remoción de 50 PTmg/L, el análisis de la eliminación el compuesto también se siguió con la DQO y COD para el ciclo 142. . . . .	65
<b>Figura 4. 34.</b>	Evolución del N-NH <sub>3</sub> , N-NO <sub>2</sub> y N-NO <sub>3</sub> durante la cinética de degradación de la PT (ciclo 142). . . . .	65
<b>Figura 4. 35.</b>	Evolución de la tasa específica de degradación, q <sub>d</sub> , como una función en el tiempo de operación del reactor. . . . .	66
<b>Figura 4. 36.</b>	Evolución de la tasa específica de consumo de oxígeno (TECO) de la PT y sustrato de fácil degradación (Acetato de Amonio) durante operación del reactor. . . . .	67
<b>Figura 4. 37.</b>	Evolución de los sólidos suspendidos totales y volátiles en el reactor y los sólidos suspendidos totales del efluente en cada ciclo durante la operación del reactor. . . . .	68
<b>Figura 4. 38.</b>	Evolución de la capacidad de sedimentación (IVL) y velocidad de sedimentación de la biomasa durante la operación del reactor. . . . .	69
<b>Figura 4. 39.</b>	Evolución de la comunidad microbiana, la banda A corresponde al inóculo, la banda B al ciclo 32 (11 h), la banda C al ciclo 130 (3 h) y la banda D al fin de la operación del reactor (2 h). . . . .	70
<b>Figura 8. 1.</b>	Espectros de la PT tomados el espectrofotómetro durante la prueba abiótica. .	83

---

# Nomenclatura

---

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFNOR	Asociación Francesa de Normalización ( <i>Association Française de Normalisation</i> )
APHA	Asociación Americana de la Salud Pública ( <i>American Public Health Association</i> )
ARDRA	Análisis de restricción del ARNr amplificado ( <i>Amplified rDNA restriction analysis</i> )
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
CNA	Comisión Nacional del Agua
COV	Compuestos orgánicos volátiles
CVIA	Centro Virtual de Información del Agua
DGGE	Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante ( <i>Denaturing gradient gel electrophoresis</i> )
DQO	Demanda química de oxígeno, mg/L
F	Filtro a peso constante, g
Fe	Filtro después de la estufa, g
FISH	Hibridación in situ fluorescente ( <i>Fluorescent In-situ hybridisation</i> )
Fm	Filtro después de la mufla, g
HPLC	Cromatografía de líquidos de alto rendimiento ( <i>High performance liquid chromatographic,</i> )
h	Horas
ICSC	Fichas de seguridad química internacional ( <i>International chemical safety cards</i> )
IVL	Índice volumétrico de lodos, mL/g
L	Litro
MLSS	Licor mezclado de sólidos suspendidos



---

MLSSV	Licor mezclado de sólidos suspendidos volátiles
mg	Miligramo
N	Nitrógeno
N-NH <sub>3</sub>	Nitrógeno amoniacal, mg/L
N-NO <sub>2</sub>	Nitrógeno de nitrito, mg/L
N-NO <sub>3</sub>	Nitrógeno de nitrato, mg/L
PAF	p-aminofenol
P2	Primer 2
P3	Primer 3
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>Polimerase chain reaction</i> )
PT	p-toluidina
q	Tasa de degradación del sustrato, mg <sub>sustrato</sub> /gSSV/h
RISA	Análisis de restricción de espacios intergénicos del rADN ( <i>rADN Intergenic spacer analysis</i> )
SSCP	Polimorfismo de hebra única ( <i>Single strand conformation polymorphism</i> )
SST	Sólidos suspendidos totales, mg/L
SSV	Sólidos suspendidos volátiles, mg/L
TGGE	Electroforesis en gel con gradiente de temperatura ( <i>Thermal gradient gel electrophoresis</i> )
TNT	Trinitrotolueno o 2,4,6-trinitrometilbenceno
COD	Carbono orgánico disuelto
T-RFLP	Polimorfismo de fragmentos de restricción ( <i>Terminal restriction fragment length polymorphism</i> )
VS	Velocidad de sedimentación, m/h
UNESCO	Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura ( <i>United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization</i> )
UV	Ultravioleta

---

# Resumen

---

Entre los compuestos aromáticos más comunes que se encuentran en las aguas residuales industriales son los que contienen grupos amino. Se ha demostrado que estos compuestos tienen propiedades altamente tóxicas y cancerígenas. El p-aminofenol (PAF) y la p-toluidina (PT) son aminas aromáticas que se encuentran en aguas residuales de la industria farmacéutica y textiles. El objetivo de este trabajo fue evaluar la biodegradación de dos aminas aromáticas (PAF y PT) por medio de un reactor discontinuo secuencial (SBR) aerobio.

Para cada compuesto, se utilizó un reactor SBR con una capacidad de 4L con un volumen de intercambio del 50%. El biorreactor fue inoculado con microorganismos provenientes de una planta de tratamiento de aguas residuales municipales (2000 mg/L de SSV). Se controló la temperatura del reactor (20°C), la agitación (150 rpm), el oxígeno disuelto (70%) y el pH dentro del reactor ( $7 \pm 0.2$ ). Se emplearon 50 mg/L de cada compuesto como única fuente de carbono. Se realizaron cinéticas de degradación de fenoles totales, carbono orgánico disuelto (COD), demanda química de oxígeno (DQO), sólidos suspendidos totales y volátiles. Adicionalmente el sustrato fue seguido por medio de la medición de la concentración de sustrato en el medio por medio de espectrofotometría y HPLC. Se evaluaron los cambios en la comunidad microbiana por medio de técnicas moleculares.

El reactor empleado en la degradación de PAF fue operado en un periodo de 26 días (12 ciclos), la aclimatación de la biomasa se alcanzó en 9 días, siguiendo como criterio la estabilización de las eficiencias de remoción mayores al 90% que correspondió al ciclo 6 de operación del reactor. A medida que la biomasa se aclimataba, existió una disminución en el tiempo de reacción, el tiempo inicial fue de 47 h disminuyendo a 14 h al final de la aclimatación (manteniendo este tiempo por varios ciclos). Sin embargo, hubo un aumento gradual en los tiempos de la fase de reacción de 21 a 114 horas en los últimos 5 ciclos debido a la formación de polímeros (oxidación del compuesto tóxico con el oxígeno del medio). Este fenómeno provocó el aumento en los tiempos de remoción debido a la acumulación de los polímeros formados, ya que estas moléculas son muy complejas haciendo muy difícil su biodegradación.

En el caso de la PT, el reactor fue operado durante 3 meses (300 ciclos de operación), alcanzando la aclimatación de los microorganismos en el ciclo 9 (día 30). El tiempo de reacción disminuyó de 144 h (ciclo 1) a 2h en el ciclo 150. La eliminación de la DQO y COD durante la operación del biorreactor fue de 93% y 92% respectivamente, demostrando la eliminación del carbono proveniente del sustrato. Se alcanzó una tasa específica de degradación máxima entre 29 mgPT/gSSV/L. El SBR demostró ser una excelente tecnología para la degradación de aguas residuales conteniendo PT.

El análisis del DGGE demostró que existió una gran dinámica poblacional dentro de ambos reactores. Algunos microorganismos fueron seleccionados y posteriormente se multiplicaron, debido a que durante la operación de los reactores se aclimataron a degradar el compuesto tóxico.

Es posible concluir que la PT puede ser biodegradada con una buena eficiencia de remoción por medio de reactores discontinuos aerobios. Sin embargo en el caso del PAF se observó poca biodegradabilidad debido a su polimerización en el reactor SBR aerobio.

---

# Introducción

---

El 70% de la superficie de la tierra está cubierta de agua. El 97.5% es salada; del resto, el 2.3% es agua dulce congelada en los casquetes polares y glaciares o son aguas subterráneas profundas; sólo menos del 0.3% es agua dulce fácilmente accesible para el consumo, encontrándose en ríos, lagos y en acuíferos a poca profundidad del suelo (CNA, 2005).

El uso del agua va aumentando en relación a la cantidad de agua disponible. Los más de 6000 millones de habitantes en el planeta ya se han apropiado del agua dulce disponible en ríos, lagos y acuíferos subterráneos. Según los datos presentados en el 1<sup>er</sup> informe de la UNESCO del 2003 “Agua para todos, agua para la vida” (UNESCO, 2003) a escala mundial, el 69.3% de la extracción anual del agua para el uso humano se destina a la agricultura (principalmente para riego); el 21.8% para la industria y el 8.9% para el consumo doméstico (hogar, agua de consumo humano y saneamiento). Estas cifras medias mundiales varían mucho de una región a otra del mundo (Escribano, 2007).

La industria, como motor esencial del crecimiento económico, requiere recursos suficientes del agua como materia prima básica. En las regiones de rápido crecimiento la demanda del agua va en aumento, provocando mayor contaminación y más residuos industriales que ponen en peligro los recursos hídricos; dañando y destruyendo los ecosistemas del mundo entero (Escribano, 2007).

El volumen anual del agua utilizada por la industria se elevará de 752 km<sup>3</sup>/año en 1995 a una cifra estimada de 1170 km<sup>3</sup>/año en el 2025, año en que se espera que el componente industrial represente un 24% del total de la extracción de agua dulce (UNESCO, 2003; CVIA, 2006b).

En nuestro país no se sabe con exactitud cuánta agua se utiliza en la industria; sin embargo, se cuenta con el Registro Público de Derechos del Agua, el cual menciona los volúmenes concesionados o asignados a los usuarios de aguas nacionales (CNA, 2005). Este registro indica que 76% del agua en México se emplea para uso agrícola, el 14% para uso doméstico y el 10% para uso industrial (CNA, 2006).

A pesar de que las aguas residuales industriales contienen compuestos tóxicos no existe un tratamiento adecuado de ellas, ya que en México sólo se trata eficientemente alrededor del 10% (CNA, 2006). En algunas industrias, la concentración de compuestos tóxicos en los efluentes representa un problema significativo debido a los costos y dificultades que involucra su remoción, para lograr cumplir con estándares de descarga, ya sean para su uso como agua de riego o para descargarse a un cuerpo de agua superficial o subterráneo (CVIA, 2006a). La gran mayoría de estos compuestos tóxicos son xenobióticos (químicos hechos por el hombre) y su estructura química o grupos funcionales los hacen resistentes a la biodegradación (recalcitrantes), por lo cual persisten en el medio (Moreno *et al.*, 2004, Ye *et al.*, 2003); el impacto de estos contaminantes depende de la toxicidad, concentración, recalcitrancia, frecuencia de descarga, entre otros factores (Jiménez, 2002).

Es de vital importancia, como primera vía para remediar esta situación, evitar al máximo la generación de estos productos tóxicos y su disposición en el medio ambiente, para lo cual es necesario el desarrollo de nuevas tecnologías y procesos por medio de los cuales se puedan eliminar (Moreno, 2006). Los desechos cuyo ritmo de producción y disposición en el ambiente supera la capacidad propia de la naturaleza para eliminarlos, son los que principalmente impactan a los ecosistemas, la bioacumulación de estos compuestos xenobióticos en los seres vivos origina problemas a nivel funcional y genético (Jiménez, 2002); y los más recalcitrantes, sufren el proceso de magnificación en las redes tróficas que inicia con los microorganismos y causa la acumulación en niveles tróficos superiores (carnívoros), provocando graves daños ecológicos (Atlas, 2002).

Existen varios procesos fisicoquímicos para depurar aguas residuales como: filtración, destilación, centrifugación, sistemas de membranas, ozonación, etc. La mayoría de ellos no atacan el problema de raíz, es decir, sólo cambian de fase o concentran los contaminantes en un volumen menor, trasladando el problema a otro lado (Jiménez, 2002).

Una opción para el tratamiento de este tipo de aguas residuales son los tratamientos biológicos que emplean una población mixta de microorganismos para degradar los compuestos orgánicos disueltos que contaminan el agua (Winkler, 1994). En estos procesos se utiliza como fuente de carbono y energía los contaminantes y se transforma la estructura básica de las moléculas (biotransformación) o incluso se puede llegar a oxidar completamente la materia orgánica obteniendo como productos de reacción compuestos simples como CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, NO<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> y material sedimentable (biomasa y sólidos suspendidos). Cabe mencionar que los costos de operación y mantenimiento de estos sistemas son inferiores a los procesos fisicoquímicos (Jiménez, 2002).

Para que una planta de tratamiento sea eficiente, debe de cumplir con los requerimientos de calidad que establece la normatividad vigente en materia ambiental antes de ser vertida al sistema de drenaje o a los cuerpos de agua receptores (Fonseca, 2002). En México, las normas que marcan los parámetros máximos que se permiten en las plantas de tratamiento de aguas residuales y posterior reuso son: La Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales, la NOM-002-ECOL-1996 que establece los límites máximos permisibles en las descargas de aguas residuales a los sistemas de alcantarillado urbano o municipal y la NOM-003-ECOL-1997 que establece los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reusen en servicios al público.

Actualmente muy pocas plantas de tratamiento de efluentes industriales pueden cumplir estas normas ya que la tecnología empleada usualmente (sistemas biológicos continuos) presenta bajas eficiencias de remoción de los compuestos contaminantes. Por lo anterior, el principal motivo de esta investigación fue la evaluación del empleo de reactores biológicos discontinuos en el tratamiento de efluentes industriales. En particular en esta tesis se estudió la posibilidad de emplear microorganismos en un proceso discontinuo aerobio para la degradación biológica de aminos aromáticos y en especial conocer el comportamiento de la comunidad microbiana que lleva a cabo esa biodegradación.

---

# Justificación

---

Las aminas aromáticas como el p-aminofenol y p-toluidina son compuestos que comúnmente se encuentran en el agua residual de las industrias farmacéutica, textiles, tejidos peletería, peluquería, fotografía, ambos compuestos son considerados altamente tóxicos y cancerígenos. Por ello es necesario desarrollar la tecnología que permita eliminarlos.

Los tratamientos físico-químicos no resuelven completamente este problema de raíz y los tratamientos biológicos convencionales presentan problemas debido a los efectos tóxicos sobre la biomasa que provocan poca biodegradabilidad, inhibición o la muerte de los microorganismos, además hay que considerar que estos compuestos son recalcitrantes; la descarga de estos contaminantes sin un tratamiento previo efectivo que cumpla con los requerimientos de calidad que establece la normatividad vigente en materia ambiental antes de ser vertida al sistema de drenaje o a los cuerpos de agua receptores, puede causar graves daños a los recursos hídricos y en general al ecosistema.

El uso de lodos activados como inóculo en reactores secuenciales discontinuos aerobios y la aclimatación de la biomasa han permitido la degradación de muchos compuestos tóxicos recalcitrantes de origen industrial, ya que al someterlos al sistema cíclico y toxicidad del compuesto permiten la adaptación y establecimiento de un consorcio microbiano que es capaz de degradar estos compuestos. Actualmente, con el uso de las técnicas moleculares de huella genética (por ejemplo el DGGE) se ha logrado el seguimiento y comparación de comunidades encargadas de degradar algún compuesto tóxico en particular, además mediante estas técnicas es posible conocer cuáles son los microorganismos responsables de la degradación.

## 1. 1. Tratamiento de aguas residuales

El tratamiento de aguas residuales es una herramienta básica para la eliminación de contaminantes por medio de métodos físicos, químicos y biológicos. Los métodos en los que predomina una fuerza física para separar los contaminantes del agua se conocen como operaciones físicas. Con este tipo de métodos únicamente se remueven los contaminantes sin realizar ningún tipo de reacción química o biológica (Metcalf & Eddy, 2003). La tabla 1.1. describe las principales aplicaciones de los distintos procesos físicos.

**Tabla 1.1.** Procesos físicos para el tratamiento de aguas residuales

PROCESO	APLICACIÓN
Homogenización	Igualación de corrientes cuando las características del caudal varía
Separación por gravedad	Separación de aceites, grasas, sólidos suspendidos
Flotación por aire	Aceites emulsificados grasas y sólidos suspendidos finos
Evaporación	Remoción de compuestos orgánicos volátiles (COV), concentración de residuos líquidos, deshidratación de lodos residuales
Floculación	Aglomeración de partículas suspendidas con agentes floculantes para formar flóculos y separar por gravedad
Filtración	Remoción de aceites y grasas libres o emulsificadas y sólidos suspendidos, como biomasa remanente en los tratamientos biológicos
Adsorción	Remoción de compuestos orgánicos e inorgánicos disueltos en agua
Cribado	Eliminación de material voluminoso del agua residual
Electrodialisis	Eliminación de material coloidal y soluble

Fuente: Metcalf & Eddy, 1991.

Los métodos en los que la eliminación o conversión del contaminante es provocada por la adición de químicos o por otras reacciones químicas se conocen como procesos químicos. Aquí se manipulan las propiedades químicas de los contaminantes para facilitar su remoción (Metcalf & Eddy, 2003). La tabla 1.2. describe las principales aplicaciones de los distintos procesos químicos.



**Tabla 1. 2.** Principales procesos químicos para el tratamiento de aguas residuales

PROCESO	APLICACIÓN
Precipitación	Remoción de materiales pesados en forma de iones y compuestos orgánicos específicos como: sales, minerales, fosfatos, etc.
Neutralización	Control del pH para post-tratamientos biológicos o químicos
Recuperación electrolítica	Remoción de compuestos orgánicos, inorgánicos y principalmente metales en aguas de elevadas concentraciones
Intercambio iónico	Ablandamiento del agua, remoción de metales y minerales del agua
Tratamiento con agentes oxidantes (aire, Cl, O <sub>3</sub> , rayos UV)	Remoción de contaminantes disueltos, desinfección, remoción de la demanda química de oxígeno (DQO)

Fuente: Metcalf & Eddy, 1991.

Los métodos en los cuales la eliminación de contaminantes es producida por la actividad biológica se conocen como procesos biológicos. Los microorganismos descomponen los contaminantes orgánicos biodegradables y nutrientes del agua residual (Metcalf & Eddy, 2003). La tabla 1.3. muestra los principales procesos biológicos y su aplicación.

**Tabla 1. 3.** Principales procesos biológicos para el tratamiento de aguas residuales

TIPO	NOMBRE COMÚN	APLICACIÓN
<b>PROCESOS AEROBIOS</b>		
Cultivo en suspensión	Proceso de lodos activados	Eliminación DBO (nitrificación)
	Lagunas aeradas	
	Estanques aerobios de alta carga	Eliminación DBO
	Digestión aerobia	Estabilización, eliminación de la DBO
Cultivo fijo	Nitrificación de cultivos en suspensión	Nitrificación
	Filtros precoladores	Eliminación de la DBO (nitrificación)
<b>PROCESOS CONBINADOS</b>		
	Filtros precoladores, lodos activados	Eliminación de la DBO
<b>PROCESOS ANOXICOS</b>		
Cultivo en suspensión	Desnitrificación con cultivo en suspensión	Desnitrificación
Cultivo fijo	Desnitrificación con cultivo fijo	
<b>PROCESOS ANAEROBIOS</b>		
Cultivo en suspensión	Digestión anaerobia:	Estabilización, eliminación de la DBO
Cultivo fijo	Proceso anaerobio de contacto	Eliminación de la DBO
	Filtro anaerobio	Eliminación de la DBO (nitrificación)
	Lagunas anaerobias (estanques)	Eliminación de la DBO (estabilización)

Fuente: Metcalf & Eddy, 1991.

Actualmente en los tratamientos de aguas residuales los diferentes procesos se agrupan para proporcionar varios niveles de tratamiento mediante una secuencia de operaciones debidamente seleccionadas e integradas; con ello proporciona e incrementa la posibilidad del reuso del agua, además de proteger la ecología de los cuerpos receptores y la salud pública. Los tratamientos de aguas residuales se dividen en (Metcalf & Eddy, 2003):

- ◆ **Tratamiento preliminar:** se eliminan sólidos crasos como objetos grandes, trapos, arena, que podrían dañar al equipo.
- ◆ **Tratamiento primario:** una operación física, generalmente la sedimentación, se usa para eliminar los materiales flotantes y sedimentables.
- ◆ **Tratamiento primario avanzado:** se agregan productos químicos para aumentar la eliminación de sólidos suspendidos y en menor medida disolver algunos sólidos solubles.
- ◆ **Tratamiento secundario:** se usan procesos biológicos o químicos para eliminar sólidos suspendidos residuales y otros contaminantes que no son reducidos significativamente por el tratamiento primario convencional.

## 1. 2. Tratamiento biológico de aguas residuales

El tratamiento biológico de aguas residuales consiste en favorecer el crecimiento de bacterias y otros organismos propios del agua con el objeto de transformar contaminantes orgánicos disueltos o partículas biodegradables en productos finales menos complejos e incorporar sólidos coloidales suspendidos, no sedimentables, en flóculos o en una biopelícula y en algunos casos, remover trazas de compuestos orgánicos tóxicos (Metcalf & Eddy, 2003).

El tratamiento consta de dos etapas principales, en la primera se lleva a cabo la degradación de la materia orgánica por los microorganismos y en la segunda, el agua tratada se separa de los microorganismos. En un proceso continuo estas etapas se realizan dos tanques: el primero es el reactor biológico y el segundo es un sedimentador. Si el proceso es discontinuo, en un tanque ocurre primero la reacción, seguida de una fase de sedimentación (Moreno, 2006).

Los tratamientos biológicos de aguas residuales se clasifican dependiendo de las funciones metabólicas y forma de asociación de los microorganismos. Según sus funciones metabólicas se clasifican en **aerobios** en los cuales los microorganismos requieren de oxígeno para desarrollarse, es decir, utilizan el oxígeno como aceptor de electrones para degradar los contaminantes; **anóxicos** que emplean microorganismos que se desarrollan en ausencia o bajas concentraciones de oxígeno molecular, disponen del oxígeno liberado de otros elementos en forma atómica, de especies químicas como  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{-2}$ ,  $\text{PO}_4^{-3}$ , el

oxígeno de la molécula es empleado entonces como aceptor final de electrones en la degradación de contaminantes; **anaerobios** en el que los microorganismos se desarrollan en ausencia total de oxígeno. Generalmente, los procesos aerobios tienen como ventaja su elevada velocidad de reacción, así como sus altas remociones de DQO; por otra parte, los anaerobios pueden conservar su actividad metabólica por largos periodos de ayuno y soportan altas cargas orgánicas (Fonseca, 2002; Moreno, 2006).

De acuerdo a la forma de asociación de los microorganismos, los procesos biológicos se clasifican en **crecimiento suspendido**, en el que los microorganismos responsables del tratamiento se mantienen en suspensión en el líquido por métodos de mezcla; en general se utilizan en ambientes aerobios, aunque también se puede hacer en ambientes anaerobios. Al proceso con biomasa suspendida se le conoce comúnmente como lodos activados. Proceso de **crecimiento fijo**, donde los microorganismos responsables de la conversión del material orgánico o nutriente están adheridos a un material inerte que se encuentra flotando en el agua residual. Este tipo de crecimiento se basa en la formación de biopelículas. Procesos de **lecho móvil**, el cual es una combinación de biomasa fija y suspendida (Fonseca, 2000; Moreno, 2006).

### 1. 3. Sistema de lodos activados

El sistema de lodos activados es el proceso biológico de más amplio uso para el tratamiento de aguas residuales orgánicas e industriales (Moreno y Buitrón, 2004). En este sistema han surgido algunas variantes con el tiempo, dándole una versatilidad que le permite adaptarse a un amplio campo de circunstancias operacionales. Este es un proceso biológico heterótrofo aerobio que involucra la producción de una masa de microorganismos capaz de estabilizar un residuo (Metcalf & Eddy, 2003).

El principio básico de operación del sistema de lodos activados consiste en poner el agua residual en contacto con una población microbiana mixta, en forma de suspensión floculenta en un sistema aireado y agitado (Metcalf & Eddy, 2003), a la cual generalmente se refiere como licor mezclado de sólidos suspendidos (MLSS, por sus siglas en inglés *mixed liquor suspended solids*) o licor mezclado de sólidos suspendidos volátiles (MLSSV, por sus siglas en inglés *mixed liquor suspended solids volatile*) (EPA, 1999).

El material contaminante y los nutrientes disueltos en el agua residual se descomponen debido al metabolismo microbiano, proceso conocido como **estabilización**. En este proceso, parte del material nutriente se oxida a sustancias simples como bióxido de carbono mediante la **mineralización** y parte se convierte en materia nueva celular microbiana con la **asimilación**. Parte de la masa microbiana se

descompone también de la misma manera, durante la **respiración endógena**. El proceso oxidativo suministra la energía necesaria para los procesos de adsorción y asimilación (Fonseca, 2002).

Una vez que se alcanza el grado de tratamiento que se desea, la masa microbiana se separa del agua residual por sedimentación; el sobrenadante es el agua residual tratada que debe estar libre de lodos. La mayor parte del lodo asentado en la etapa de sedimentación se regresa a la etapa de aeración para mantener la concentración de lodos en el tanque de aeración al nivel necesario para un tratamiento efectivo. En un sistema balanceado, el lodo desechado representa la cantidad neta de masa microbiana por asimilación en la etapa de aeración (Metcalf & Eddy, 2003).

Una de las características importantes de los lodos activados es la formación de agregados de bacterias (flóculos), que se unen debido a un mucílago segregado por ellas mismas con capacidad absorbente (Atlas, 2002), esta característica permite la adsorción de la materia en suspensión, coloidal o iones dentro del agua residual, así como la separación rápida, eficiente y económica del lodo (Moreno, 2006). Los microorganismos que llevan a cabo la degradación de la materia orgánica tienden a organizarse en un consorcio microbiano, el cual se puede definir como un sistema de dos o más miembros donde cada organismo hace algo en beneficio del otro (Madigan *et al.*, 1997). Debido a esta asociación en los consorcios es posible que un mismo microorganismo prolifere con mayor velocidad comparado con su respectivo cultivo puro (Moreno, 2006).

En los flóculos de los lodos activados existe una dinámica poblacional muy intensa; sin embargo, los microorganismos generalmente interactúan de manera positiva o negativa (la neutralidad es poco frecuente). Para entenderlas, se puede hacer un esquema muy simplificado, entre las descripciones más comunes se emplean interacciones entre dos poblaciones de la comunidad (tabla 1.4.). Sin embargo, si sólo se consideran interacciones individuales de los microorganismos dentro del flóculo, estas pueden revelar muy poca información del comportamiento de una comunidad compleja, ya que cada población dentro de la comunidad puede estar involucrada en varias de ellas (Bull y Slater, 1982). Además, estas interacciones están en constante cambio y son sujetas a cambios debidos al ambiente (Moreno, 2006).

Debido a las dificultades asociadas en interacciones específicas basadas en los efectos de las comunidades microbianas, muchos investigadores han clasificado miembros de las comunidades por sus funciones básicas. Brock (1966) divide a las especies de microorganismos por su interacción ya sea en dominantes, asociadas e incidentales. Las dominantes son aquellas poblaciones que tienen un impacto importante en la comunidad, las asociadas dependen de las dominantes para su supervivencia y las incidentales son aquellas especies más o menos indiferentes a las acciones de las dominantes o de las asociadas (Grady, 1985).

**Tabla 1. 4.** Clasificación de interacciones entre microorganismos basada en sus efectos.

Efecto del microorganismo <i>a</i> sobre el microorganismo <i>b</i>	Efecto del microorganismo <i>b</i> sobre el microorganismo <i>a</i>		
	Positivo	Negativo	Ninguno
<b>POSITIVO</b>	Sinergismo Mutualismo	Parasitismo Parasitoidismo Depredación verdadera	Comensalismo
<b>NEGATIVO</b>	Parasitismo Parasitoidismo Depredación verdadera	Competencia	Amensalismo
<b>NINGUNO</b>	Comensalismo	Amensalismo	Neutralismo

Fuente: Bull y Slater, 1982

Los lodos activados están formados por bacterias, hongos, protozoarios y nemátodos. Por lo general las bacterias realizan la función de degradar el sustrato. Sin embargo, las actividades metabólicas de otros organismos son igualmente importantes, por ejemplo los protozoarios y rotíferos actúan como depuradores de efluente. Los protozoarios depredan bacteria dispersas que no han floculado y los rotíferos consumen cualquier partícula biológica que no ha sedimentado, existen hongos que también pueden ser degradadores por ejemplo *Phynorochaete* y *Rhizopus* (Moreno, 2006).

## 1. 4. Aclimatación

La aclimatación es el primer paso para biodegradar sustancias tóxicas en una planta de tratamiento de aguas residuales (Moreno-Andrade y Buitrón, 2004). La adaptación de los microorganismos a compuestos orgánicos es una fase muy importante, especialmente para los compuestos que son recalcitrantes (Buitrón y Capdeville, 1995) ya que su adecuada aclimatación ha sido la clave para alcanzar su biodegradación (Spain y Van, 1983).

La aclimatación se puede definir como el intervalo de tiempo a partir de la introducción del compuesto orgánico en determinado ambiente, hasta el momento en el que se hace evidente la remoción del mismo (Moreno-Andrade y Buitrón 2004). Wiggings *et al.* (1987) explican que durante esta fase existen una selección y multiplicación de microorganismos especializados, en donde, además pueden ocurrir transformaciones fisiológicas en el sistema metabólico (Moreno-Andrade y Buitrón, 2004). Generalmente la inducción de enzimas ocurre en periodos relativamente cortos (de minutos a días), mientras que cambios más fundamentales, por ejemplo, modificación de la estructura de enzimas o la aparición de mutantes normalmente es mucho más largo (de semanas a años) (Buitrón y Capdeville, 1995).

Durante la aclimatación se multiplican microorganismos que poseen una actividad enzimática necesaria para biodegradar un sustrato en particular. Después de la aclimatación, disminuye considerablemente el

tiempo de degradación y aumenta la tasa específica de degradación (Moreno-Andrade y Buitrón, 2004), aumenta la afinidad del consorcio de los microorganismos para biodegradar compuestos tóxicos y las habilidades adquiridas para degradar un químico pueden ser inducidas para metabolizar un grupo con estructuras químicas similares al compuesto al que fue aclimatado (Ye *et al.*, 2003). La principal ventaja lograda en la aclimatación es la interacción entre todas las especies presentes en el flóculo (Buitrón *et al.*, 1998).

Cuando se realiza el tratamiento biológico de aguas residuales, es necesario tener en cuenta que la aclimatación no es permanente. La exposición de la comunidad aclimatada a periodos prolongados sin sustrato (ayuno) produce una disminución de la actividad e incluso la muerte de algunos de ellos (Coello *et al.*, 2003). La variación del sustrato también provoca un decremento en la actividad de los microorganismos (Buitrón y Moreno, 2004).

## **1. 5. Reactores Discontinuos Secuenciales**

Los reactores discontinuos secuenciales o SBR (del inglés *Sequencing Batch Reactor*) es una alternativa que ha sido utilizada para el tratamiento de efluentes industriales (Buitrón *et al.*, 2004). Existen metodologías que logran incrementar y mantener la capacidad metabólica de los microorganismos aerobios responsables de la remoción de contaminantes tóxicos. Los SBR son utilizados para manipular la distribución de los microorganismos en el reactor y su estado fisiológico. En particular han sido usados para eliminar compuestos específicos en efluentes industriales (Buitrón y Capdeville, 1995).

El término SBR se ha usado como un sinónimo de tecnología de tratamiento de aguas residuales (Buitrón *et al.*, 2001), en su forma mas simple está constituido por un tanque que funciona bajo el sistema de vaciado/llenado; el tanque se llena durante un periodo dado y en seguida se pone a funcionar como un reactor en lotes, cada tanque efectúa las funciones de igualación, aireación y decantación en una secuencia con respecto al tiempo; es decir, los SBR varían de acuerdo con una estrategia de funcionamiento periódico y no en función del espacio como en el caso de los procesos convencionales, en donde el proceso se realiza en tanques separados (Buitrón y Ortiz, 1997).

El control del sistema se puede llevar a cabo a través de captores de nivel, de temporizadores o de medios computarizados. La purga de los lodos generados se lleva a cabo al final de la fase de reacción o de la decantación (Buitrón y Ortiz, 1997).

Se ha visto que los reactores SBR aerobios presentan ventajas con respecto a los reactores continuos por su mejor eficiencia y flexibilidad. Los reactores pueden trabajar con biomasa suspendida o fija. En general el proceso del SBR presenta tres importantes características (Buitrón *et al.*, 2004):

- ◆ Repeticiones periódicas de una secuencia de fases bien definidas;
- ◆ Planeación de la duración de cada fase del proceso con respecto al resultado del tratamiento;
- ◆ El progreso de varias reacciones biológicas y físicas en función del tiempo

Un ciclo clásico del proceso SBR opera bajo cinco fases bien definidas (Figura 1.1.) (Buitrón *et al.*, 2004):

- Llenado.** Durante esta fase se agrega el agua residual al reactor, el cual puede contar con un sistema de mezclado, o mezclado y aeración para promover reacciones biológicas con el agua residual.
- Reacción.** En esta etapa se lleva a cabo la biodegradación del material orgánico, la biomasa consume el sustrato bajo condiciones ambientales controladas.
- Sedimentación.** Aquí se lleva a cabo la separación de los sólidos en suspensión, para dar lugar a un líquido clarificado que degrada como efluente. En este tipo de reactores esta etapa es mucho más eficiente que un reactor de flujo continuo debido a que el contenido del reactor está en total reposo.
- Decantación.** Esta es la fase donde se elimina el agua clarificada del reactor.
- Tiempo muerto.** Esta etapa se aplica en procesos en serie; permite que cada uno de los reactores concluya adecuadamente su tiempo de llenado sin afectar a los demás. En algunos casos esta etapa sirve para prolongar la etapa de reacción en caso de existir variaciones continuas de flujo y concentración.

El sistema SBR presenta las siguientes ventajas con respecto a los procesos continuos (Irvine y Ketchum, 1989; Wanner, 1992; Brenner *et al.*, 1992):

- ◆ Establecimiento de un consorcio de microorganismos estable y con altos rendimientos;
- ◆ Flexibilidad en la conducción de su operación: en estos procesos la degradación de los compuestos se realiza en función del tiempo. En caso de haber un choque de concentración (aporte puntual de un tóxico) se puede prolongar la duración del tratamiento;
- ◆ Se disminuyen los costos de inversión, pues el mismo tanque sirve de reactor y de sedimentador;
- ◆ Se mejora la decantación de la biomasa debido a la operación cíclica del reactor. Los índices de decantación malos, si es que existen, son menores que los que presentan los procesos continuos;
- ◆ La flexibilidad para implementar estrategias de control y una automatización total del proceso.

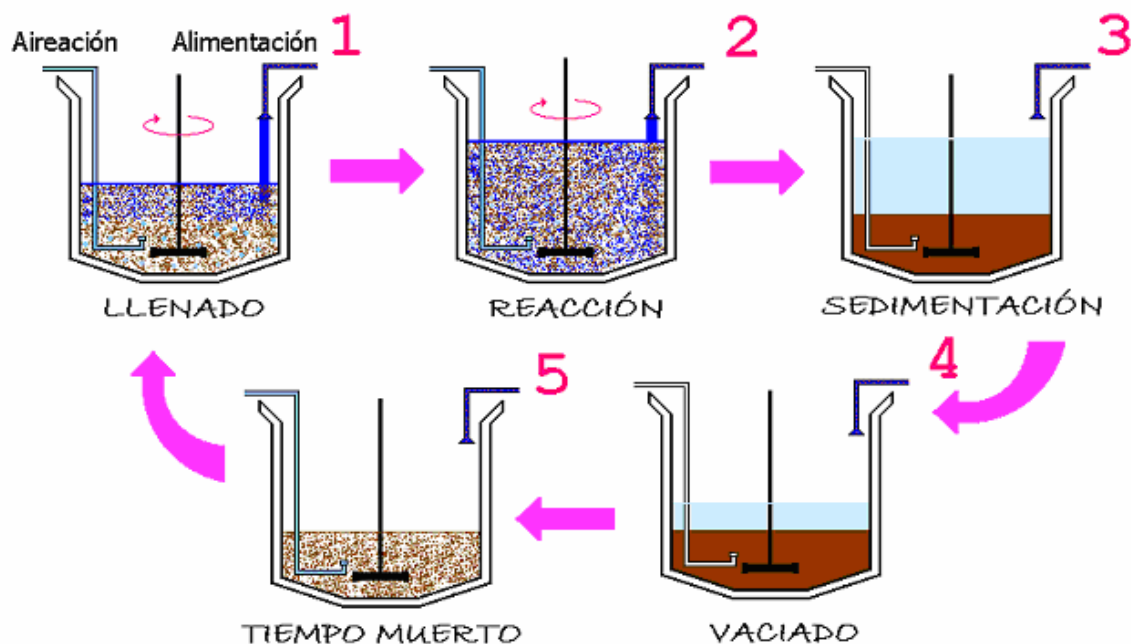


Figura 1. 1. Etapas de un reactor discontinuo secuencial

Este tipo de tecnología ha sido normalmente aplicada en efluentes con flujos pequeños, han demostrado ser una opción eficiente para el tratamiento de efluentes industriales con una alta variabilidad en flujos y concentración de compuestos tóxicos. Lo anterior hace posible la degradación de aguas residuales industriales que normalmente desestabilizarían la operación de los sistemas convencionales como lo son los procesos continuos por ejemplo los lodos activados (Wilderer *et al.*, 2001).

## 1. 6. Tratamiento de Efluentes Industriales

El aumento de la población y el desarrollo industrial durante el siglo pasado han elevado la presencia de contaminantes a niveles críticos. A escala industrial se producen grandes cantidades de compuestos xenobióticos para distintos fines, que se caracterizan por su estructura química o grupos funcionales que los hacen recalcitrantes y por eso persisten en el medio y entre los más recalcitrantes sufren el proceso de magnificación en las redes tróficas. Este proceso se inicia con los microorganismos y causa la acumulación en niveles tróficos superiores (carnívoros), donde provoca graves daños ecológicos (Atlas, 2002).

Algunos de estos compuestos xenobióticos, con grupos halógenos y nitrogenados, utilizados como propelentes, refrigerantes, disolventes, bifenoles policlorados, plásticos, detergentes, explosivos y plaguicidas, son difícilmente degradados por medio del tratamiento de aguas residuales convencionales. Algunos de ellos se degradan muy lentamente, de modo co-metabólico, sólo en presencia de un segundo



sustrato, que es empleado como fuente primaria de energía, o dan lugar a residuos, a veces poliméricos, peligrosos para el ambiente. Las principales vías de degradación de este tipo de compuestos son a) el compuesto sirve como sustrato de crecimiento, b) la sustancia sirve de donador de electrones o c) el compuesto es degradado por cometabolismo (el compuesto degradado no es parte del metabolismo) (Atlas, 2002). Además, hay que considerar que algunas de las sustancias que componen los efluentes industriales no son tóxicas por sí mismas, sino en el proceso de biotransformación que ejercen en ellas los microorganismos presentes en el ambiente o dentro de organismos superiores, se forman compuestos de toxicidad aún mayor a sus precursores (Jiménez, 2002).

La gran mayoría de las aguas industriales se pueden degradar por medio del empleo de microorganismos, sin embargo existen más de 70,000 compuestos xenobióticos, muchos de los cuales son difíciles de degradar por medio de procesos biológicos convencionales. Generalmente cuando estos compuestos se encuentran en un agua residual industrial, el tratamiento biológico presenta problemas debido a la poca biodegradabilidad y los efectos tóxicos que estos pueden tener sobre la biomasa (y en general sobre los seres vivos) (Moreno, 2006). En muchos casos la biodegradación de estos compuestos es muy lenta, y son requeridas condiciones ambientales muy específicas (pH, potencial redox, temperatura, etc.). La posibilidad de que un compuesto tóxico sea degradado va a depender principalmente de la presencia de un microorganismo especializado y de la aclimatación (Aelion *et al.*, 1989). La selección conveniente del inóculo y del método de aclimatación a los compuestos tóxicos es necesaria especialmente para el arranque de reactores aerobios que tratan efluentes industriales (Moreno y Buitrón, 2004).

## 1. 7. Compuestos amino aromáticos

Entre los compuestos aromáticos más comunes que se encuentran en las aguas residuales industriales son los que contienen grupos amino; estos se utilizan principalmente en la industria de productos farmacéuticos, tejidos, peletería, peluquería, fotografía y como compuestos intermedios en la fabricación de tintes. Las aminas aromáticas pertenecen a una clase de productos químicos derivados de los hidrocarburos aromáticos, como benceno, tolueno, naftaleno, antraceno y difenilo, por sustitución de al menos un átomo de hidrógeno por un grupo amino  $-NH_2$ . Constituyen un amplio grupo de compuestos químicos de gran interés desde el punto de vista técnico y comercial. La anilina es la amina aromática más simple; consta de un grupo  $-NH_2$  unido a un anillo de benceno y es la que más se emplea en la industria (CICS, 2007).

En los procesos aerobios las aminas aromáticas son biodegradadas al incorporarse oxígeno molecular al anillo aromático por medio de enzimas mono o dioxigenasa antes del rompimiento del anillo y después el oxígeno sirve como aceptor final de electrones (O'Neill *et al.*, 2000). El mecanismo que sigue la

mineralización de las aminas es primero la hidroxilación y luego la desaminación oxidativa o bien la desaminación oxidativa en la primera etapa metabólica seguida de una hidroxilación posterior, debido a que el grupo amino es el centro de reacción primario de los derivados aminoaromáticos. El anillo aromático es abierto sólo después de que el grupo amino ha sido eliminado y remplazado por un grupo hidroxilo. Muchas aminas aromáticas presentan acoplamiento oxidativo (polimerización) en ambientes aerobios (Parris, 1980), por ejemplo el p-aminofenol, lo que hace difícil su degradación requiriendo de tiempos muy largos para que la población microbiana adquiera habilidad degradativa (Melgoza, 2001).

El p-aminofenol es un compuesto cristalino poco volátil (figura 1.2.), se utiliza para teñir telas, cabello, pieles y plumas, en el revelado fotográfico, en la industria farmacéutica y en la fabricación de antioxidantes y aditivos para el aceite (Merk index, 2007), se sintetiza a partir de la fenilhidroxilamina (Sone *et al.*, 1981) y también por la transformación microbiana de hidroxilaminobenceno (Schenzle *et al.*, 1997), 4-nitrofenol (O' Connor y Yung, 1996) y anilina (Cerniglia *et al.*, 1981); se produce en el metabolismo de la anilina en los eritrocitos de humanos, ratas y el hígado de hámster (Mieyal *et al.*, 1976; McCarthy *et al.*, 1985; Ulgen *et al.*, 1994). Es un compuesto altamente tóxico y cancerígeno (Ahmed *et al.*, 2001). Este compuesto no penetra fácilmente en el organismo, aunque puede actuar como sensibilizante cutáneo y causar dermatitis, es irritante para los ojos, cabeza y sistema respiratorio, puede causar una metahemoglobina grave que incluso ponga en peligro la vida (CICS, 2007; Afzal *et al.*, 2006).

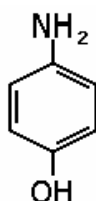


Figura 1. 2. Estructura química del p-aminofenol

La ruta de degradación del p-aminofenol seguida por los microorganismos es poco conocida (Ahmed *et al.*, 2001), sin embargo, Takenaka *et al.* (2003) proponen una ruta metabólica seguida por *Burkholderia sp.* (figura 1.3.)

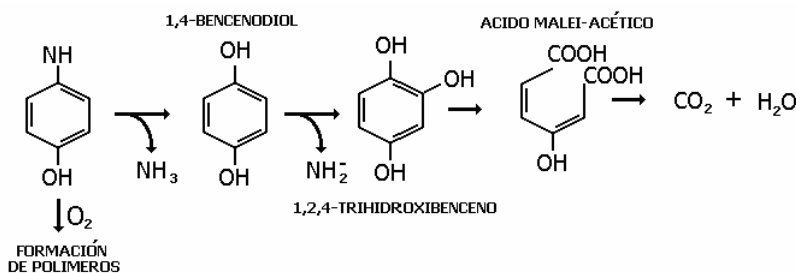
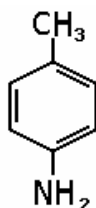


Figura 1. 3. Ruta de degradación del p-aminofenol propuesta por Takenaka *et al.* (2003)

Otro compuesto comúnmente encontrado en residuos de industrias farmacéuticas y textiles es la p-toluidina. Este compuesto es un sólido incoloro, el cual se utiliza en fabricación de los tintes (figura 1.4.). Se forma durante la combustión de los plásticos y en la degradación de los poliuretanos, también se forma como subproducto durante la reducción de explosivos TNT.



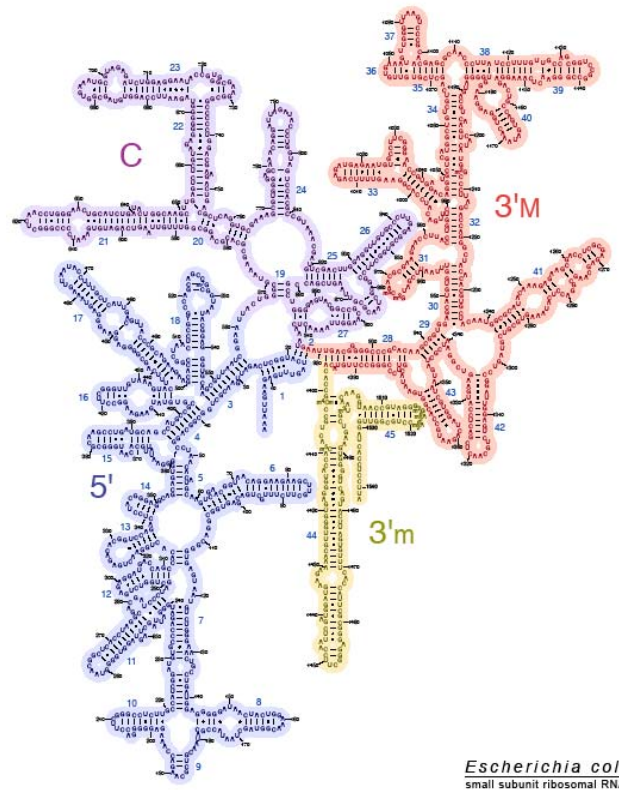
**Figura 1. 4.** Estructura química de la p-toluidina

Este compuesto se absorbe con suma facilidad a través de la piel o por inhalación del polvo, humo o vapor, irrita los ojos y la piel, puede causar daño en la sangre, vejiga y riñón, dando lugar a lesiones del tejido, los efectos pueden aparecer de forma no inmediata. Es un potente formador de metahemoglobina y la intoxicación aguda puede ir acompañada de hematuria microscópica o macroscópica. Existen pruebas suficientes de su efecto cancerígeno en animales (ICSC, 2007).

## 1. 8. Identificación de cambios en la comunidad microbiana

Las técnicas convencionales de microbiología han proporcionado gran información de la biodiversidad de comunidades microbianas en sistemas naturales y de ingeniería (Bitton, 2005). Sin embargo, los métodos convencionales presentan el problema de que más del 95% de las especies se pierden pues no pueden ser identificadas muchas bacterias que no son cultivables o crecen en sustratos muy específicos; además, los cultivos pueden favorecer el crecimiento de otros microorganismos que no son importantes en la muestra original (Sanz, 2007).

Una solución a este problema es el uso de la biología molecular; las técnicas se basan en los mecanismos intrínsecos que los microorganismos utilizan para sintetizar los ácidos ribonucleicos; en este caso, se utiliza la subunidad menor 16S de los ribosomas de las bacterias (principales degradadores), debido a que es considerada como un “reloj evolutivo” por su universalidad y abundancia en todos los seres vivos (>10<sup>3</sup>-10<sup>5</sup> ribosomas/bacteria), así como el hecho de que se trata de una molécula muy conservada a lo largo de la evolución lo que permite comparar organismos dentro de un mismo dominio, pero que también presenta regiones altamente variables, lo que permite hacer diferenciaciones a nivel de especie (Figura 1.5.) (Rodicio *et al.*, 2004).



**Figura 1. 5.** Estructura secundaria del ARNr 16S de *Escherichia coli*. (Brosius *et al.*, 1978)

La enorme ventaja de las técnicas basadas en esta molécula es que permite estudiar la biodiversidad de un sistema natural de una manera rápida, sencilla y completa ya que no se necesita un aislamiento previo (Sanz, 2007). Las principales técnicas moleculares empleadas en el análisis de comunidades bacterianas son: La clonación y secuenciación del ARNr 16S, la hibridación *In-situ* con sondas de ADN fluorescentes (FISH: Fluorescent *In-situ* hybridisation) y las técnicas de huella genética (Dabért *et al.*, 2002):

- El Análisis de restricción del ARNr amplificado, ARDRA (*Amplified rDNA Restriction Analysis*) y Polimorfismo de fragmentos de restricción, T-RFLP (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*) que hace la separación de los moléculas del ARNr del 16S de acuerdo con el tamaño de los fragmentos de ADN obtenidos por la restricción enzimática.
- El Polimorfismo de hebra única, SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*) que emplea fragmentos de ADN de hebra simple de acuerdo a la diferencia en su estructura secundaria.
- El análisis de restricción de espacios intergénicos del rADN, RISA (*rADN Intergenic Spacer Analysis*) emplea la diferencia de tamaños de los espacios intergénicos de un microorganismo a otro del ARNr del 16S- ARNr de 23S. En estas técnicas los resultados de la comunidad microbiana se

pueden mostrar como un patrón de picos (SSCP, T-RFLP) o como un patrón de bandas (ARDRA, T/DGEE, RISA).

- La electroforesis en gel con gradiente desnaturizante, DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) y la electroforesis en gel con gradiente de temperatura TGGE (*Thermal Gradient Gel Electrophoresis*) usan las diferencias del ADN de doble hebra dependiendo de su contenido de GC para separar el rARN del 16S dentro de un gradiente de desnaturización ya sea químico para DGGE o térmico para TGGE.

Las técnicas de huella genética tienen gran aplicación para el seguimiento de comunidades durante la operación de reactores, así mismo son ideales para seguir la dinámica de población y la comparación de poblaciones a lo largo del tiempo. Han sido empleadas para estudio de reactores metanogénicos (Hirahishi, 1991; Delbés *et al.*, 2000; Zumstein *et al.*, 2000) y al seguimiento de reactores continuos (Lapara *et al.*, 2000; Ueno *et al.*, 2001) y discontinuos (Dabért *et al.*, 2001).

La técnica de DGGE es una técnica eficaz para estudiar la biodiversidad, composición y evolución de comunidades microbianas. La DGGE se basa en la diferente movilidad electroforética de fragmentos de DNA partidamente desnaturizados con igual longitud pero diferente secuencia, permite obtener un patrón de bandas reflejo de la diversidad genética presente en la comunidad microbiana. Estos perfiles se caracterizan por el número, posición (ausencia o presencia de bandas particulares) e intensidad relativa de las bandas, donde cada banda representa una especie diferente. El número de bandas corresponde con el número de miembros predominantes y su secuenciación y posterior análisis filogenético dan una buena perspectiva sobre la composición de dicha comunidad (Felseke *et al.*, 1998; Maier *et al.*, 2000).

Este método no sólo permite la identificación de las bacterias, sino también la cuantificación relativa de las mismas en la muestra. Los perfiles pueden ser utilizados en métodos estadísticos para determinar dominancia, frecuencia, proporciones relativas, entre otros indicadores de diversidad de la comunidad bacteriana. Estos indicadores pueden ser utilizados en estudios de dinámica poblacional y permiten observar cambios ecológicos o ambientales (Muyzer, 1995).

Con el desarrollo en el uso de herramientas moleculares para aplicaciones microbianas, la ciencia ambiental ha expandido su interés en el funcionamiento general de microorganismos para entender la presencia y el papel de especies de bacterias específicas en sistemas de tratamientos biológicos. Para mejorar la respuesta de una comunidad microbiana a la degradación de compuestos tóxicos, es importante conocer como está conformada la comunidad y determinar qué poblaciones interactúan en este tipo de procesos ya que en muchos casos el éxito de los tratamientos biológicos se debe a la presencia de especies de microorganismos específicos (Moreno, 2006).

---

# Objetivos e Hipótesis

---

## 2. 1. Objetivo general

Evaluar la biodegradación de los compuestos p-aminofenol y p-toluidina por medio de un reactor discontinuo aerobio.

## 2. 2. Objetivos particulares

1. Evaluar la aclimatación de los microorganismos a los compuestos amino-aromáticos por medio del seguimiento de los parámetros físico-químicos en un reactor discontinuo aerobio
2. Evaluar la biodegradación de los compuestos amino-aromáticos por medio del seguimiento de los parámetros físico-químicos en un reactor discontinuo aerobio
3. Registrar cambios en la comunidad de microorganismos durante la aclimatación y la degradación de los compuestos amino-aromáticos

## 2. 3. Hipótesis

La operación en lotes del reactor permitirá la aclimatación y formación de consorcios de microorganismos con la capacidad de degradar el p-aminofenol y la p-toluidina presentes en aguas residuales. Esto involucrará una serie de cambios en la comunidad microbiana en la que solo permanecerán los microorganismos adaptados a las condiciones del sistema.

## 3. 1. Sistema experimental

El diseño experimental se dividió en dos etapas, la primera consistió en la evaluación de la degradación del compuesto p-aminofenol y la segunda en la evaluación de la degradación del compuesto p-toluidina. Para cada etapa se utilizó un reactor aerobio discontinuo secuencial (Applikon) de 7 L de capacidad y un volumen útil de 4 L (figura 3.1.), el reactor estuvo conectado a un BioControlador (Applikon ADI 1030 Bio Controller) que controló la agitación (150 rpm), la temperatura (20°C), el pH ( $7 \pm 0.2$ ) y el oxígeno disuelto (90%). Se mantuvieron concentraciones cercanas a la saturación del oxígeno en la etapa de reacción por medio de la inyección de aire. La homogenización de la biomasa se realizó a través de la agitación y aireación del reactor.



**Figura 3.1.** Sistema utilizado para la biodegradación de los compuestos amino aromáticos

## 3. 2. Agua residual empleada

Para cada etapa se empleó agua residual sintética con 50 mg/L de p-aminofenol o 50 mg/L p-toluidina respectivamente como única fuente de carbono y energía, esta concentración se mantuvo durante todo el proceso. Además se agregaron nutrientes como nitrógeno, fósforo y oligoelementos (tabla 3.1.). Los

microorganismos en un tratamiento biológico necesitan de macro y micronutrientes para llevar a cabo sus funciones metabólicas en la degradación de contaminantes (Burgess, 2001). Cuando el agua residual no contiene la cantidad adecuada de nutrientes es necesario adicionarlos de forma directa ya que su deficiencia provoca baja remoción de contaminantes (Jefferson, 2001).

**Tabla 3.1.** Composición del medio mineral

Nombre del compuesto	Formula	Concentración (mg/L)
Fosfato Monobásico de Potasio	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	25.5
Fosfato Dibásico de Potasio	$\text{K}_2\text{HPO}_4$	32.6
Cloruro de Amonio	$\text{NH}_4\text{Cl}$	7.5
Fosfato Dibásico de Sodio Heptahidratado	$\text{NaHPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	75.4
Sulfato de Magnesio Heptahidratado	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	8.7
Cloruro de Calcio Dihidratado	$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	36.4
Cloruro Férrico Hexahidratado	$\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0.3

Fuente: AFNOR (1985)

### 3. 3. Arranque del biorreactor

El biorreactor fue inoculado con microorganismos provenientes de una planta de tratamiento de aguas residuales municipales (2000 mg/L de SSV), se recomienda este tipo de inóculos ya que contiene una mayor diversidad bacteriana (Spain *et al.*, 1983; Watson, 1993; Moreno *et al.*, 2004). Durante la aclimatación y operación del reactor se agregó en cada ciclo 4 L del agua residual sintética y se tomaron los parámetros físico-químicos diariamente, como la concentración del PAF o PT, DQO, COD,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{NO}_3$ , SSV, SST, VS, IVL,  $q$  y TECO. El tiempo de degradación fue seguido por medio de la medición de la concentración de sustrato en el medio.

### 3. 4. Aclimatación de los microorganismos

Para la aclimatación de los microorganismos a la degradación de p-aminofenol en la primera etapa y a la p-toluidina en la segunda etapa, se comenzó con bajas concentraciones del compuesto, ya que si se ingresa una concentración elevada del toxico la aclimatación no podría llevarse acabo (Moreno-Andrade y Buitrón, 2004). Es importante remarcar que se ha observado que la inhibición no solo esta en función de la concentración inicial del compuesto toxico, sino también de la concentración inicial de la biomasa, y en general se recomienda iniciar la aclimatación con valores bajos en la relación sustrato/microorganismos para evitar la inhibición (Moreno-Andrade y Buitrón, 2003). Se aclimató con 50 mg/L de p-aminofenol y 50 mg/L de p-toluidina mediante la estrategia de tiempos de reacción variables (y eficiencias fijas), en la cual la fase de reacción fue variable y detenida cuando la remoción del sustrato era igual o mayor al 95% (Moreno y Buitrón, 2004). Debido a lo anterior se evaluó continuamente la cinética de degradación de



manera que cuando el compuesto tóxico fuera removido, se inició un nuevo ciclo, alimentando nuevamente el reactor. Una vez que los tiempos de degradación estabilizaron y la actividad de los microorganismos se mantuvo constante, se consideró que los microorganismos estaban aclimatados (Moreno, 2006).

### 3. 5. Cinéticas de degradación.

Una vez estabilizados los tiempos de reacción se procedió a realizar cinéticas de degradación para conocer la evolución de la concentración del PAF o PT, DQO, COD,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{NO}_3$ , en diferentes ciclos, a los cuales se les tomaron los parámetros fisicoquímicos cada hora para los ciclos mayores a 5 horas y cada 30 minutos para los ciclos menores a 4 horas. Después de la primera cinética de degradación se realizaron ciclos de 11 horas mientras se automatizaba el reactor.

### 3. 6. Automatización

Una vez aclimatados los lodos y obtenidos los tiempos de reacción por medio de las cinéticas de degradación se ajustaron los tiempos de reacción y se automatizó la operación del reactor con un Timer (*Chrothrol*). El tiempo asignado para las diferentes fases en cada ciclo fue el siguiente: llenado 3 min, sedimentación 30 min, vaciado 9 min. El tiempo de reacción varió dependiendo la velocidad con la que los microorganismos degradaban el compuesto (Figura 3.2.).

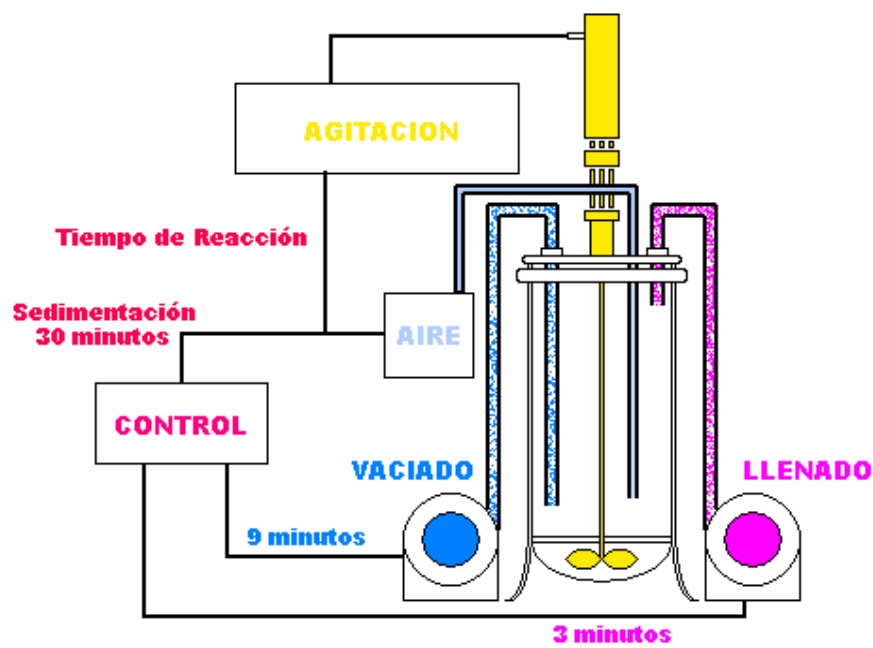


Figura 3.2. Sistema automatizado utilizado para la biodegradación de los compuestos amino aromáticos

### 3. 7. Operación del reactor.

Una vez automatizado el reactor se ajustaron los tiempos de reacción dependiendo del tiempo que los microorganismos tardaban en degradar el compuesto, se utilizó como base las cinéticas de degradación, éstas se realizaban cada semana para observar si el tiempo de degradación había cambiado, de ser así se ajustaban nuevamente. Durante la operación automatizada, el reactor realizó de 4 a 8 ciclos por día (según el tiempo de reacción), de los cuales se analizó solo un ciclo por día y al cual se le tomaron todos los parámetros físico-químicos.

### 3. 8. Métodos de análisis

#### 3. 8. 1. p-aminofenol

Para determinar la presencia de p-aminofenol, se midió por medio de la técnica colorimétrica de la 4-aminoantipirina (APHA, 2005). Se tomaron 50 mL de la muestra a la que se agregó 1.25 mL de solución buffer de  $\text{NH}_4\text{OH}$  con pH: 7.9, 500  $\mu\text{l}$  de 4-aminoantipirina y 500  $\mu\text{l}$  de ferrocianuro de potasio obteniéndose una solución colorida, se agitaba entre cada reactivo. Se dejó reaccionar por 15 minutos y finalmente se midió la capacidad de absorción en el espectrofotómetro HACH a 500 nm, con la ayuda de un blanco al cual le fueron agregados de la misma forma los reactivos.

#### 3. 8. 2. p-toluidina

La concentración de la p-toluidina fue medida por medio de un espectrofotómetro de luz ultravioleta (UV), se tomaban 2 mL de la muestra y se pasaban por un filtro microfibra de vidrio de 1  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro promedio (Whatman) a una celda del espectrofotómetro y se leían a 287 nm.

Las cinéticas se analizaron por medio de cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC, por sus siglas en inglés *High Performance Liquid Chromatographic*), se tomaron muestras de 5 mL y se filtraron en celdas para HPLC, el cual analizó 2  $\mu\text{l}$  de la muestra a 287 nm, como resultado del análisis se obtuvieron cromatogramas que relacionan la capacidad de absorción del compuesto en función del tiempo, los picos para la p-toluidina aparecía a los 6 minutos, el software del HPLC nos proporcionaba el área bajo el pico, este valor se relaciona con la concentración del compuesto.

#### 3. 8. 3. Nitrógeno amoniacal ( $\text{N-NH}_3$ )

El análisis se realizó con el método estandarizado 8083 descrito por HACH (2001). Se tomaron 25 mL de muestra a la que se agregaron tres gotas de estabilizador mineral, tres gotas de solución de un agente dispersante (alcohol polivinílico), y 1 mL de reactivo de *Nessler*, se dejó reaccionar un minuto; se agitó

entre cada solución. Una vez transcurrido el tiempo de reacción se leyó en el espectrofotómetro HACH a 425 nm, con la ayuda de un blanco al cual también le fueron agregados los reactivos mencionados.

#### **3.8.4. Nitrógeno de nitrito (N-NO<sub>2</sub>)**

El análisis fue realizado por medio del método estandarizado 8507 descrito por HACH (2001), se tomó una muestra de 10 mL, se le adicionó el contenido de Nitriver 3 *Nitrite Reagent Powerd Pillow*, se agitó vigorosamente por 5 minutos y se dejó reaccionar 20 minutos. Finalmente se midió la capacidad de absorción en el espectrofotómetro HACH a 507 nm, con la ayuda de un blanco el cual también se le agregó el reactivo Nitriver 3.

#### **3. 8. 5. Nitrógeno de nitrato (N-NO<sub>3</sub>)**

El análisis se realizó con el método estandarizado 8039 descrito por HACH (2001). En 25 mL de la muestra se adicionó el contenido de Nitraver 5 *Nitrate Reagent Power Pillow*, se agitó vigorosamente por un minuto y se dejó reaccionar por 5 minutos. Una vez realizada la reacción se midió la capacidad de absorción en el espectrofotómetro HACH a 500 nm, con la ayuda de un blanco de agua destilada al que también se le agregó el reactivo Nitraver 5.

#### **3. 8. 6. Demanda química de oxígeno**

La demanda química de oxígeno (DQO) se utiliza como una medida del equivalente de oxígeno consumido por las materias oxidables en una muestra que es susceptible de ser oxidada por un agente químico fuerte bajo las condiciones de la prueba. Se utilizaron viales preestablecidos con dicromato potásico y ácido sulfúrico en un rango de 0 – 1500 mg DQO/L. A cada vial se le agregaron 2 mL de la muestra cuidando de inclinar el vial a 45°. Se invierte suavemente por la tapa varias veces para mezclar perfectamente el contenido. Es importante mezclar por completo antes de introducir los viales al reactor HACH para evitar así un calentamiento local en el fondo de la celda y una posible reacción explosiva.

Se colocó el vial dentro del reactor HACH precalentado a una temperatura de 150°C, se efectuó la digestión por 2 horas, después se apagó el reactor y se dejaron pasar 20 minutos para que los viales se enfriaran a una temperatura de 120°C. Posteriormente se invirtieron cada uno de los viales de forma suave mientras aun estaban calientes y se enfriaron hasta un intervalo de 30 – 40°C. Por último las muestras se leyeron en el espectrofotómetro HACH a 620 nm con el método No. 435. Se utilizó un blanco agregando a un vial 2 mL de agua destilada (APHA, 2005; HACH, 2002)

### 3. 8 .7. Carbono orgánico disuelto

El carbono orgánico disuelto (COD) se utiliza para detectar la concentración del p-aminofenol o p-toluidina durante la degradación. La muestra se paso por un filtro microfibra de vidrio de 1µm de de diámetro de poro promedio (*Whatman*), y el análisis se realizó por medio de un analizador del carbono orgánico total.

### 3. 8. 8. Respirimetría

Con el fin de conocer la evolución de la actividad respirométrica, se midió la tasa específica de consumo de oxígeno (TECO). En un mini reactor de 160 mL se le agregó 10 mL de los microorganismos del SBR tomados justo después de que la degradación llegara a su fin. y una solución saturada de oxígeno con nutrientes y sustrato (acetato, PAF o PT) y se monitoreo la cantidad de oxígeno disuelto en el reactor durante 15 minutos. La respiración endógena fue medida utilizando solo el medio mineral, es decir, sin ninguna fuente de energía. La TECO fue determinada por medio de la pendiente obtenida al graficar la concentración de oxígeno en función del tiempo y dividida por la concentración de SSV.

En el tratamiento biológico existen dos fases dentro del metabolismo microbiano: la primera en la asimilación, en la cual se consume la materia orgánica disponible y la segunda es la respiración endógena, se caracteriza por el consumo que realizan las bacterias de su propia biomasa, a modo de reserva para poder continuar con sus funciones vitales, de tal modo que decrece su materia.

La TECO reportada representa el consumo exógeno debido a la degradación del sustrato y fue calculada con la ecuación 3.1.

$$TECO = TECO_T - TECO_{end} \quad (3. 1.)$$

Donde: TECO es la tasa específica de consumo de oxígeno exógena,  $TECO_T$  es la tasa específica de consumo total (evaluada en la respirometría con sustrato) y  $TECO_{end}$  es la tasa específica de consumo endógeno (evaluada en la respirometría sin sustrato).

### 3. 8. 9. Caracterización de los lodos activados

Para la caracterizar los lodos activados que se emplearon como inóculo se determinaron los siguientes parámetros: Sólidos suspendidos totales (SST), sólidos suspendidos volátiles (SSV), índice volumétrico (IVL) y velocidad de sedimentación de los lodos (VS) (APHA, 2005).

### 3. 8. 9. 1. Sólidos suspendidos

Primero, a los filtros se les debe eliminar la humedad colocándolos en una estufa a 105°C durante 24 horas, después se enfriaron y se colocan en un desecador con sílica gel. Por ultimo se pesaban y registraba su peso, debían regresar al desecador para mantener su peso constante.

Los sólidos totales, es la expresión aplicada a los residuos de material que quedan en un recipiente, después de la evaporación de una muestra y subsecuente secado en la estufa. En un sistema de vacío se filtraron 10 mL del MLSS, el filtro se pasó a una bandeja de aluminio y se introdujo en una estufa a 105°C por una hora. Posteriormente se dejó enfriar y se registró su peso (APHA, 2005). Los sólidos suspendidos totales (SST) se determinaron restando la masa del filtro solo (F) a la masa del filtro después de la estufa (Fe) y se dividió entre el volumen de la muestra (ec. 3.2). Las unidades reportadas fueron mg/L.

$$SST = \left( \frac{Fe - F}{\text{muestra mL}} \right) 1000 = \text{mg/L SST} \quad (3. 2.)$$

Sólidos suspendidos volátiles o sólidos fijos es la expresión aplicada al residuo de los sólidos suspendidos totales después de someterse a ignición, la pérdida de peso corresponde a los sólidos suspendidos volátiles (APHA, 2005). Después de haber pesado los filtros (Fe) se introdujeron en una mufla a una temperatura de 500°C por 30 minutos, inmediatamente después se colocaron en otra estufa a 100°C para disminuir su temperatura, en seguida se pasaron al desecador durante 15 minutos y finalmente se registra su peso. Los sólidos suspendidos volátiles son la diferencia entre el peso registrado después de la estufa (Fe) menos el peso registrado después de la mufla (Fm) y dividiéndolo entre el volumen de la muestra (ec. 3.3), las unidades expresadas fueron las mismas.

$$SSV = \left( \frac{Fe - Fm}{\text{muestra mL}} \right) 1000 = \text{mg/L SSV} \quad (3. 3.)$$

### 3. 8. 9. 2. Índice volumétrico y velocidad de sedimentación

El índice volumétrico de lodos (IVL) se define como el volumen ocupado por 1 gramo de sólidos suspendidos volátiles después de dejar decantar la biomasa por 30 minutos en una probeta graduada de 1000 mL (Ramalho, 1993). La velocidad de sedimentación (VS) es la distancia que recorren las partículas que flocculan a medida que sedimentan en una probeta graduada de 1000 mL en función del tiempo.

En la probeta se agregaron 1000 mL de MLSS, se mezcló perfectamente y se determinó la distancia recorrida por la interface sólido-líquido durante 10 minutos para calcular la velocidad de sedimentación por medio de la pendiente de la curva resultante al graficar la distancia en función del tiempo. Por último se dejó transcurrir 30 minutos y se tomó la lectura hasta donde sedimentó el lodo, para calcular el índice volumétrico se dividió este valor entre los SSV.

### 3. 9. Técnicas de biología molecular

Para el seguimiento de la comunidad de microorganismos, se tomaron muestras de 15 mL de lodos al inicio de la operación, posteriormente, cada semana al final de cada ciclo durante la aclimatación y operación del reactor y en la fase final del reactor, estas muestras se centrifugaron (3500 rpm) por 3 minutos para eliminar la mayor cantidad de líquido posible.

#### 3. 9. 1. Extracción del ADN.

El ADN fue extraído a partir de muestras 2 mL del lodo centrifugado, se utilizó un kit del aislamiento de ADN (Ultra clean™ Soil DNA isolation kit, MoBio) (Anexo).

#### 3. 9. 2. Amplificación del ADN

Se emplearon técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*) para amplificar la región V3 del rRNA 16S (Anexo).

#### 3. 9. 3. Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante

Los productos de PCR fueron separados por la técnica de electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE, por sus siglas en inglés *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), usando el sistema *D-code universal mutation detection system* (BioRad, Hercules, CA) según lo descrito por Muyzer *et al.* (1995). Se utilizó un gel de acrilamida con un gradiente desnaturizante de urea y formamida de 42.5 a 62.5% (tabla 3.2.), el gel se corrió a 65V por 960 minutos en TAE 1X manteniéndolo a una temperatura de 60°C. Una vez obtenido el gel se tiñó en una solución de bromuro de etidio por 1 h. Posteriormente, se expuso el gel a luz ultravioleta; se fotografió y procesó la imagen del gel en un fotodocumentador Kodak (Gel Logic 200 Imaging system 15L10).

**Tabla 3. 2.** Soluciones para la preparación del gel de acrilamida con gradiente desnaturizante. Las concentraciones de 42.5 y 62.5% de formamida y urea se prepararon por separado.

Solución	42.5%	62.5%
40% Acrilamida/Bis (mL)	20	20
50X TAE Buffer (mL)	2	2
Formamida (mL)	17	25
Urea (g)	17.9	26.3
Agua Destilada (mL ) aforar a	100	100

---

# Resultados y Discusión

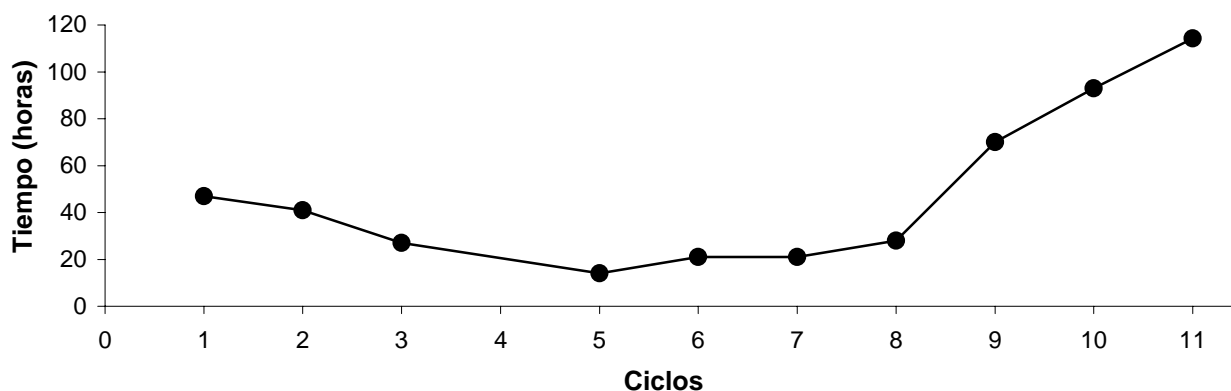
---

## 4. 1. Biodegradación de p-aminofenol (PAF)

### 4. 1. 1. Tiempo de Reacción

El reactor fue operado en un periodo de 26 días (12 ciclos), la aclimatación de la biomasa se alcanzó en 9 días, siguiendo como criterio la estabilización de las eficiencias de remoción mayores al 90% que correspondió al ciclo 6 de operación del reactor. La temperatura se mantuvo estable durante la operación con valores de  $19.8 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  ( $\bar{x} \pm 1 e$ ). Así mismo los valores de pH fueron estables ( $7.3 \pm 0.1$ ).

A medida que la biomasa se aclimataba, existió una disminución en el tiempo de reacción para la degradación del PAF. El tiempo inicial fue de 47 h, sin embargo conforme los microorganismos se aclimataron a la degradación del sustrato tóxico, el tiempo de degradación disminuyó a un tiempo entre 14 y 21 h (Figura 4.1.).



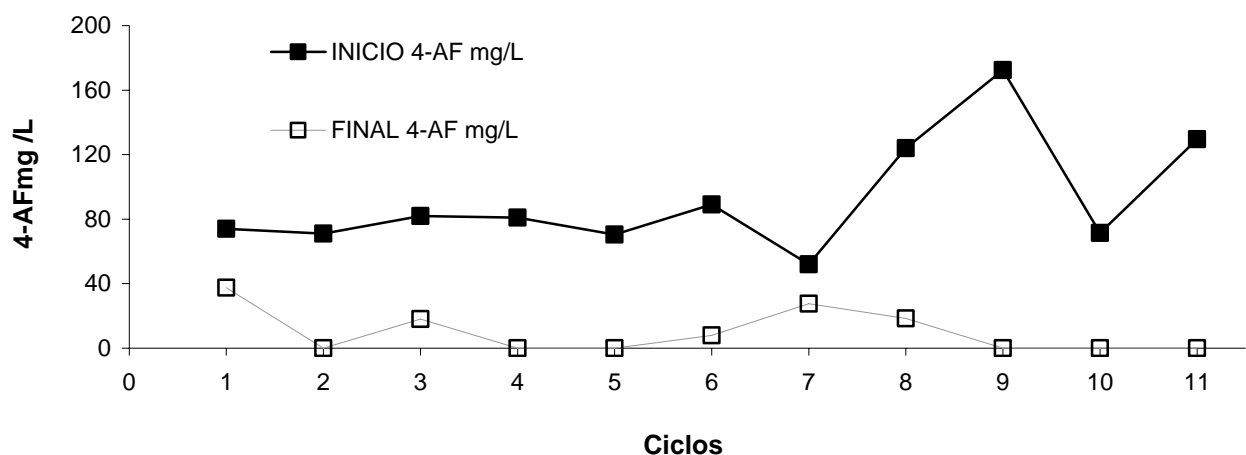
**Figura 4. 1.** Tiempo de reacción que se requirió para llevar a cabo la degradación del p-aminofenol durante la aclimatación (ciclos 1 al 6) y operación del reactor (7 al 11)

Este comportamiento se observó en tres ciclos consecutivos. Sin embargo, hay un aumento gradual en los tiempos de la fase de reacción de 21 a 114 horas en los últimos 5 ciclos. En estos ciclos se observó una coloración café oscuro de la biomasa y del MLSS. Se ha reportado que durante la degradación de aminas aromáticas y en especial en el PAF, se puede observar la formación de polímeros debido a la oxidación del compuesto tóxico con el oxígeno del medio (Melgoza, 2001). Este fenómeno provocó el aumento en

los tiempos de remoción debido a la acumulación de los polímeros formados, ya que estas moléculas son muy complejas haciendo muy difícil su biodegradación.

#### 4. 1. 2. Eliminación de p-aminofenol

La concentración inicial del PAF varió entre 70-90 mg/L. En los seis primeros ciclos se encontraron concentraciones en el efluente menores de 18 mg/L, habiendo una remoción del compuesto mayor del 90%. Después del ciclo 7, se inició una acumulación de sustrato, por lo cual las concentraciones iniciales de PAF se encontraban por encima de los 100 y 150 mg/L (ciclos 8 y 9 respectivamente), aunque se suministrara la misma concentración inicial, en el influente de estos ciclos se observó remoción total del sustrato. Esto se puede deber a la desaparición del compuesto original y al aumento en la concentración de compuestos poliméricos (Figura 4.2.). Cabe recordar que la forma de detectar el PAF fue por medio de la evaluación de los fenoles totales, por lo tanto, al existir una transformación del anillo aromático, existe una reducción en la concentración de los fenoles totales. Por lo anterior, una parte del PAF pudo no ser degradado biológicamente, sino acumulado en forma de polímeros en las paredes del reactor.

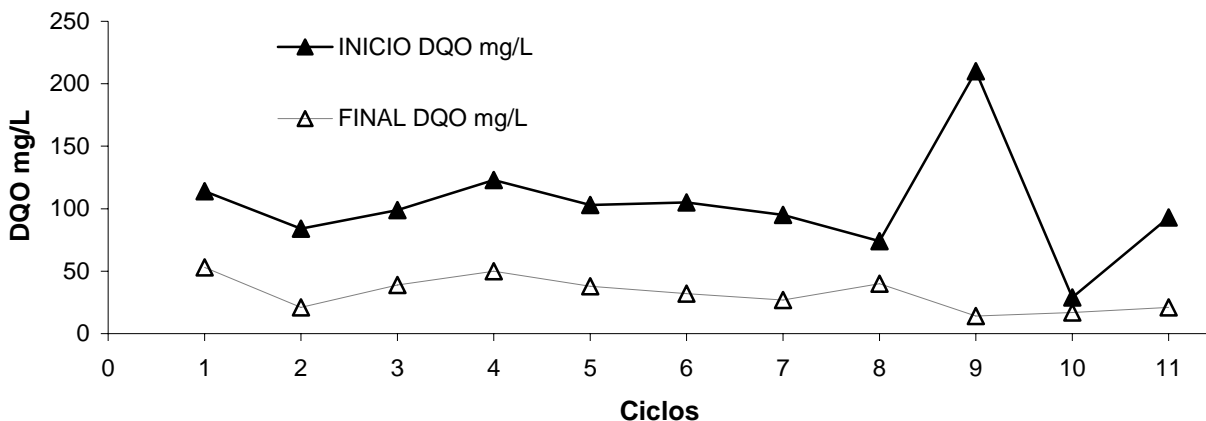


**Figura 4. 2.** Concentración del PAF al inicio y final de cada ciclo durante la aclimatación (ciclos 1 al 6) y operación del reactor (7 al 11)

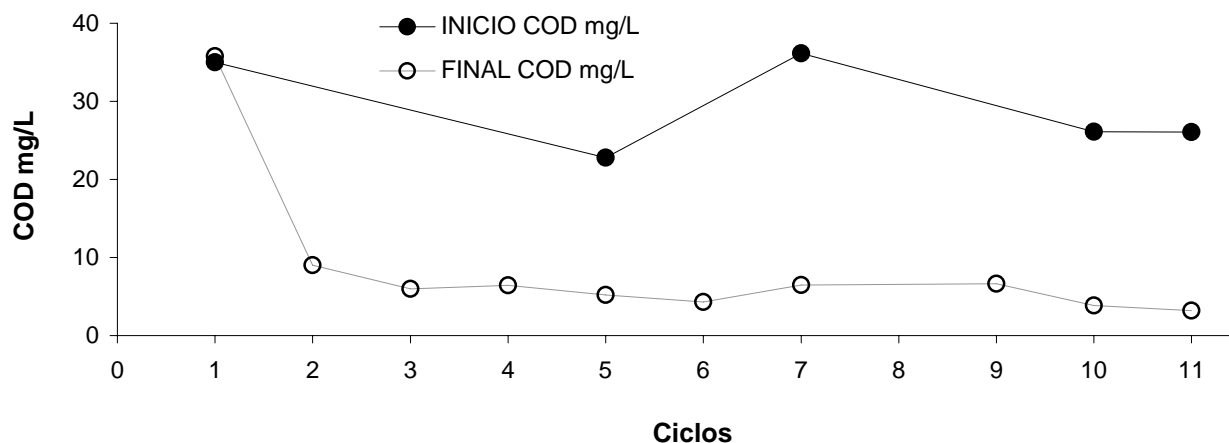
#### 4. 1. 3. Operación del biorreactor

La degradación del material orgánico se realizó por medio de la evaluación de la demanda química de oxígeno (DQO) y el carbono orgánico disuelto (COD). La figuras 4.3. y 4.4. muestran la eliminación de la DQO y COD durante la operación del reactor. En términos generales el biorreactor removió durante su operación entre el  $65 \pm 4.5$  % de la materia orgánica presente en el agua residual sintética medida como DQO y  $5.7 \pm 0.5$  % como COD. Sin embargo, la DQO residual en el efluente fue de  $32 \pm 4$  mg/L de DQO, lo cual indica que, a pesar de remover una gran parte de la DQO, es necesario un postratamiento del efluente para poder tener una mayor remoción de materia orgánica.





**Figura 4. 3.** Concentración de la DQO al inicio y final de cada ciclo durante la aclimatación y operación del reactor



**Figura 4. 4.** Concentración de la COD al inicio y final de cada ciclo durante la aclimatación y operación del reactor

La actividad de los microorganismos para degradar el PAF fue evaluada por medio de la tasa específica de degradación ( $q$ ). En la figura 4.5., se muestra el comportamiento de  $q$  durante la operación del biorreactor. Moreno-Andrade y Buitrón (2004), reportan que durante el proceso de aclimatación de los microorganismos a la degradación de sustancias tóxicas, existe un incremento exponencial en la tasa de degradación. Esto es debido a que durante la aclimatación la actividad de los microorganismos se incrementa hasta un valor máximo, lo cual a su vez se refleja en una disminución del tiempo de reacción. Una vez alcanzada la máxima actividad, ésta se mantiene constante. Es posible observar en la gráfica 4.5 que durante los primeros 6 ciclos de degradación la  $q$  se incrementa exponencialmente, manteniéndose en un valor de  $4.2 \pm 0.15$  mgPAF/gSSV/h entre los ciclos 3 y 6. La línea punteada representa la tendencia esperada para la  $q$  (la cual puede ser explicada por medio del modelo matemático planteado por Moreno, 2006). Sin embargo durante la degradación del PAF no se mantuvo estable la actividad de la comunidad

microbiana, debido a que la disponibilidad del compuesto se vio afectada debido a la polimerización del mismo, haciendo difícil que los microorganismos lo emplearan como fuente de sustrato. Lo anterior se refleja en una disminución en la  $q$  y por lo tanto un aumento en el tiempo de degradación de cada uno de los ciclos siguientes.

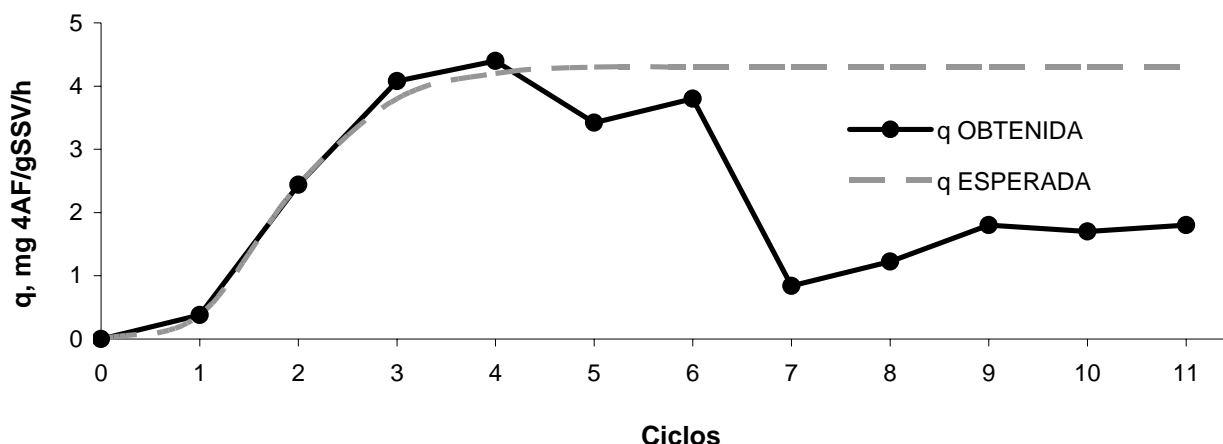


Figura 4. 5. Tasa específica de degradación durante la remoción del PAF en cada ciclo en la aclimatación y operación del reactor

#### 4. 1. 4. Comportamiento de la biomasa

La biomasa inicial inoculada en el reactor fue de 2000 mg de sólidos suspendidos volátiles (SSV). Durante el primer ciclo hay un importante disminución en la biomasa del reactor del 50% en los SST y SSV debido a la los efectos del compuesto tóxico sobre la biomasa. Durante la aclimatación los SSV se mantienen en promedio 1400mg/L, en el ciclo 7 se observa un ligero aumento de 17% (250mg/L), aunque en los siguientes ciclos empieza a verse una disminución gradual hasta un 60% de la biomasa aclimatada (Figura 4.6.).

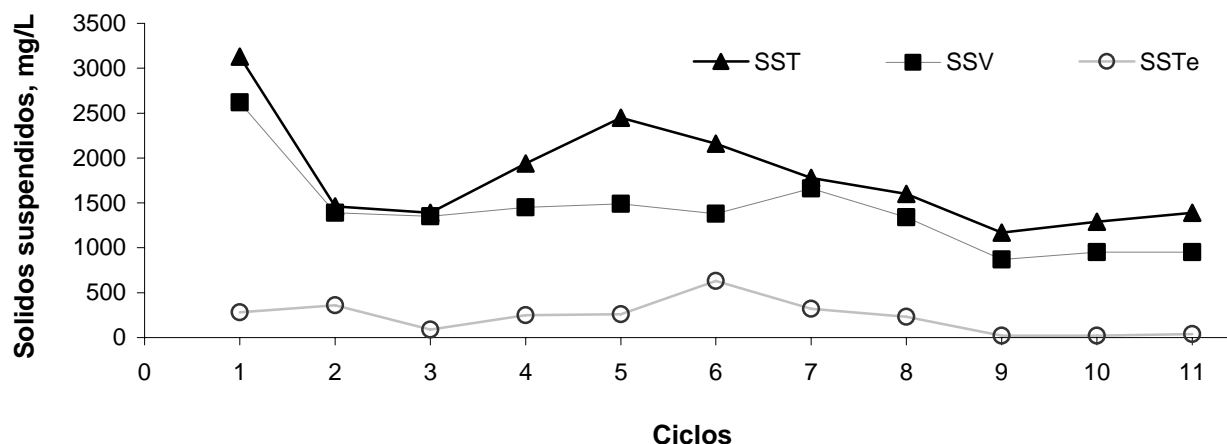


Figura 4. 6. Evolución de los SST y SSV durante la aclimatación y operación del reactor, y cantidad de SSTe en la salida del agua residual tratada

A pesar de la buena operación del reactor en la eliminación del sustrato, los sólidos suspendidos totales del efluente fueron de  $148 \pm 35$  mg/L, lo cual no cumple con la norma oficial mexicana (NOM-001-1996) que establece debe ser de tener un mínimo de 40 mgSST/L para la descarga en un río o uso público urbano.

El índice volumétrico de lodos (IVL) fue mejorando en cada ciclo, aunque no se alcanzó el nivel óptimo (Figura 4.7.), por lo cual para tener un tratamiento eficiente se requeriría de un sedimentador secundario para alcanzar niveles óptimos de eliminación de SST en el efluente. En cuanto a la velocidad de sedimentación la máxima que se alcanzó fue de 4 m/h. Los datos nos indican que a pesar de que la sedimentación de los lodos fué rápida, la compactación de los mismos era moderada, lo que explica la alta cantidad de sólidos suspendidos totales en el efluente. Se ha observado que la capacidad de floculación de la biomasa decrece con la disminución de la actividad microbiana o la muerte de los microorganismos (Coello Oviedo, 2003). Por lo cual la pérdida de actividad reportada en la  $q$  de los microorganismos puede explicar los altos valores en el IVL y la pérdida excesiva de SST en el influente.

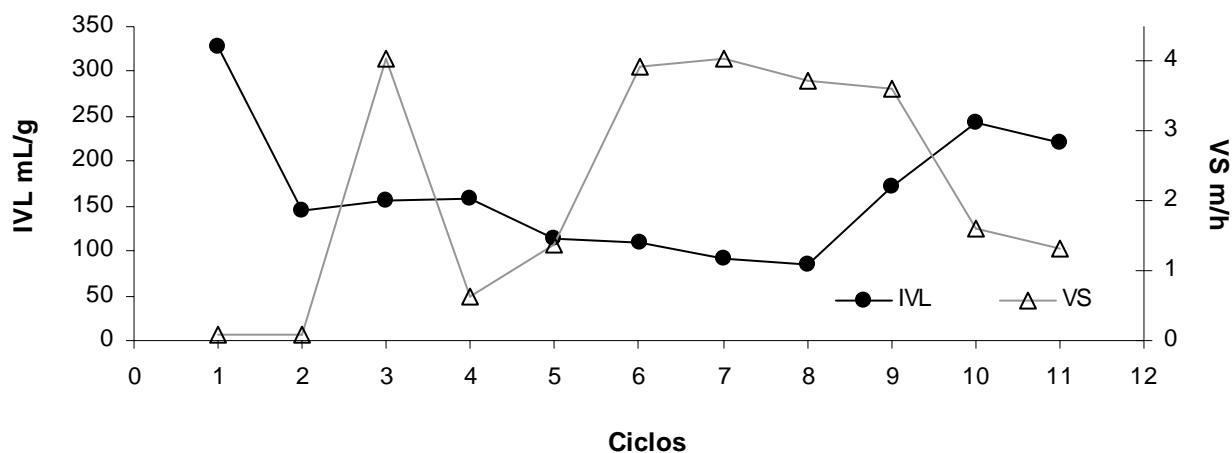
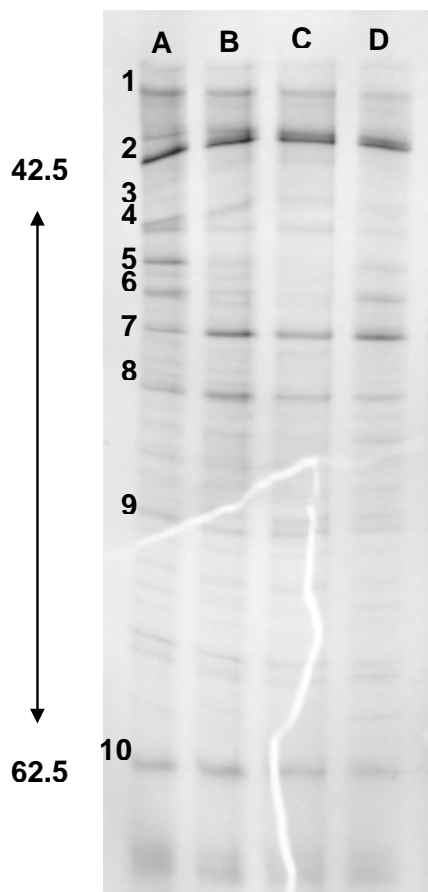


Figura 4.7. Comportamiento del IVL y VS de la biomasa durante la aclimatación y operación del reactor

#### 4. 1. 5. Evolución de la comunidad microbiana

Se obtuvo la región hipervariable V3 del gen del ARNr 16S por medio de la amplificación por PCR usando el ADN total obtenido con un kit de extracción de ADN de suelos. Los fragmentos de 200-pb derivados del producto de la amplificación por PCR fueron obtenidos según lo esperado. El número de las bandas individuales obtenidas en el DGGE se puede relacionar con el número de especies bacterianas en la muestra. La Figura 4.8. muestra la huella genética de la comunidad obtenida por DGGE durante el proceso de la aclimatación al PAF. Este análisis reveló una diversidad bacteriana moderada en la comunidad, más de 16 bandas del DGGE fueron visibles, lo cual sugiere que un mínimo de 16 especies bacterianas estaban presentes. Diez de las bandas detectadas fueron cortadas del gel y serán secuenciadas en un estudio posterior a esta tesis.



**Figura 4.8.** Evolución de la comunidad microbiana durante la degradación del PAF, la muestra A corresponde al inóculo, la B al ciclo 5 (14 h), la C al ciclo 9 (70 h) y la D al fin de la operación del reactor (114 h)

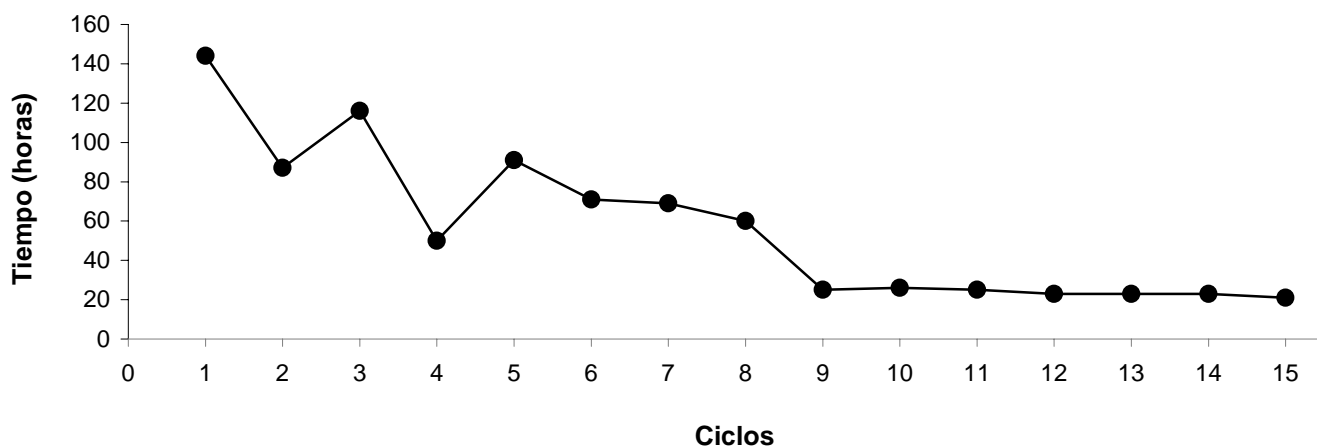
Es posible observar que al inicio de la aclimatación, existen 10 bandas (números en la Figura 4.8), las bandas 1 y 2 se mantienen durante toda la operación, lo cual puede sugerir que pertenecen a microorganismos que pueden sobrevivir o usar como fuente de carbono el p-aminofenol. A medida que la comunidad de microorganismos se aclimata, algunas especies tienden a desaparecer, como es el caso de las bandas 5 y 6. A pesar de que la técnica no es cuantitativa, nos puede dar una idea de lo que ocurre en la comunidad microbiana, por ejemplo, las bandas 7 y 8 incrementan su concentración, lo cual puede interpretarse como un incremento en el material genético de esta especie en particular, es decir esta especie ha tomado un rol dominante dentro de la comunidad. Debido a lo anterior, se puede discutir que los mecanismos de aclimatación que predominan son la selección y multiplicación microorganismos especializados en la degradación del p aminofenol (por ejemplo las especies de las bandas 7 y 8).

## 4. 2. Biodegradación de p-toluidina (PT)

### 4. 2. 1. Aclimatación de la biomasa.

#### 4. 2. 1. 1. Tiempo de reacción.

La aclimatación de los microorganismos se llevó a cabo en 30 días (ciclo 9) con una eficiencia de remoción mayor al 82%. La temperatura se mantuvo estable durante la operación con valores de  $19.8 \pm 0.5^\circ\text{C}$ . Así mismo los valores de pH fueron estables ( $7.3 \pm 0.1$ ). Durante la aclimatación hay una disminución gradual en los tiempos de reacción para la degradación de la PT. El tiempo inicial fue de 144 h, conforme los microorganismos se aclimataban al compuesto, el tiempo de degradación disminuyó a 25 h (Figura 4.9.). Este comportamiento se mantuvo en los siguientes seis ciclos consecutivos manteniendo los tiempos de reacción entre 26 a 21 h.



**Figura 4. 9.** Tiempo de reacción de cada ciclo para llevar a cabo la degradación de la PT durante la aclimatación

#### 4. 2. 1. 2. Operación del biorreactor

La degradación del material orgánico se realizó por medio de la evaluación de la demanda química de oxígeno (DQO) y el carbono orgánico disuelto (COD). Las figuras 4.10. y 4.11. muestran la eliminación de la DQO y COD. El biorreactor removió durante la aclimatación el  $72 \pm 0.9 \%$  de la materia orgánica presente en el agua residual medida como DQO y  $71 \pm 4 \%$  como COD. Alcanzada la aclimatación, la remoción aumentó a más del 90% en términos de DQO y más del 92% como COD.

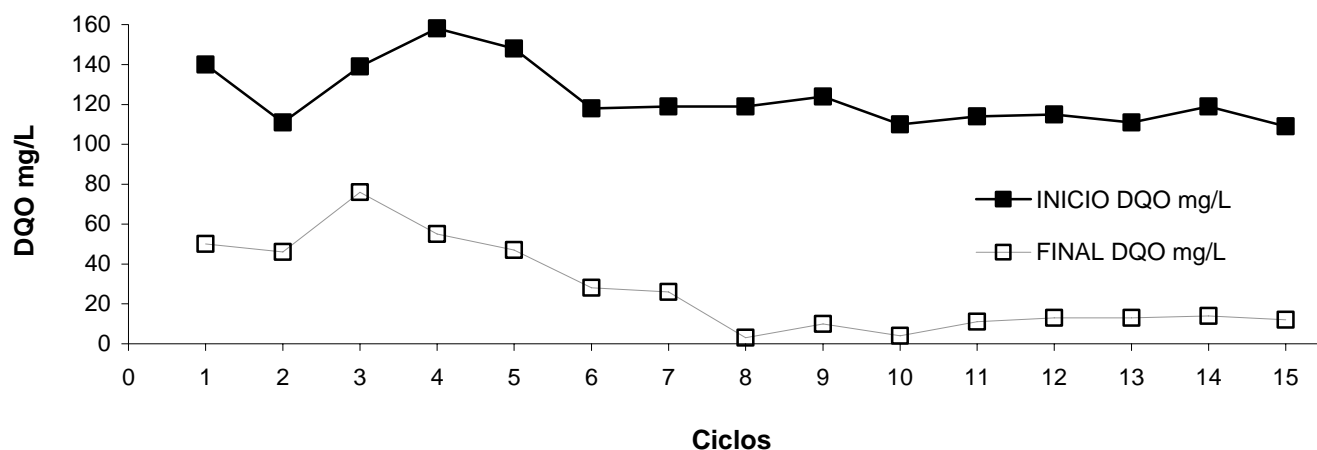


Figura 4. 10. Concentración de la DQO al inicio y final de cada ciclo durante la aclimatación

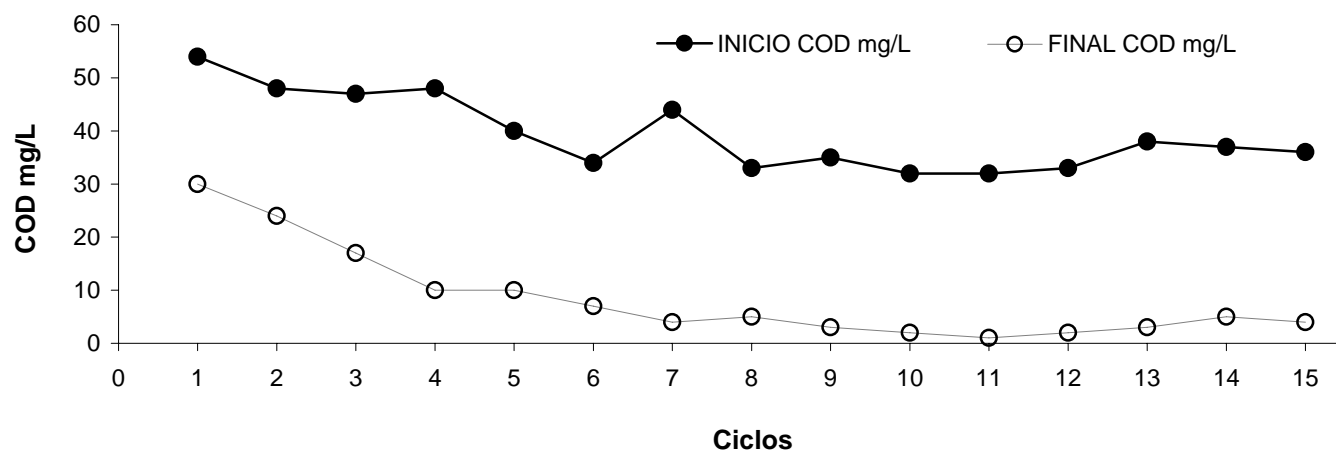
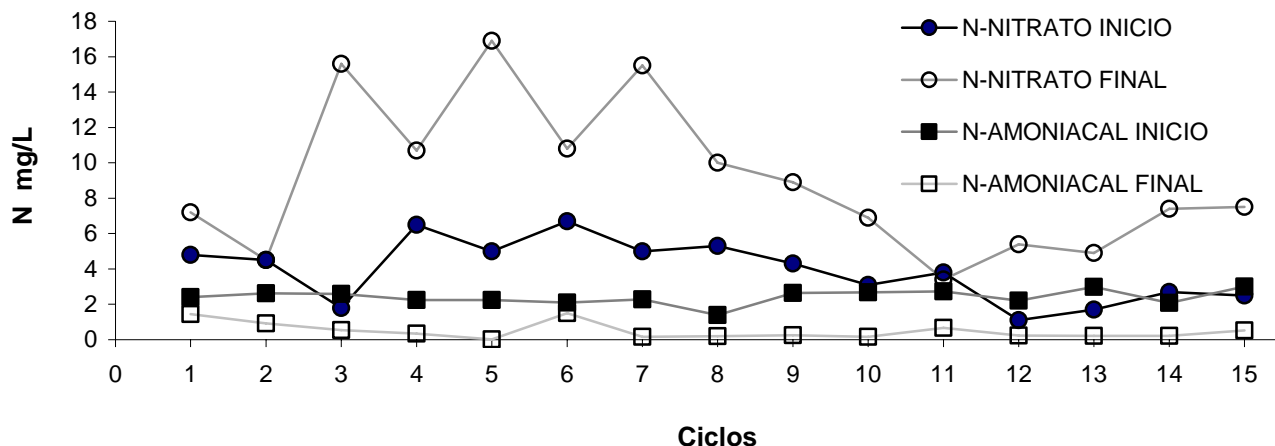


Figura 4. 11. Concentración de la COD al inicio y final de cada ciclo durante la aclimatación

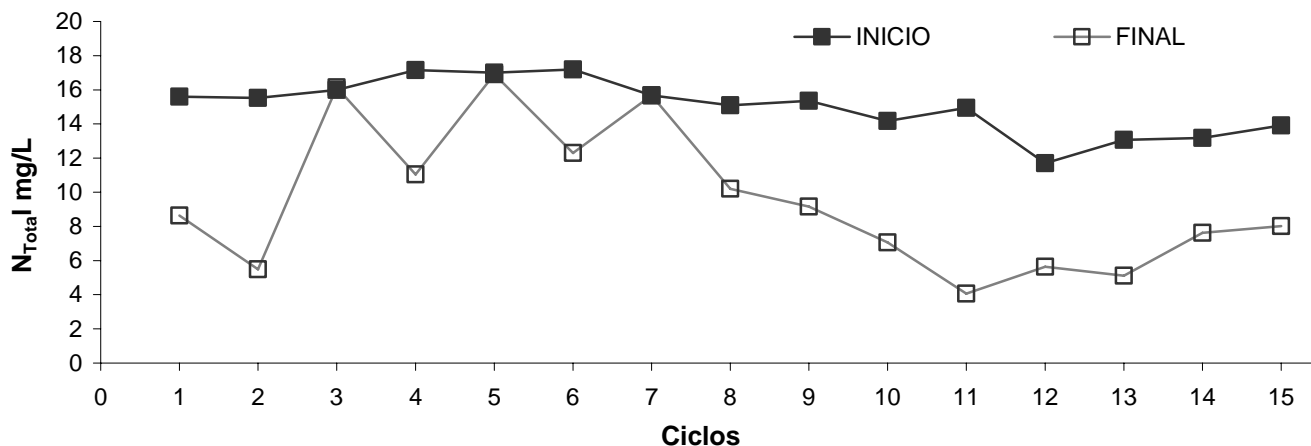
En la figura 4.12. se muestra la evolución del nitrógeno dentro del reactor durante la aclimatación, en nitrógeno-amoniaco ( $N-NH_3$ ), nitrógeno de nitratos ( $N-NO_3$ ). El nitrógeno de nitritos ( $N-NO_2$ ) solo se determinó en las cinéticas de degradación, ya que las concentraciones dentro del reactor no sobrepasan los 0.01 mg/L.



**Figura 4. 12.** Concentración de los nitratos y amoniaco al inicio y final de cada ciclo durante la aclimatación

Durante la aclimatación los niveles de N-NH<sub>3</sub> se encuentran arriba de los  $2.3 \pm 0.1$  mg/L, durante los 5 primeros ciclos se ve una disminución gradual (excepto en el ciclo 6 que conserva más o menos la concentración original), mientras que la concentración inicial del N-NO<sub>3</sub> se encuentra por encima de los  $4.9 \pm 0.5$  mg/L, para el caso de los nitratos es importante considerar que el agua utilizada desde su origen contenía concentraciones entre 0.4 y 5 mg/L; al final de cada ciclo durante la aclimatación el N-NH<sub>3</sub> disminuyó a  $0.6 \pm 0.2$  mg/L, mientras que el N-NO<sub>3</sub> aumenta a  $11.1 \pm 1$  mg/L, lo que indica que dentro del reactor se está llevando a cabo el proceso de nitrificación realizado también por las bacterias.

Durante la aclimatación el nitrógeno en el reactor en los dos primero ciclos se observa una pérdida del 50%, mientras que en los ciclos 4, 6, 8 y 9 se observa una disminución del 34% ( $6 \pm 0.3$  mg/L). Para los ciclos 3 5 y 7 no se registran perdidas. En los ciclo posteriores a la aclimatación se observa una pérdida del 54% ( $7 \pm 0.7$  mg/L) (Figura 4.13.).



**Figura 4. 13.** Nitrógeno obtenido en el balance al inicio y final de cada ciclo durante la aclimatación

### 4. 2. 1. 3. Actividad de los microorganismos

La actividad de los microorganismos para degradar la p-toluidina se evaluó por medio de la Tasa específica de degradación ( $q$ ) y su actividad respirométrica con la tasa específica de consumo de oxígeno (TECO). En la figura 4.14., se observa la evolución de  $q$  durante la aclimatación, hay un incremento exponencial de 0.3 mg/gSSV/h en el ciclo 1 a 4 mg/gSSV/h en el ciclo 9. Para el ciclo 15 se alcanzaron valores de 6 mg/gSSV/h. Durante la operación del reactor se observaron valores variables entre 15 y 34 mg/gSSV/h entre los ciclos 50 al 298. Esta tasa de degradación es superior a la reportada por Zhang *et al.* (2006).

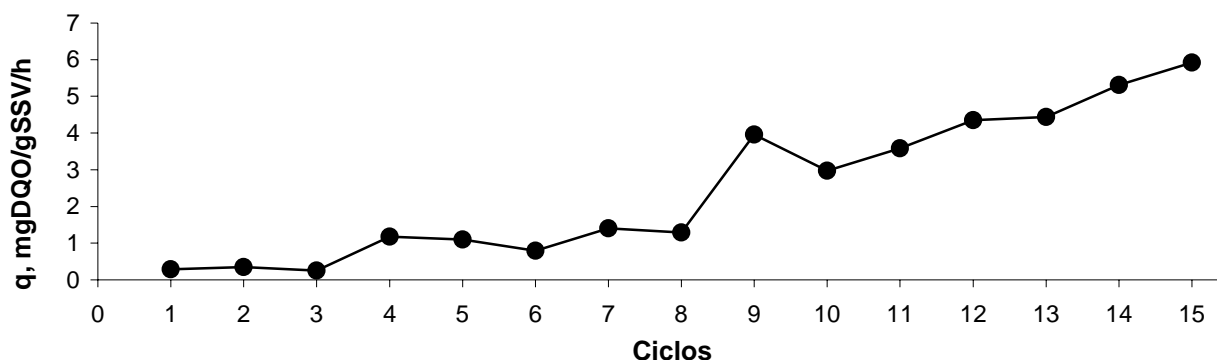


Figura 4. 14. Evolución de la tasa específica de degradación durante la aclimatación de los lodos a la PAF

Se evaluó la actividad respirométrica de los lodos durante la aclimatación, con el fin de conocer la actividad de los microorganismos empleando como sustrato PT y un compuesto fácilmente degradable (acetato de amonio). En la figura 4.15. se observa que la TECO del acetato ( $2.23 \pm 0.42$  mgO<sub>2</sub>/gSSV/h) es más alta que la TECO de la PT ( $0.8 \pm 0.2$  mgO<sub>2</sub>/gSSV/h), incluso esta preferencia tiende a aumentar en el ciclo 9, a pesar de esto, aunque al final de la aclimatación (ciclo 7) hay un ligero aumento en la TECO de la p-toluidina a 2.06 mgO<sub>2</sub>/gSSV/h. En ciclos posteriores la TECO del acetato fue de  $6 \pm 0.6$  mgO<sub>2</sub>/gSSV/h y para la TECO de la p-toluidina fue de  $1.31 \pm 0.2$  mgO/gSSV/h.

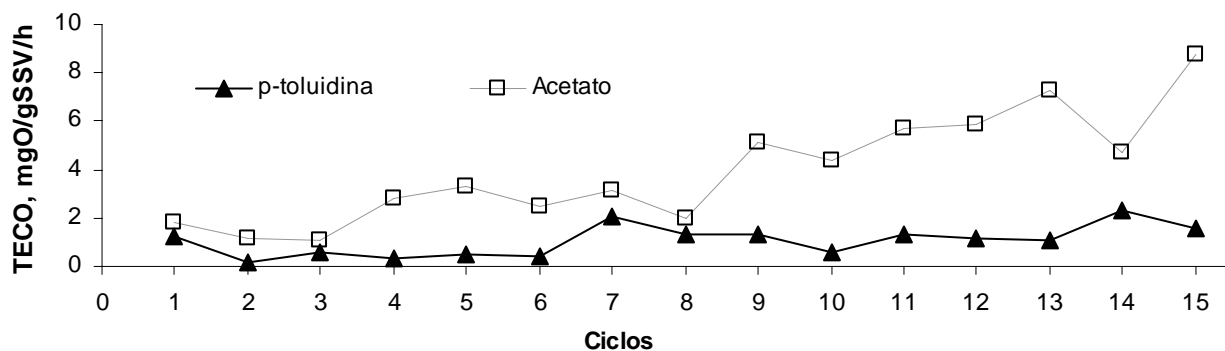


Figura 4. 15. Evolución de la tasa específica de consumo de oxígeno (TECO) durante la aclimatación de los microorganismos

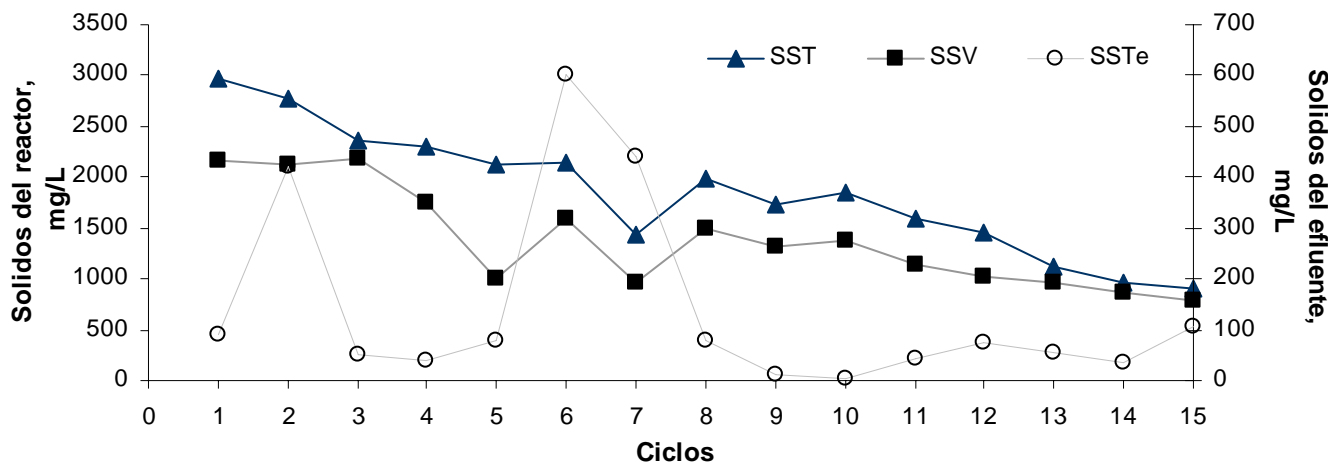


En este estudio se observa que durante la aclimatación la TECO del acetato es mayor a la TECO de la PT; TECO del acetato aumenta gradualmente, incluso en los ciclos posteriores, marcando notablemente la afinidad de los microorganismos para degradar el acetato, a pesar de esto, en la TECO de la p-toluidina se observo un ligero aumento. Moreno-Andrade y Buitrón (2004) observaron que la finalizar la aclimatación de la biomasa al 4-clorofenol la afinidad del consorcio para degradar 4CF aumenta, mientras que la capacidad el acetato disminuye. Para este caso no existe este punto, es decir la afinidad hacia el acetato aumenta durante y después de la aclimatación.

#### 4. 2. 1. 4. Comportamiento de la biomasa durante la aclimatación

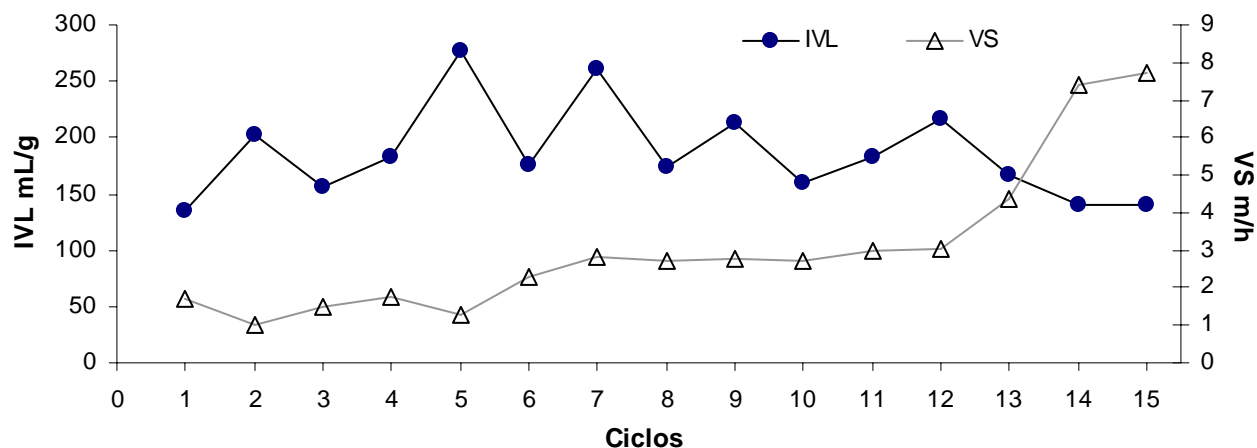
El inóculo inicial fue de 2000 mg/L de SSV, durante la aclimatación hay una disminución del 31% de la biomasa, manteniéndose en promedio  $1621 \pm 157$  mg/L de SSV (Figura 4.16.). En los ciclos posteriores continuó la disminución de la biomasa hasta llegar a tener 780 mg/L de SSV, hasta este momento después de la aclimatación se ha perdido el 40% de la biomasa.

En los sólidos suspendidos totales del efluente (SSTe) hay una gran variación de los valores durante la aclimatación, al inicio de la operación del reactor los SSTe eran de 90 mg/L, alcanzando niveles de 600 mg/L en el ciclo 6, en general, durante la aclimatación se encontraron  $201 \pm 73$  mg/L de SST. Sin embargo, en los ciclos posteriores se notó una considerable disminución encontrando  $43 \pm 10$  mg/L de SST en el efluente.



**Figura 4. 16.** Evolución de los sólidos suspendidos totales y volátiles en el biorreactor y solidos suspendidos totales en el efluente en cada ciclo durante la aclimatación a la PT

Durante la aclimatación se observaron variaciones en los niveles del índice volumétrico de lodos (IVL). Al inicio de la operación del reactor el IVL fue de 134 mL/g SSV, durante la aclimatación el IVL aumentó un 46% ( $197 \pm 15$  mL/gSSV). En ciclos posteriores el IVL disminuyó a 141 mL/gSSV en el ciclo 15 (Figura 4.17.).



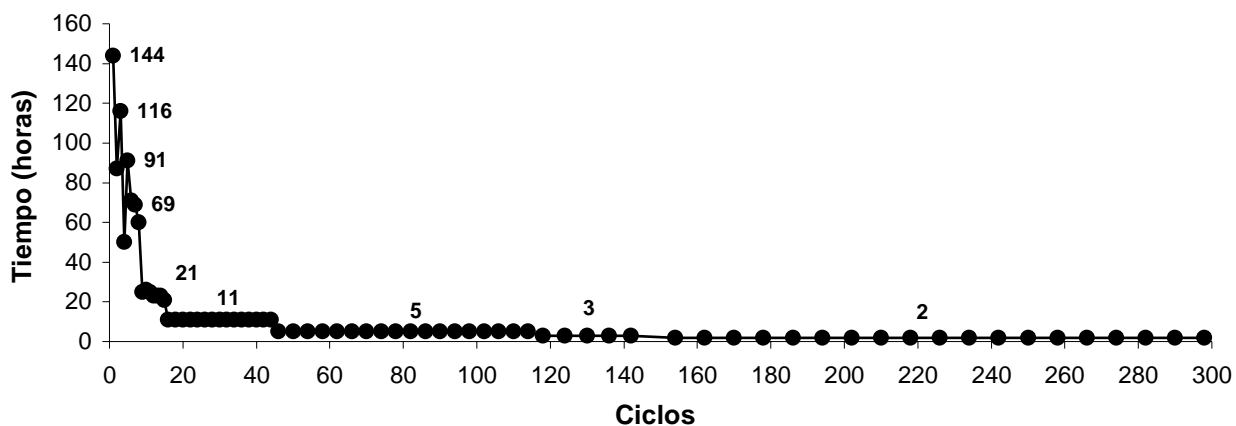
**Figura 4. 17.** Evolución de la capacidad de sedimentación (IVL) y la velocidad de sedimentación de la biomasa en cada ciclo durante la aclimatación a la PT

En cuanto a la velocidad de sedimentación (VS) al inicio de operación fue de 2 m/h. Se observó un ligero aumento a 3 m/h al final de la aclimatación. En ciclos posteriores, la velocidad de sedimentación llegó a valores de casi 8 m/h. Estos valores muestran que durante la aclimatación la capacidad de sedimentación de los lodos aumento, debido a la perdida de la capacidad de floculación de los lodos por la toxicidad del compuesto. En ciclos posteriores la biomasa recupero su capacidad de sedimentación inicial. A pesar de esto, los lodos cuentan con una buena velocidad de sedimentación que aumento durante la aclimatación, y en ciclos posteriores alcanzo excelentes valores comparados con las plantas de tratamiento de lodos activados que presentan valores menores a 2 m/h. Adicionalmente, este valor de VS indica que el tamaño de los flóculos en el reactor fueron entre 10 y 30 mm (Metcalf & Eddy, 2003).

## 4. 2. 2. Datos operacionales del biorreactor

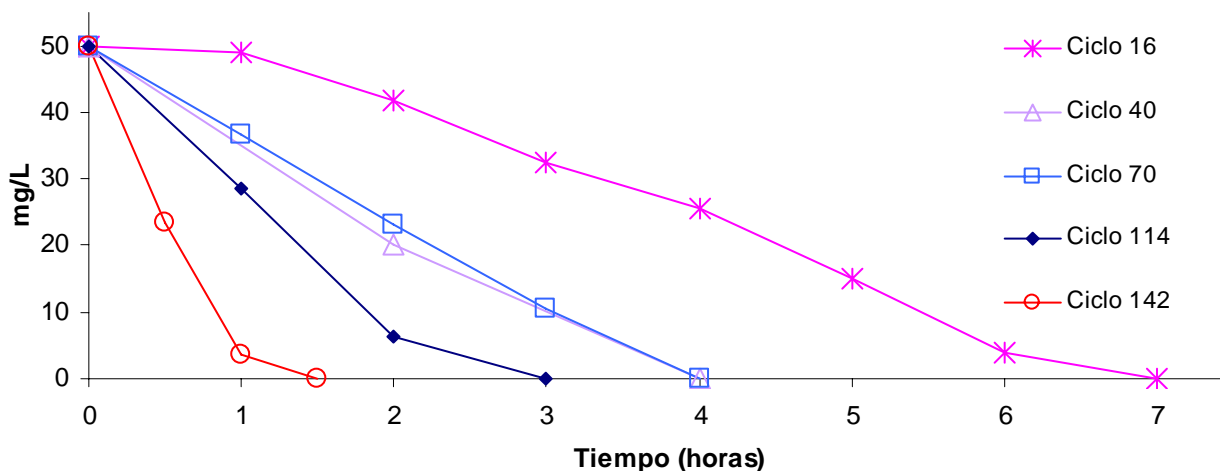
### 4. 2. 2. 1. Tiempos de reacción

El reactor operó durante tres meses (298 ciclos). Durante este tiempo se realizaron cinéticas gracias a las cuales se estableció el cambio del tiempo de reacción, el cual fue disminuyendo gradualmente de 144 h en el primer ciclo de aclimatación, a 11 h en el ciclo 16, 5 h en el ciclo 46 y finalmente en tiempos de reacción de 2 h a partir del ciclo 154; posteriormente los tiempos de reacción se mantuvieron constantes hasta el final de la operación, esto es durante 145 ciclos (Figura 4.18)



**Figura 4. 18.** Tiempos de reacción para llevar a cabo la degradación de la PT en cada uno de los ciclos durante la operación del reactor, en los ciclos del 9 al 5 el tiempo de reacción vario entre 26 a 21 h, del 16 al 45 fueron de 11 h, del 46-117 de 5 h, del 118 al 153 de 3 h y del 154-289 de 2 h

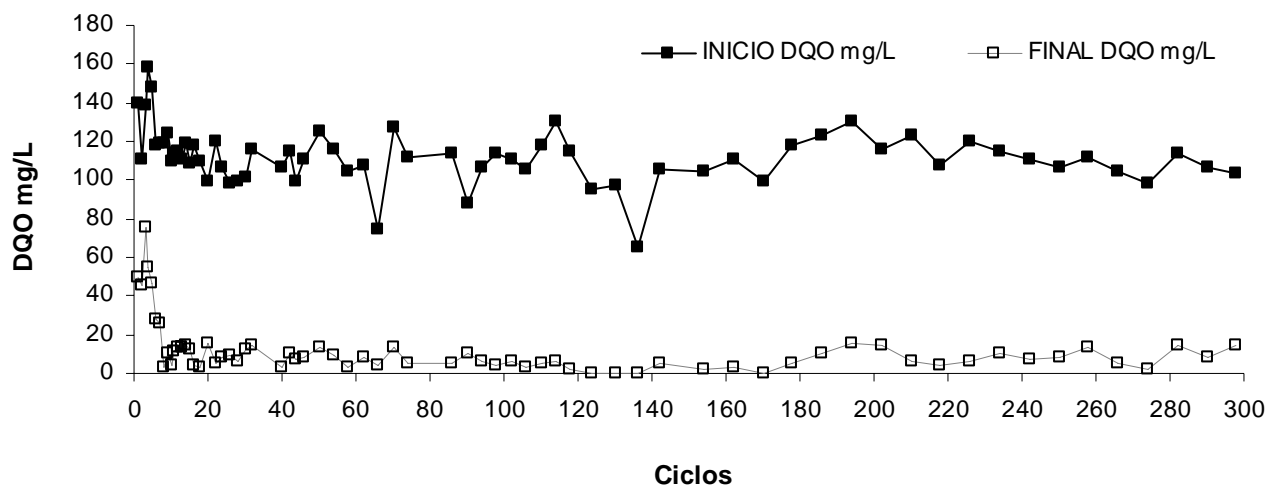
En la figura 4.19., se pueden observar las cinéticas realizadas durante la operación del reactor en los ciclos 16, 40, 70, 114 y 142, en los que existió disminución del tiempo de reacción. La degradación de 50 mg/L de p-toluidina se realizó con eficiencias de remoción mayores al 95%. Los tiempos de degradación fueron de más de 20 horas (del ciclo 9 al 15), 11 h (del 16 al 45), 5 h (ciclos 46 al 117), 3 h (del 118 al 153) y 2 h (del ciclo 154 al 298). Es importante remarcar que a partir del ciclo 154 el biorreactor operó de forma estable manteniendo este excelente tiempo de degradación.



**Figura 4. 19.** Cinéticas de degradación para observar los cambios de los tiempos de reacción para remover 50 mgPT/L en cinco diferentes ciclos durante la operación del reactor

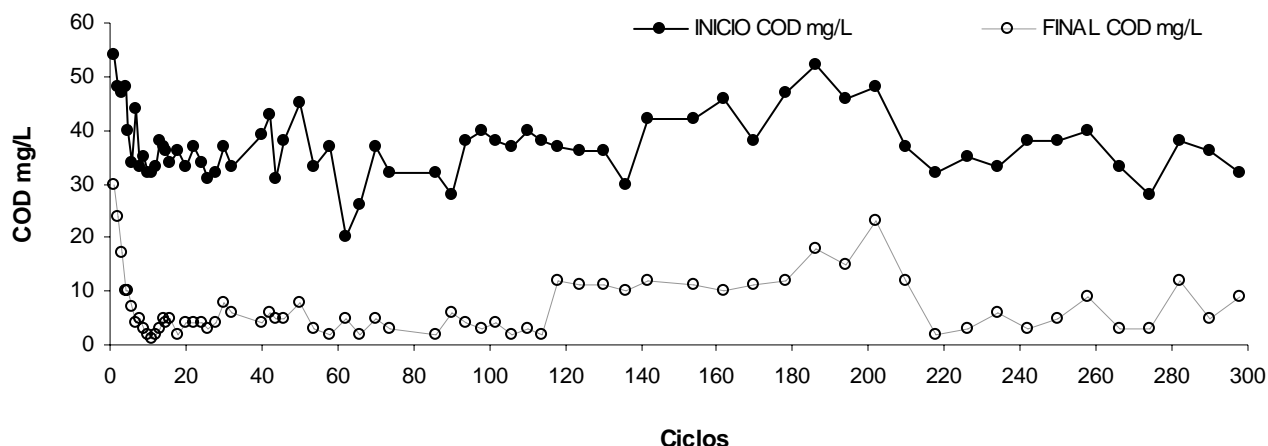
#### 4. 2. 2. 2. Operación del biorreactor

Durante la operación del reactor hay una disminución significativa del material orgánico en el reactor. En términos de DQO, la eliminación de la materia orgánica fue del  $90 \pm 1 \%$  en los ciclos de más de 20 h,  $92 \pm 0.8 \%$  en los ciclos de 11 h y  $93 \pm 1\%$  en los ciclos de 2 h (Figura 4.20.).



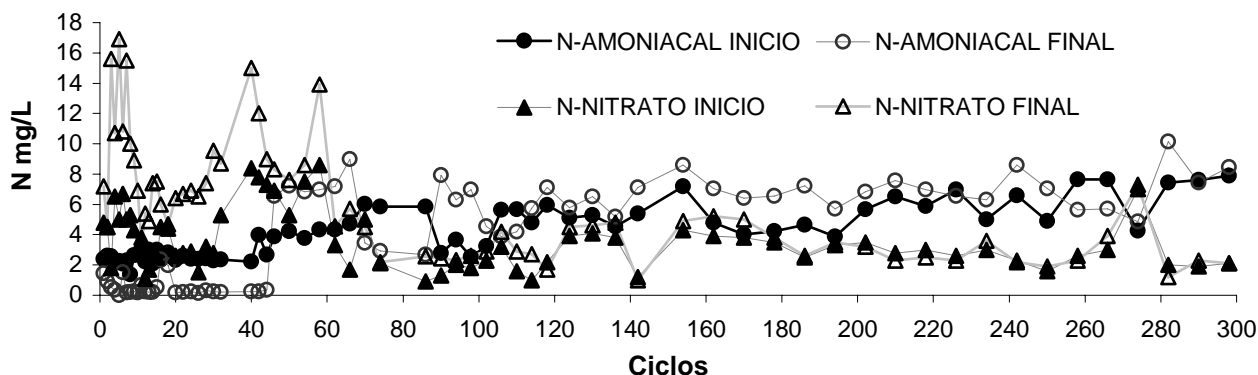
**Figura 4. 20.** Concentración de la DQO al inicio y final de cada ciclo durante la operación del reactor; los ciclos del 9 al 5 (26 a 21 h), 16 al 45 (11 h), 46-117 (5 h), 118 al 153 (3 h) y 154-289 (2 h)

En los ciclos 186, 194 y 202, hay un aumento en el efluente de la DQO, aunque éste nunca sobrepasó 15 mg/L (Figura 4.21.). Estos resultados demuestran que existe una buena (adecuada, excelente) remoción de la materia orgánica, y que el proceso funcionó de manera estable y eficiente, obteniendo un efluente con excelente calidad, el cual cumple ampliamente con la NOM-001-ECOL-1996 la cual establece que los límites máximos permisibles de DQO es 30mg/L para descarga de aguas tratadas en ríos (protección de la vida acuática) y embalses naturales y artificiales (uso público urbano). En términos de COD durante los ciclos de 21h se obtuvieron buenas eficiencias de remoción (92%), aunque en ciclos posteriores se observa que el COD aumenta en el reactor y sólo se alcanza a remover el 87% durante los ciclos de 11 h y 89% durante los ciclos de 5 h. En general cuando los ciclos fueron de 2 h, a partir del ciclo 220, se observaron remanentes de COD menores a 10 mg/L. En general, durante la operación del reactor la eliminación de la DQO fue mayor del 90%, sin embargo para el COD no se obtuvieron las mismas eficiencias y la máxima alcanzada fue al inicio de operación del reactor.



**Figura 4. 21.** Concentración de la COD al inicio y final de cada ciclo durante la operación del reactor

En cuanto al contenido de  $N-NH_3$  y  $N-NO_3$ , en la figura 4.22. se observa que durante los ciclos de 21 y 11 h al inicio se encuentran concentraciones de  $2.6 \pm 0.07$  mg/L de  $N-NH_3$  y  $2.7 \pm 0.2$  mg/L de  $N-NO_3$  y al final de los ciclos las concentraciones de  $N-NH_3$  han disminuido a  $0.32 \pm 0.04$  mg/L y las de  $N-NO_3$  han aumentado a  $6.3 \pm 0.4$  mg/L; para los ciclos de 5 h al inicio se encuentra un aumento en las concentraciones de  $4.5 \pm 0.3$  mg/L de  $N-NH_3$  y el  $N-NO_3$  que se mantienen en  $3.4 \pm 0.6$  mg/L y, al final, las concentraciones de  $N-NH_3$  no disminuyen como en los ciclos anteriores, por el contrario hay un aumento a  $5.8 \pm 0.4$  mg/L, mientras que en el  $N-NO_3$  los valores varían mucho aunque las concentraciones siguen aumentando a  $4.9 \pm 0.8$  mg/L; en los ciclos de 3 y 2 h, al inicio de los ciclos se encuentran concentraciones aún mayores de  $N-NH_3$  ( $5.6 \pm 0.2$  mg/L) y se mantienen las de  $N-NO_3$  ( $3.1 \pm 0.2$  mg/L), al final de los ciclos se encuentran concentraciones más elevadas de  $N-NH_4$  ( $6.7 \pm 0.2$  mg/L) y disminuyen las del  $N-NO_3$  a  $3.3 \pm 0.3$  mg/L.



**Figura 4. 22.** Concentración del  $NH_3$  y  $NO_3$  al inicio y final de cada ciclo durante la operación del reactor

En la figura 4.23. y 4.24. podemos ver que la concentración de nitrógeno al inicio disminuye en un tanto 54% al final en los ciclos de 20 h, un 43% en los ciclos de 11 h, un 35% en los de 5 h, un 42% en los de 3 h y un 41% en los ciclos de 2 h. En general, durante la operación del reactor se pierden  $7 \pm 0.7$  mgN/L. La

eficiencia de transformación del N de la PT en  $\text{NO}_3$  fue de más del 60% durante la operación del reactor. El valor restante de N de  $\text{NO}_3$  para completar el balance puede haber estado en forma de N inorgánico o dentro del material celular.

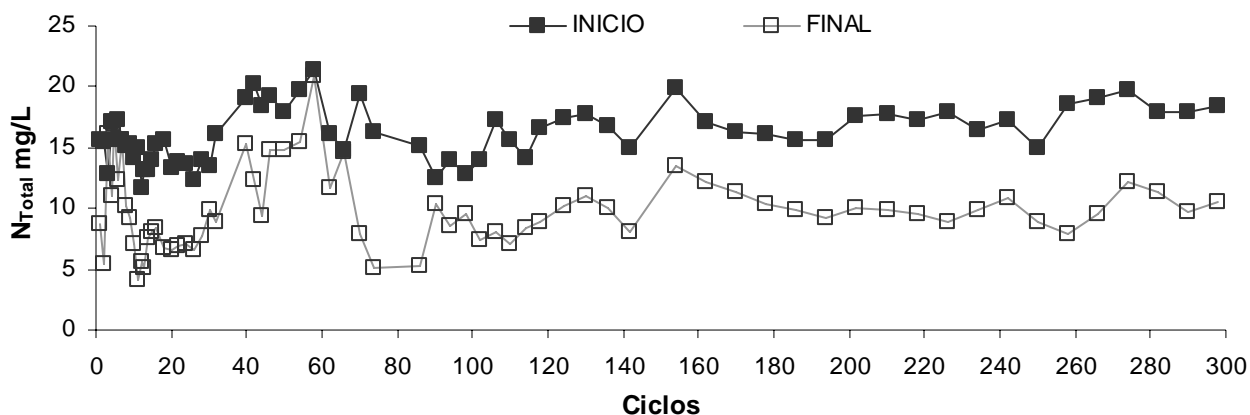


Figura 4. 23. Nitrógeno al inicio y final de cada ciclo de operación del reactor (balance)

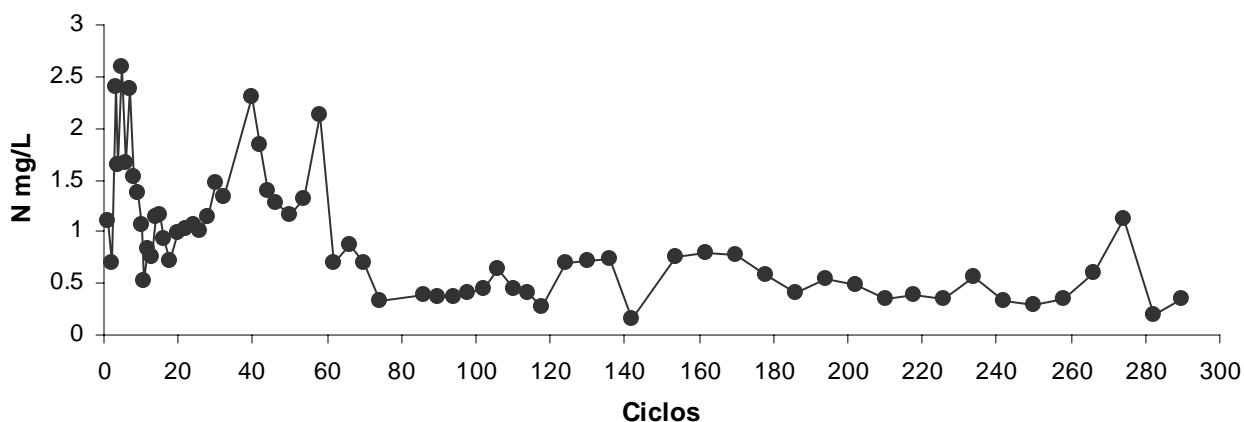


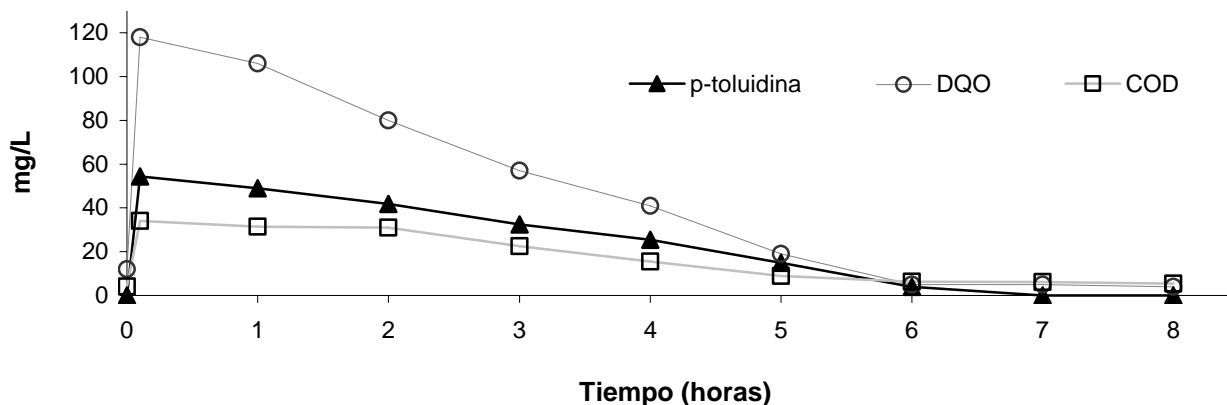
Figura 4. 24. Eficiencia de transformación de PT a  $\text{NO}_3$  durante la operación del reactor

### 4. 2. 2. 3. Cinéticas de degradación

#### 4. 2. 2. 3. 1. Cinética de degradación del ciclo 16

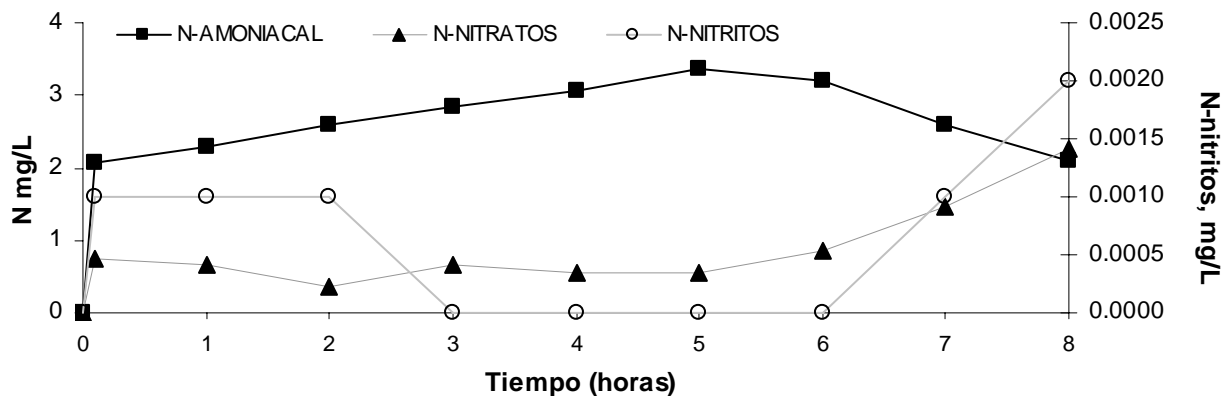
Durante la operación del reactor se realizaron varias cinéticas. La primera se hizo en el ciclo 16 (de 21 h y tiempo de reacción de 8 h), durante este ciclo el reactor contaba con 810 mg/L SSV, la actividad de los microorganismos era baja con una  $q$  de 1.2 mgPT/gSSV/h, con una actividad respirométrica para la PT de 1.2 mg $\text{O}_2$ /gSSV/h. Se muestreó el reactor cada hora hasta que los microorganismos degradaran más del 90% del compuesto. En la figura 4.25., se observa cómo la PT, la DQO y la COD van disminuyendo hasta

que son completamente eliminadas en 6 h. Como podemos ver en esta grafica, existe una relación de la disminución de la PT con la DQO y COD. Al analizar la cinética obtenida, se determinó que en los ciclos posteriores el tiempo de reacción disminuyera a 11 h.



**Figura 4. 25.** Cinéticas de degradación para la remoción de 50 mgPT/L, el análisis de la eliminación el compuesto también se siguió con la DQO y COD en el ciclo 16

En cuanto al nitrógeno contenido en el reactor de nitrógeno amoniacal ( $\text{NH}_3$ ), nitrógeno de nitritos ( $\text{NO}_2$ ) y nitrógeno de nitratos ( $\text{NO}_3$ ), en la figura 4.26. se observa que al inicio de la cinética hay un aumento de 2.06 mg  $\text{NH}_3$ /L, esta concentración vuelve a incrementarse gradualmente a 3. mg  $\text{NH}_3$ /L, cuando concluye la degradación de la p-toluidina comienza a decrecer, mientras el  $\text{NO}_3$  va aumentando, al inicio de la cinética hay una concentración de 0.75 mg/L de  $\text{NO}_3$  que, de origen, ya se encuentra en el agua del influente. El  $\text{NO}_2$  se encuentran en concentraciones muy bajas, se puede observar que en las primeras tres horas esta presente (0.001 mg/L) posteriormente se disminuye a valores de 0 mg/L y concluye con 0.002 mg/L. En el balance del nitrógeno (N) para este ciclo se obtiene que al inicio del ciclo los valores de N son de 10.5 mg/L, al concluir el tiempo de reacción, se observa una disminución a 4.3 mg/L.



**Figura 4. 26.** Evolución del N- $\text{NH}_3$ , N- $\text{NO}_2$  y N- $\text{NO}_3$  durante la cinética de degradación de la PT (ciclo 16)

4. 2. 2 .3. 2. *Cinética de degradación del ciclo 40*

La cinética del ciclo 40 se muestra en la figura 4.27. Se observa que la eliminación de la PT se realizó en 4 h al igual que la DQO y el COD. Además encontramos que la biomasa estaba expuesta a un periodo de ayuno de 7 horas durante los últimos ciclos con este tiempo de reacción. Por lo cual en ciclos subsecuentes el tiempo de reacción se ajusto a 5 h.

En la figura 4.28., podemos observar el comportamiento del nitrógeno amoniacal, nitratos y nitritos en el reactor. El NH<sub>3</sub> durante las primeras 4 horas, donde se lleva a cabo la degradación del compuesto tóxico, se mantiene en  $2.5 \pm 0.4$  mg/L, mientras el NO<sub>3</sub> va aumentando de la misma manera que lo hace el NH<sub>3</sub>, sin embargo después de haber finalizado la degradación del compuesto, durante el periodo de ayuno, se observa una mayor dinámica de las bacterias que podrían llevar a cabo la nitrificación. El balance del nitrógeno para este ciclo al inicio los valores de N son de 11.45 mg/L, al concluir el tiempo de reacción, se observó una disminución a 8.01 mg/L.

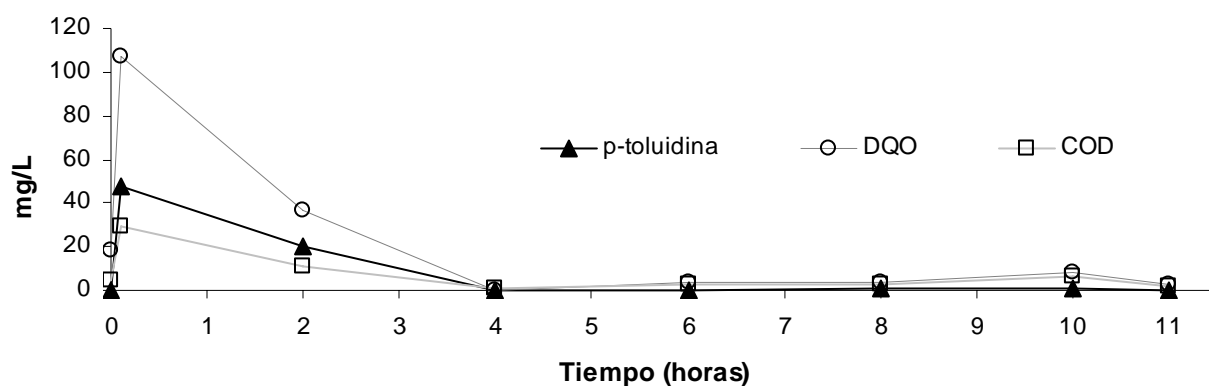


Figura 4. 27. Cinéticas de degradación para la remoción de 50 mgPT/L, el análisis de la eliminación el compuesto también se siguió con la DQO y COD en el ciclo 40

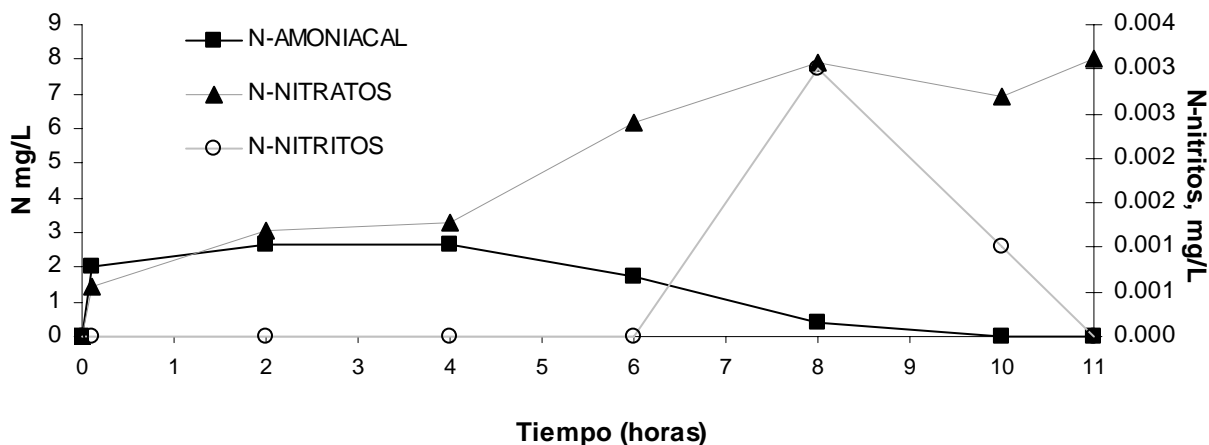
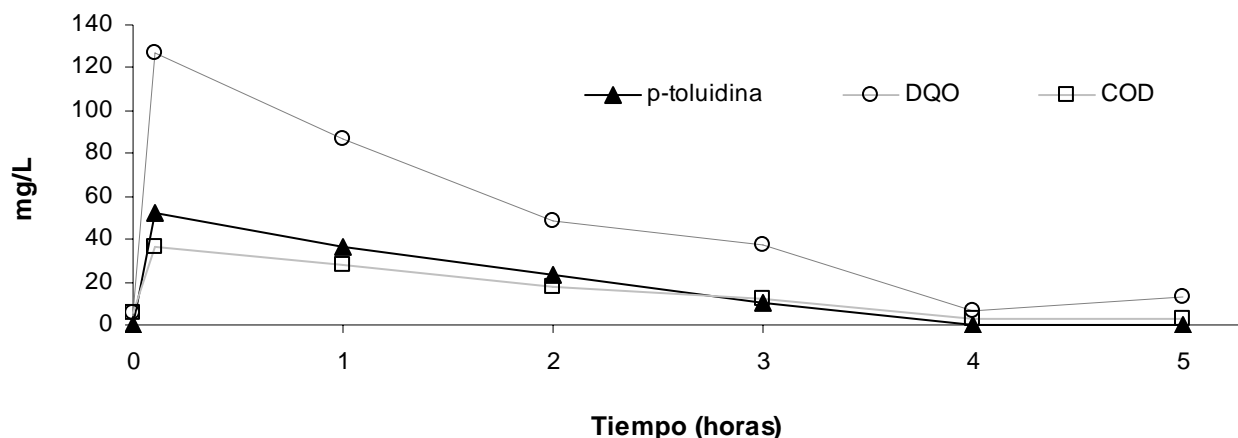


Figura 4. 28. Evolución del N-NH<sub>3</sub>, N-NO<sub>2</sub> y N-NO<sub>3</sub> durante la cinética de degradación de la PT (ciclo 40)



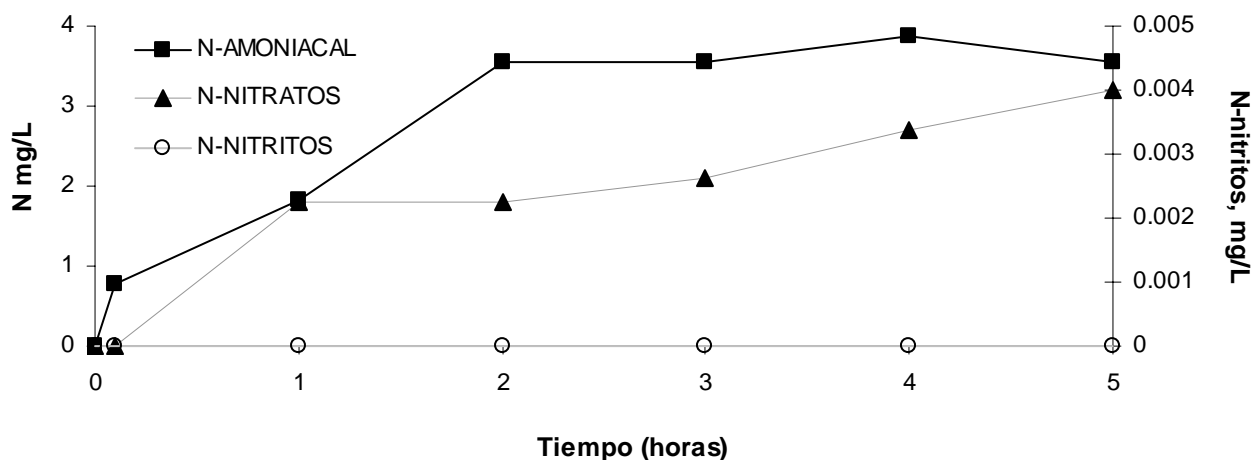
4. 2. 2 .3. 3. *Cinética de degradación del ciclo 70*

En la cinética de 5 h, es posible observar que la degradación de la PT se llevó a cabo en 4h. Esta degradación también se ve reflejada en la disminución de la DQO y del COD (figura 4.29.). Este comportamiento se observó desde el ciclo 40 donde a pesar de que el tiempo de ciclo era mayor, la degradación de la PT también se realizaba en 4 h.



**Figura 4. 29.** Cinéticas de degradación para la remoción de 50 mgPT/L, el análisis de la eliminación el compuesto también se siguió con la DQO y COD en el ciclo 70

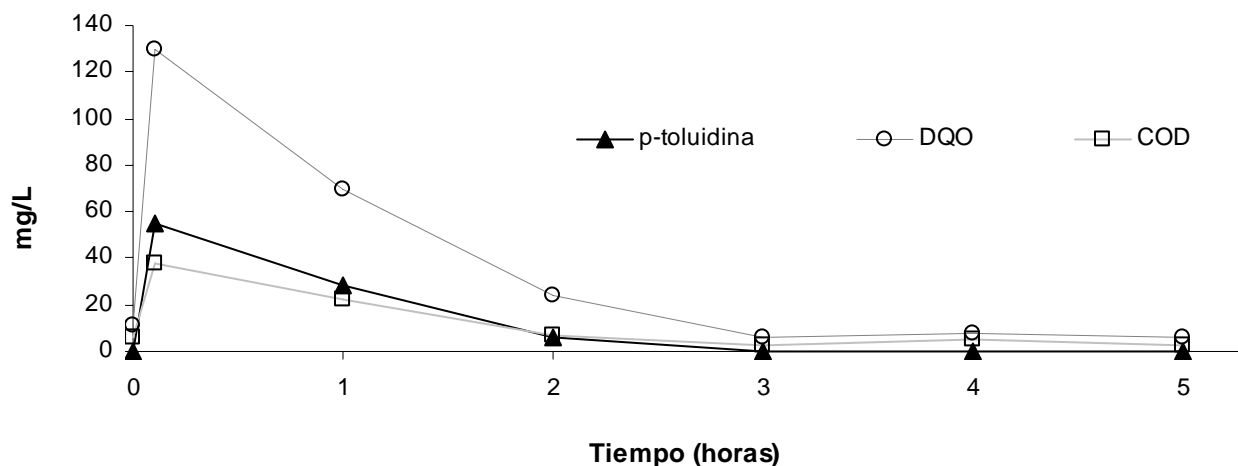
Para esta cinética la formación del  $\text{NH}_3$  va aumentando gradualmente al igual que el  $\text{NO}_3$ , en la hora 4 se ve una ligera disminución al mismo tiempo que continúa aumentando el  $\text{NO}_3$ , el decaimiento del  $\text{NH}_3$  coincide nuevamente con la total eliminación de la p-toluidina (Figura 4.30.). El balance del nitrógeno para este ciclo al inicio los valores de N son de 9.5 mg/L, al concluir el tiempo de reacción, se observó una disminución a 6.7 mg/L.



**Figura 4. 30.** Evolución del N- $\text{NH}_3$ , N- $\text{NO}_2$  y N- $\text{NO}_3$  durante la cinética de degradación de la PT (ciclo 70)

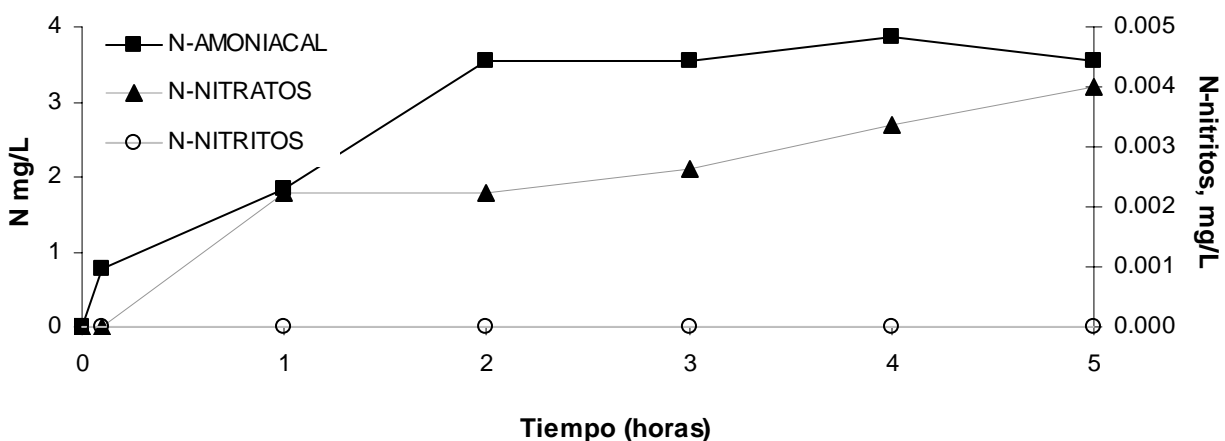
4. 2. 2 .3. 4. *Cinética de degradación en ciclo 114*

En este ciclo, al igual que en el ciclo 70, el tiempo de reacción estaba fijo en 5 h, sin embargo los microorganismos degradaron los 50mg/L de PT, DQO y COD en 3 h (Figura 4.31.).



**Figura 4. 31.** Cinéticas de degradación para la remoción de 50 mgPT/L, el análisis de la eliminación el compuesto también se siguió con la DQO y COD en el ciclo 114

En esta cinética la formación del  $\text{NH}_3$  al igual que la anterior fue aumentando gradualmente de la misma forma que el  $\text{NO}_3$ , en este caso el decaimiento del  $\text{NH}_3$  se lleva acabo una hora después de la degradación del compuesto, aunque el  $\text{NO}_3$  va aumentando gradualmente hasta el fin del ciclo (Figura 4.32.). El balance del nitrógeno para este ciclo al inicio los valores de N son de 15.7mg/L, al concluir el tiempo de reacción, se observó una disminución a 8.4mg/L.



**Figura 4. 32.** Evolución del N- $\text{NH}_3$ , N- $\text{NO}_2$  y N- $\text{NO}_3$  durante la cinética de degradación de la PT (ciclo 114)

4. 2. 2 .3. 5. *Cinética de degradación en ciclo 142*

En la cinética del ciclo 142, se demostró que el sustrato era degradado en 1.5 h (tiempo de reacción de 3h). Es importante notar que a los 60 min de reacción sólo quedaban 4 mg PT/L en el reactor, lo cual representa más del 90% de la remoción como PT y más del 90% de remoción como COD y DQO. (Figura 4.33.). En la evolución del nitrógeno en el reactor nuevamente el decaimiento de NH<sub>3</sub> vuelve a coincidir con la remoción de la PT (Figura 4.34.). El balance del nitrógeno para este ciclo al inicio los valores de N son de 14.8 mg/L, al concluir el tiempo de reacción, se observó una disminución a 7.8 mg/L.

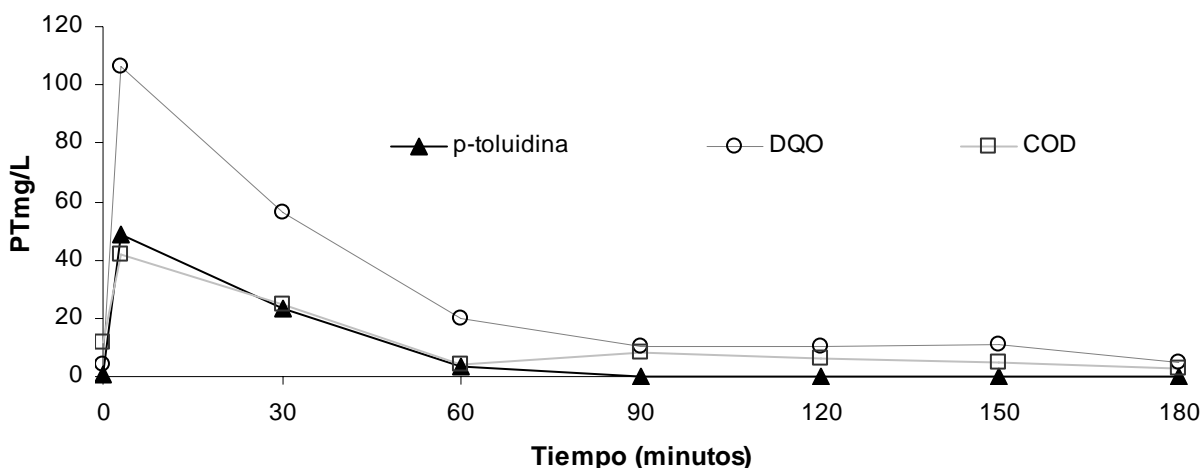


Figura 4. 33. Cinéticas de degradación para la remoción de 50 PTmg/L, el análisis de la eliminación el compuesto también se siguió con la DQO y COD para el ciclo 142

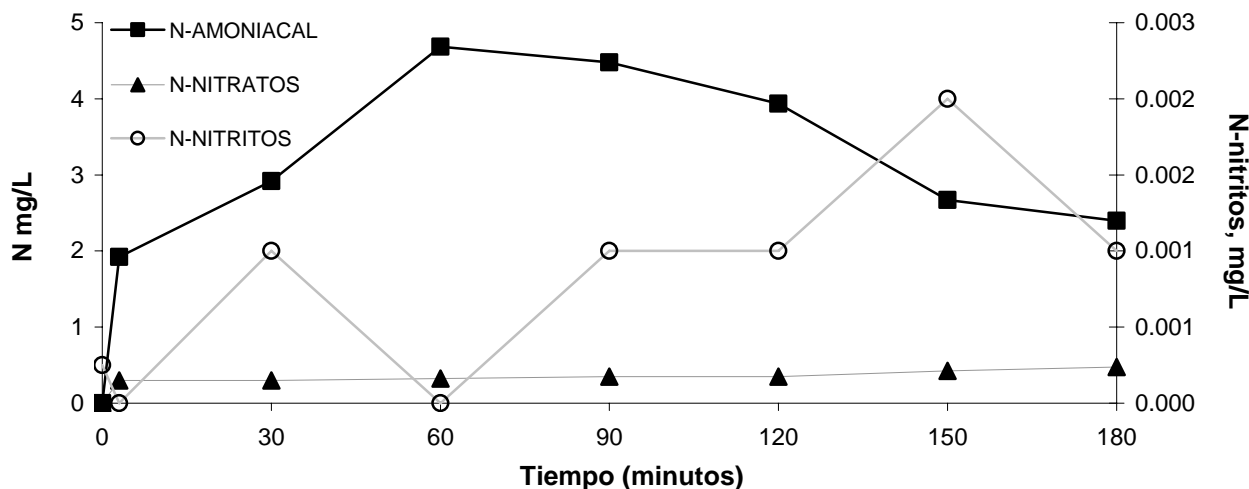
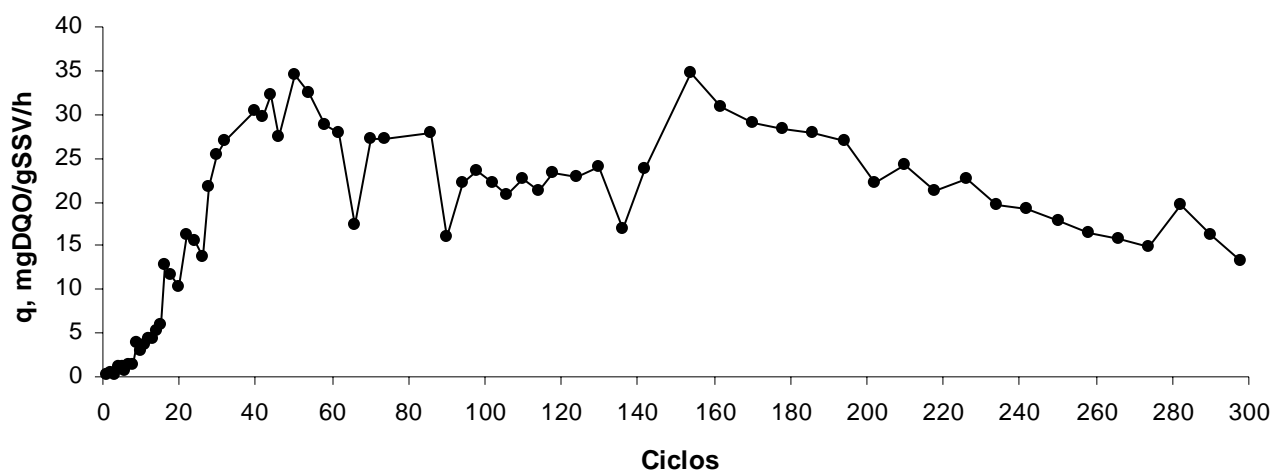


Figura 4. 34. Evolución del N-NH<sub>3</sub>, N-NO<sub>2</sub> y N-NO<sub>3</sub> durante la cinética de degradación de la PT (ciclo 142)

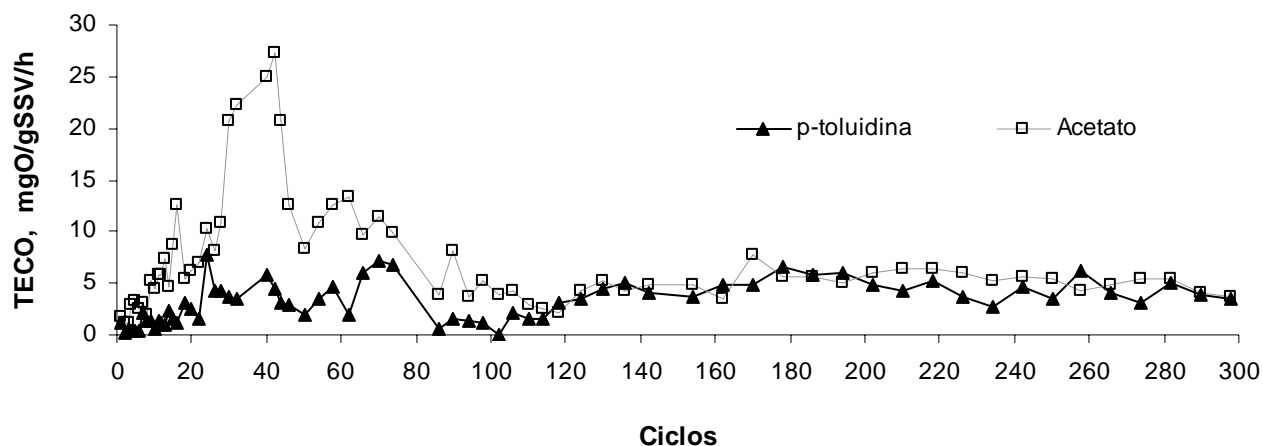
#### 4. 2. 2. 4. Actividad de los microorganismos

Durante la operación diaria del reactor hay un incremento exponencial en la tasa específica de degradación del sustrato ( $q$ ), el valor máximo obtenido fue de 34 mg/SSV/h en el ciclo 162. De acuerdo con la figura 4.35. la actividad de los microorganismos en los últimos 100 ciclos de operación se mantuvieron en  $25.6 \pm 0.8$  mg/gSSV/h. Moreno-Andrade y Buitrón (2004), reportan que durante el proceso de aclimatación de los microorganismos a la degradación de sustancias tóxicas, existe un incremento exponencial en la tasa de degradación, después de que la aclimatación es completada no existe más el crecimiento de la tasa específica de degradación,  $q$  se estabiliza en un punto máximo, lo cual está relacionado con la máxima actividad metabólica de los microorganismos. Durante la aclimatación se maximiza la actividad de los microorganismos a la degradación de algún sustrato en particular, esta actividad se mantendrá siempre y cuando las condiciones de operación del biorreactor sean las adecuadas. En nuestro estudio, después de la aclimatación continuó aumentando exponencialmente  $q$ , una vez alcanzado el punto máximo, éste no se mantuvo; como se observa en la figura 4.32, solo en dos ciclos se alcanzó este valor (ciclo 50 de 5 h y 154 de 2 h), en los ciclos posteriores a este ciclo la  $q$  se mantuvo en valores superiores a 18 mgPT/g SSV/h.



**Figura 4. 35.** Evolución de la tasa específica de degradación,  $q$ , como una función en el tiempo de operación del reactor

En cuanto a la TECO, en los primeros ciclos de operación, es notable la preferencia de los microorganismos por el acetato (TECO de acetato de  $6 \pm 0.2$  mgO<sub>2</sub>/gSSV/h y de la p-toluidina  $1.3 \pm 0.2$  mgO<sub>2</sub>/gSSV/h) (Figura 4.36.). Incluso durante los ciclos de 11 h en donde los microorganismos se sometieron a periodos de ayuno existe una marcada diferencia en el consumo de acetato con una TECO  $14 \pm 0.2$  mgO<sub>2</sub>/gSSV/h en comparación con la TECO de PT con de  $4 \pm 0.2$  mgO<sub>2</sub>/gSSV/h.

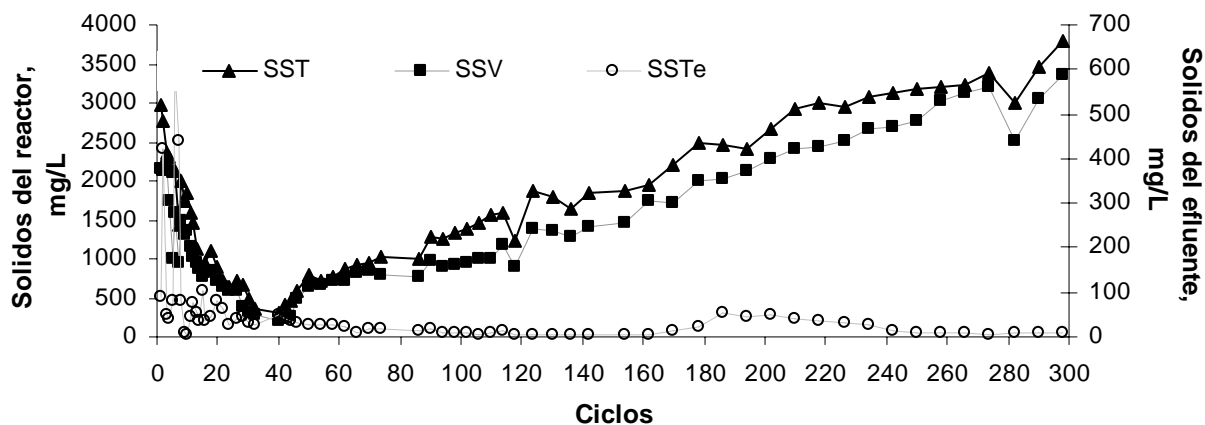


**Figura 4. 36.** Evolución de la tasa específica de consumo de oxígeno (TECO) de la PT y sustrato de fácil degradación (Acetato de Amonio) durante operación del reactor

Posteriormente cuando los tiempos de reacción se ajustan a 5 h disminuye la TECO de acetato ( $7 \pm 2$  mgO<sub>2</sub>/gSSV/h) aunque ésta continua siendo mayor que la TECO de PT ( $3 \pm 2$  mgO<sub>2</sub>/gSSV/h), cuando se ajustaron los tiempos de reacción a 3 h la TECO del acetato ( $4 \pm 0.4$  mgO<sub>2</sub>/gSSV/h) se asemeja a la TECO de la PT ( $4 \pm 0.4$  mgO<sub>2</sub>/gSSV/h); durante los ciclos de 2h los valores aumentaron un poco, para la TECO del acetato fue de  $5 \pm 0.2$  mgO<sub>2</sub>/gSSV/h y para la PT  $4.5 \pm 0.2$  mgO<sub>2</sub>/gSSV/h (Figura 4.33). Un importante punto de discusión es que a partir del ciclo 118, los valores obtenidos de la actividad respirométrica indican que los microorganismos tenían una afinidad al consumo de la p-toluidina similar al del acetato. Esto significa una muy buena actividad degradadora de los microorganismos hacia el consumo de la PT, ya que la actividad para degradar este compuesto tóxico fue similar a la actividad de los microorganismos a degradar un sustrato fácilmente biodegradable como lo es el acetato de amonio.

#### 4. 2. 2. 5. Comportamiento de la biomasa

En la figura 4.37., se observa que después de la aclimatación existe un decremento gradual de la biomasa del 40% entre los ciclos 9 al 15, manteniendo en el reactor  $1119 \pm 90$  mg/L. Entre los ciclos 16 y 45 volvió a decrecer el 68% (ciclos de 11 h) encontrado en el reactor  $488 \pm 61$  mg/L. A partir del ciclo 46 hubo un incremento de la biomasa del 35%. Entre los ciclos 46 al 117 el incremento de la biomasa fue del 144% encontrando en el reactor  $835 \pm 40$  mg/L y para los ciclos 154 al 298 (ciclos de 2 h) aumentó más del 129% con  $2482 \pm 124$  mg/L.



**Figura 4. 37.** Evolución de los sólidos suspendidos totales y volátiles en el reactor y los sólidos suspendidos totales del efluente en cada ciclo durante la operación del reactor

Después de la aclimatación los sólidos suspendidos totales en el efluente fueron disminuyendo gradualmente,  $43 \pm 11$  mg/L en los ciclos 9 al 15,  $44 \pm 5$  mg/L del 16 al 45,  $16 \pm 2$  mg/L del 46 al 117,  $40 \pm 0.4$  mg/L en los ciclos 118-153 y  $21 \pm 3$  mg/L del 154 al 298.

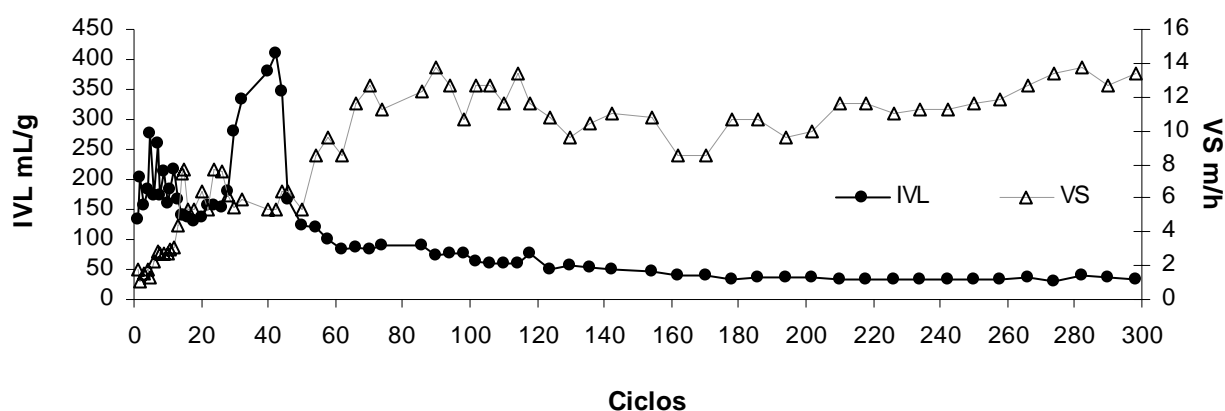
Los datos demostraron que la tasa de rendimiento ( $Y_{obs}$ ) tuvo un valor de  $0.3 \pm 0.02$  mgSSV/mg PT. Esta tasa de rendimiento significa que por cada gramo de sustrato degradado, se producen 0.3 g de nueva biomasa. Valores similares de  $Y_{obs}$  ha sido reportado para otros compuestos aromáticos, por ejemplo, Moreno-Andrade y Buitrón (2004) obtuvieron una  $Y_{obs}$  de 0.28 mgSSV/mg de 4-clorofenol. En las plantas de tratamiento de aguas residuales municipales convencionales (lodos activados), los valores de la  $Y_{obs}$  pueden llegar a ser de 0.5 mgSSV/mg DQO biodegradable aunque el valor típico de las plantas es de 0.4 (Metcalf y Eddy, 2003).

En el caso de la capacidad de sedimentación de la biomasa, evaluada por medio de la velocidad de sedimentación y el índice volumétrico de lodos (Figura 4.38.), se puede observar que esta capacidad aumentó conforme los microorganismos se aclimataron y se obtuvo una operación estable del reactor (Figura 4.35.). Los resultados se muestran en la tabla 4.1.

Lo anterior coinciden con los resultados presentados por Moreno-Andrade y Buitrón (2004), en este estudio se evidenció que durante la aclimatación y operación estable del reactor, existe un aumento en la velocidad de sedimentación y una disminución en el índice volumétrico de lodos, obteniendo biomasa con excelentes características.

**Tabla 4. 1.** Índice volumétrico de lodos (IVL) y velocidad de sedimentación (VS) durante la operación del reactor

CICLOS	IVL mL/g	VS m/h
9 al 15 (más de 20 h)	174 ± 8	4 ± 0.5
16 al 45 ciclos (11h)	233 ± 27	6 ± 0.2
46 al 117 (5h)	88 ± 6	11± 0.7
118-153 (3h)	58 ± 5	11 ± 0.4
154 al 298 (2h)	36 ± 0.9	11 ± 0.2



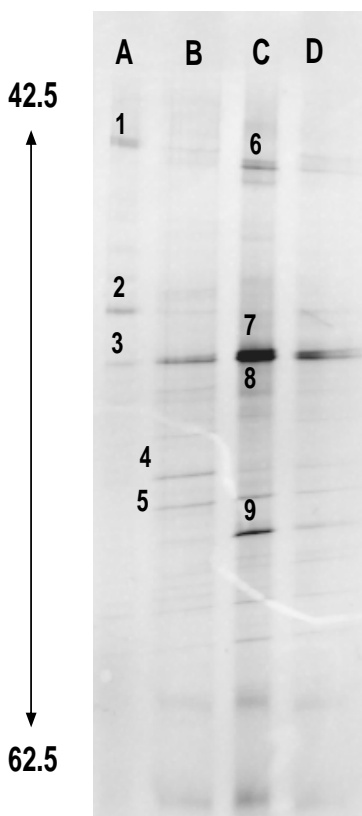
**Figura 4. 38.** Evolución de la capacidad de sedimentación (IVL) y velocidad de sedimentación de la biomasa durante la operación del reactor

Cabe señalar que a partir del ciclo 158 (tiempos de ciclo de reacción de 2 h), el proceso funcionó de forma adecuada y estable con excelentes características del efluente. Lo anterior se demuestra debido a que la remoción de los sólidos suspendidos totales en el efluente se mantuvieron debajo de 40 mg/L, valor requerido en la Norma Oficial Mexicana para una descarga en un río o para su uso en riego agrícola o uso público urbano con previo tratamiento (NOM-001-ECOL-1996). Adicionalmente, los lodos mostraron excelente sedimentabilidad sin importar que la tasa de degradación de los microorganismos se mantuviera en su valor máximo. La velocidad de sedimentación se mantuvo entre 8 y 12 y el índice volumétrico de lodos menor a 50 mL/g.

### 4. 2. 3. Evolución de la comunidad microbiana

El análisis de la comunidad microbiana por medio de la técnica de DGGE reveló que durante el proceso de la aclimatación y operación del biorreactor, existió una diversidad bacteriana moderada en la comunidad. (Figura 4.39.). Durante la operación del reactor se pudo observar que la comunidad de microorganismos en el reactor fue cambiando durante la operación del reactor, se encontraron un total se 9 bandas en el

DGGE, lo que implica la presencia de al menos 9 especies de bacterias distintas pertenecientes a la comunidad de bacterias al inicio del proceso, las bandas que no aparecen en los ciclos posteriores son bacterias eliminadas del sistema, como las bandas 2 y 4; y las bandas que se intensifican o aparecen son bacterias que logran sobrevivir y reproducirse bajo las condiciones de operación, como las bandas 7 y 9.



**Figura 4. 39.** Evolución de la comunidad microbiana, la banda A corresponde al inóculo, la banda B al ciclo 32 (11 h), la banda C al ciclo 130 (3 h) y la banda D al fin de la operación del reactor (2 h)

Un punto interesante a considerar es que existe una fuerte dinámica poblacional provocada por una comunidad inestable, a pesar de que los parámetros macroscópicos evaluados en la operación del reactor permanecen constantes. Este resultado concuerda con los obtenidos por Délbes *et al.* (2000) y Etchebere *et al.* (2001), que analizaron la comunidad de un reactor anaerobio y un anóxico, operados por más de dos años, por métodos moleculares de huella genética y demostraron que no existe una estabilidad en los reactores empleados para el tratamiento de aguas residuales, aunque las eficiencias y demás parámetros cinéticos demuestran estabilidad del proceso.



---

# Conclusiones

---

Los resultados obtenidos en esta investigación demuestran que es viable el uso de procesos aerobios discontinuos para el tratamiento de efluentes conteniendo aminas aromáticas, como es el caso de las aguas residuales de industrias farmacéuticas y textiles. En el caso de la p-toluidina la aclimatación se llevó a cabo satisfactoriamente, ya que la biodegradación de 25 mg/L se obtuvo en ciclos de dos horas. Se observó que dentro de los biorreactores existe una intensiva dinámica poblacional, ya que durante la aclimatación existe una selección y multiplicación de microorganismos especializados.

En el caso del p-aminofenol, el reactor se operó durante 12 ciclos (26 días), la biomasa se aclimató en el ciclo 6 (9 días), con una remoción del sustrato mayor al 90%, sin embargo, en los últimos 5 ciclos hay un aumento en la concentración del compuesto en el influente, a pesar de esto la remoción del sustrato se llevó a cabo, aunque la mayor parte de esta remoción pudo deberse a la formación de polímeros en el medio y no a la acción de los microorganismos sobre el compuesto. En este caso si el proceso aerobio discontinuo se aplica a una industria, es necesaria la aplicación de un postratamiento que retenga los polímeros formados. Por otra parte, este compuesto puede ser degradado combinando ambientes anaerobio y aerobios o por medio del control del oxígeno disuelto en el reactor, con el fin de evitar el exceso de aire en el medio (responsable de la polimerización).

Para la p-toluidina, el reactor operó durante 298 ciclos (3 meses), la biomasa se aclimató en el ciclo 9 (30 días), con una remoción del sustrato mayor al 90%, en ciclos posteriores se observó que la actividad de la biomasa aumentó alcanzando una tasa de degradación de  $22 \pm 6$  mg/gSSV/h, reflejándose en la disminución en los tiempos de remoción de 26 a 2 horas, adicionalmente la capacidad y velocidad de sedimentación mejoraron.

Durante los primeros ciclos, los valores de la tasa específica de consumo de oxígeno demostraron que los microorganismos tenían una afinidad mayor hacia el consumo de acetato de sodio (sustancia fácilmente biodegradable) que la p-toluidina (sustancia tóxica). Sin embargo en ciclos 118 al 298 (biomasa aclimatada a la p-toluidina), refleja que la tasa específica de consumo de oxígeno de los microorganismos es similar para los dos compuestos. Esto prueba que la actividad respirométrica de

los microorganismos aclimatados tuvo una afinidad similar al consumir el sustrato tóxico que al degradar el sustrato fácilmente biodegradable.

En el reactor no sólo se llevó a cabo el proceso de eliminación del carbono de la molécula del p-aminofenol, también se encontró que los microorganismos transformaban el grupo amonio de la p-toluidina a NO<sub>2</sub> y posteriormente a NO<sub>3</sub>, además, el balance del nitrógeno muestra que existe mineralización del compuesto, sin embargo el N-inorgánico y presente en la biomasa no pudo ser determinado. Durante los primeros ciclos este proceso de nitrificación fue muy marcado sobre todo cuando los microorganismos ya no contaban con una fuente de carbono en el reactor, conforme se fueron reduciendo los tiempos de reacción se reducía el tiempo para realizar en su totalidad este proceso.

Los resultados obtenidos en esta investigación demuestran que es viable el uso de procesos aerobios discontinuos para el tratamiento de efluentes conteniendo aminas aromáticas. Sin embargo, en casos de polimerización como el p-aminofenol será necesaria la aplicación de un postratamiento que retenga los polímeros formados. Así mismo, es necesario investigar más a fondo nuevos procesos para obtener buenas eficiencias de remoción de efluentes contaminados con aminas aromáticas, como el uso de ambientes anaerobio y aerobios combinando o por medio del control del oxígeno disuelto en el reactor, con el fin de evitar el exceso de aire en el medio (responsable de la polimerización).

---

# Referencias

---

- AFNOR. (1985). Evaluation en milieu aqueux de la biodegradabilité aérobie "ultime" des produits organiques solubles, *Normalisation française*, Francia. NFT, 90-312.
- Ahmed S., Afzal M., Tanvir S., Hameed A. (2001). Isolation and Characterization of a *Pseudomonas* strain that degrades 4-acetamidophenol and 4-aminophenol. *Biodegradation*. **12**, 303-309
- Afzal K. S., Hamayun M., Ahmed S. (2004). Degradation of 4-aminophenol by newly isolated *Pseudomonas* sp. strain ST-4. *Enzyme Microbial Technol.* **36**, 10-13
- Aelion C. M., Doobins D. C., Pfaender F. K. (1989). Adaptation of aquifer microbial communities to the biodegradation of xenobiotic compounds: influence substrate concentration and preexposure. *Environ. Toxicol. Chem.* **8**, 75-86
- APHA (2005). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. *American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation*. 21<sup>th</sup> ed., Port city press. Baltimore, Maryland.
- Atlas R., Bartha R. (2002). Ecología microbiana y microbiología ambiental. 4<sup>a</sup> ed., *Pearson Education*. Madrid, pp. 682
- Bitton G. (2005). Wastewater microbiology. 2 ed. *Wiley-Liss*. New York, pp. 780
- Brenner A., Chozick R., Irvine R. (1992). Treatment of high strength mixed phenolic waste in an SBR. *Water Environ. Res.* **64**, 128-133
- Brock T. D. (1966). Principles of Microbial ecology. 1 ed., *Prentice Hall Inc*. Englewoods Cliffs, N.J.

- Brosius J., Palmer M. L., Kennedy P. J., Noller H. F. 1978. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **75**, 4801-4805
- Buitrón G., Moreno-Andrade I., Becantur J. M., Moreno A. J. (2004). Biodegradación de efluentes altamente contaminados por compuestos fenólicos utilizando una estrategia de control. *XIV Congreso de Ingeniería Ambiental y Ciencias Ambientales*. 12-14/03/2004, Mazatlan, Sinaloa.
- Buitrón G., Capdeville B. (1995). Enhancement of the biodegradation activity by the acclimation of the inoculum. *Environ. Tech.* **16**, 1175-1184.
- Buitrón G., Gonzalez A., Lopez M. (1998). Biodegradation phenolic compound. *Water Sci. Technol.* **34**, 289-294
- Buitrón G., Moreno J. (2004). Modeling of the acclimation/deacclimation processes of a mixed culture degrading 4-chlorophenol. *Water. Sci. Technol.* **49** (1), 79-86
- Buitrón G., Ortiz J. (1997). Biodegradation of phenolic compounds with a sequencing batch biofilter. *CRC Critical Rev. Environ. Control.* **18** (4), 225-294
- Buitrón G., Soto G., Vite G., Moreno J. (2001). Strategies to enhance the biodegradation of toxic compounds using discontinuous processes. *Water Sci. Technol.* **43** (3), 283-290
- Bull A. T., Slater J. H. (1982). In microbial Interactions and communities. Vol 1, Bull A.T., Slater J.H eds. *Acad. Press*. New York, pp. 13-44
- Burgess J.,Quarmby, J., Stephenson, T. (2001). Micronutrient supplements for optimization of the treatment of industrial effluents. *Water. Res.* **33** (18), 3707-3717
- Cerniglia C. F., Freeman J. P., Van B. (1981). Biotransformation and toxicity of aniline derivates of cyanobacteria. *Arch. Microbiol.* **30**, 272-275
- CNA. (2005a). Inventario Nacional de Plantas Municipales de Potabilización y de Tratamiento de Aguas Residuales en Operación. *Comisión Nacional del Agua*. pp. 226.

- CNA. (2005b). Estadísticas del agua en México. Capítulo 4. Usos del agua. *Sistema Nacional de Información sobre Cantidad, Calidad, Usos y Conservación del Agua*. pp. 230
- CNA. (2006). Estadísticas del agua en México. Capítulo 4. Usos del agua e infraestructura. *Sistema Nacional de Información sobre Cantidad, Calidad, Usos y Conservación del Agua*. pp. 230
- Coello Oviedo M. D., López-Ramírez J. A., Sales D., Quiroga J. M. (2003). Evolution of an activated sludge system under starvation conditions. *Chem. Eng. J.* **94**, 139-146.
- CVIA. (2006a). Aguas Residuales en la industria. *IMAC, FEA y IAP*. [http://www.Aguas Residuales en la industria IMAC - Agua\\_org\\_mx - Fuego \(4\\_2\\_4\).mht](http://www.Aguas Residuales en la industria IMAC - Agua_org_mx - Fuego (4_2_4).mht)
- CVIA. (2006b). Hechos y cifras sobre el agua y la industria. *IMAC, FEA y IAP*. [http://www.Hechos y cifras sobre el agua y la industria IMAC - Agua\\_org.htm](http://www.Hechos y cifras sobre el agua y la industria IMAC - Agua_org.htm)
- Dabert P., Sialve B., Delgenés J. P., Moletta R., Godon J. J. (2001). Characterization of the microbial 16S rDNA diversity of an aerobic phosphorous-removal ecosystem and monitoring of its transition to nitrate respiration. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55** (4), 500-509
- Dabert P., Delgenés J. P., Moletta R., Godon J. J. (2002). Contribution of molecular microbiology to the study in water pollution removal of microbial community dynamics. *Rev. Environ. Sci. Biotech.* **1**, 39-49
- Delbés C., Moletta R., Godon J. J. (2000). Monitoring of activity dynamics of an anaerobic digester bacterial community using 16S rRNA polymerase chain-single-strand conformation polymorphism analysis. *Environ. Microbiol.* **2** (5), 506-515.
- Eckenfelder W. W., Musterman J. L. (1995). Activated Sludge treatment of industrial wastewater. 1 ed., *Technomic Publishing Co. Inc.* Lancaster, Pennsylvania, pp. 281.
- EPA. (1999). Reactores secuenciales discontinuos. Folleto informativo de tecnología de aguas residuales. EPA 832-F-99-073, Washington, D. C.

- Escribano R. 2007. Uso agrícola, industrial y doméstico del agua. *Càtedra UNESCO de Sostenibilitat*.  
Universitat Politècnica de Catalunya  
[http://portalsostenibilidad.upc.edu/detall\\_01.php?numapartat=2&id=24](http://portalsostenibilidad.upc.edu/detall_01.php?numapartat=2&id=24)
- Etchebere C., Errazquin M.I., Dabert P., Moletta R., Mixí L. (2001). Evaluation of the denitrifying microbiota of anoxic reactors. *FEMS Microbiol. Ecol.* **35**, 259-267.
- Felseke A., Akkermans A., Vos W. (1998). Quantification of 16S rRNAs in complex bacterial communities by multiple competitive reverse transcription-PCR in Temperature Gradient Gel Electrophoresis Fingerprints. *Appl. Environ. Microbiol.* **64** (11), 4581-4587
- Fonseca Z. A. (2002). Mineralización del colorante azo azul disperso 79 en un sistema discontinuo anaerobio/aerobio. Tesis para obtener el título de Ingeniero Químico. Facultad de Química, UNAM. México, D. F.
- Grady C. P. L. Jr (1985). Biodegradation: Its measurement and microbiological basis. *Biotech. Bioeng.* **27**, 660-674.
- Hirahishi A., Kamagata Y., Nakamura K. (1991). Polymerase chain reaction amplification and restriction fragment length. *J. Ferment. Bioeng.* **76** (6), 523
- HACH (2002). Spectrophotometer Handbook. *HACH<sup>MR</sup>*, USA.
- ICSC (2007). CAS#106-49-0. p-toluidine. (WHO/IPCS/IOL).  
<http://www.mtas.es/insht/ipcsnspn/nspn0343.htm>.
- Irvine R. L., Ketchum L. J. Jr. (1989). Sequencing batch reactors for biological wastewater treatment. *CRC Critical Rev. Environ. Control.* **18** (4), 225-294.
- Jefferson B. (2001). Nutrient addition to enhance biological treatment of greywater. *Water Res.* **35** (11), 2702-2701.

- Jiménez B. L. (2002). Biodegradación de un efluente químico farmacéutico por medio de un biofiltro discontinuo secuencial anaerobio/aerobio. Tesis para obtener el título de Ingeniero Químico. Facultad de Química, UNAM. México, D. F.
- Lapara T. M., Nakatsu C. H., Pantea., Allegan J. E. (2000). Phylogenetic análisis of bacteria communities in mesophilic and termophilic bioreactors treating pharmaceutical wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 3951-3959
- Madigan M., Martinko J., Parker J. (1997). Brock. Biology of microorganisms. 8<sup>th</sup> ed., *Edit. Prentice Hall*. New Jersey, pp. 986.
- Maier M. R., Pepper I. L. & Gerba C. P. (2000). Environmental Microbiology. 2 ed. *McGraw Hill*, New York, pp. 1612.
- McCarthy D. J., Waud W. R. Struck R. F. & Hill D. L. (1985). Deposition and metabolims of aniline in Fisher 334 rats and CS7BL/6 X C3h F1 mice. *Cancer Res.* **45**, 174-180
- Melgoza R. M., Buitrón, G. (2001). Degradation of *p*-nitrophenol in a batch biofilter under sequential anaerobic/aerobic environments. *Water Sci. Technol.* **44** (4), 151-157.
- Metcalf & Eddy. (1991). Wastewater engineering, treatment, disposal and reuse. 3 ed., Tchobanoglous G., Burton F. L., Stensel H. D. eds. *McGraw Hill*, New York, pp. 1819.
- Metcalf & Eddy. (2003). Wastewater engineering, treatment, disposal and reuse. 3 ed., Tchobanoglous G., Burton F. L., Stensel H. D. *McGraw Hill*, New York, pp. 1819.
- Mieyal J. J. Ackerman R. S., Blumer J. L, Freeman L. S. (1976). Characterization of enzyme-like activity of human hemoglobin: properties of the hemoglobin-p-450 reductase-coupled aniline hydroxylase system. *J. Biol. Chem.* **251**, 3436-3441
- Moreno A. I. (2006). Biodegradación óptima de compuestos fenólicos en un reactor discontinuo secuencial. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias. Instituto de Ecología, UNAM. México, D. F.

- Moreno-Andrade I., Buitrón G. (2004). Variation of the microbial activity during the acclimation phase of a SBR system degrading 4-chlorophenol. *Water Sci. Technol.* **50** (10), 251-258.
- Moreno-Andrade I., Buitrón G. (2004). Evolucion de la actividad de los microorganismos en los procesos de aclimatacion y desaclimatacion al 4-clorofenol. *XIV Congreso de Ingenieria Ambiental y Ciencias Ambientales*. 12-14/03/2004, Mazatlan, Sinaloa.
- Moreno G., Buitrón G. (2004). Influence of the origin of the inoculum and the acclimation strategy on the degradation of 4-clorophenol. *Biores. Technol.* **94** (2), 215-218.
- Moreno-Andrade I., Buitrón G. (2003). Influence of the initial substrate to microorganisms concentration ratio on the methanogenic inhibition test. *Water Sci. Technol.* **48** (6), 17-22.
- Muyzer G., Teske A., Wirsen C. O., Jannasch H. W. (1995). Phylogenetic relationship of Thiomicrospira species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Arch. Microbiol.* **164**, 165-172
- Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996. (1996). Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 6 de enero de 1997
- Norma Oficial Mexicana NOM-002-ECOL-1996. (1996) Que establece los límites máximos permisibles en las descargas de aguas residuales a los sistemas de alcantarillado urbano o municipal, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 9 de enero de 1997
- Norma Oficial Mexicana NOM-003-ECOL-1997. (1997) Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reusen en servicios al público, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 14 de enero de 1998
- O' Connor O. A., Yung L. Y. (1996). Effects of six different functional groups and their position on the bacterial metabolims of mono-substituted phenols under anaerobic conditions. *Environ. Sci. Technol.* **30** (5), 1419-1428



- O'Neill C., Lopez A., Esteves S., Hawkes F., Hawkes D., Wilcox S. (2000). Azo-dye degradation in an anaerobic-aerobic treatment system operating on simulated textile effluent. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**, 249-254
- Parris G. E. (1980). Environmental and metabolic transformation primary aromatic amines and related compounds. *Res. Rev.* **76**, 1-30
- Rodicio M. R., Mendoza M. C. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **22** (4), 238-245
- Sanz J.L., Díaz, Köchling T (2007). Molecular biology techniques used in wastewater treatment: An overview. *Process Biochemistry.* **42**, 119-113
- Schenzle A., Lenke H., Fisher P., Williams P. A., Knackmuss H. J. (1997). Catabolims of 3-nitrophenol by *Ralstonia eutropha* JMP134. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 1421-1427
- Sone T., Tokuda Y., Shinkai S., Manabe O. (1981). Kinetics and mechanisms of the Banberge rearrangement. 3. Rearrangement of phenylhydroxylamines to p-aminophenols in aqueous sulphuric acids solutions. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **2**, 298-302
- Spain J. C., Van Veld P. A. (1983). Adaptation of natural microbial communities to degradation of xenobiotic compounds: effects of concentration , exposure time, inoculum structure. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63** (1), 227-232
- Takenaka O. S., Kadawaki M., Murakami S., Aok K. (2003). The Metabolic Patway of 4-Aminophenol in Burkholderia sp. Strain AK-5 Differs from that of Aniline and Aniline with C-4 substituents. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **69** (9), 5410-5413
- Ueno Y., Haruta S., Ishii M., Igarashi Y.(2001). Changes in product formation and bacterial community by dilution rate on carbohydrate fermentation by methanogenic microflora in continuous flor stirred tank reactor. *Appl. Environ. Microbiol.* **57** (1-2), 65

- Ulgen M. Gorrod J. W., Barlow D. (1994). Structure-activity relationships in the formation of amides from substituted N-benzulanilines. *Xenobiotica*. **24**, 735-748
- UNESCO. (2003). 1<sup>st</sup> UN World Water Development Report: Water for people, water for life. (WWDR1). *UNESCO Publishing / Berghahn Books*. New York, pp. 543.
- Wanner J. (1992). Comparison of biocenoses from continuous and sequencing batch reactor. *Water Sci. Technol.* **25**, 239-292
- Watson H. M. (1993). A comparison of the effects of two methods of acclimation on aerobic biodegradability. *Environ. Toxicol. Chem.* **12**, 2023-2030
- Wiggings B. A., Jones S. H., Alexander M. A. (1987). Explanations for the acclimation period preceding the mineralization of organic chemicals in aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 791-796.
- Wilderer P. A., Irvine R. L., Goronszy M. C. (2001). Sequencing batch reactor technology. Scientific and technical report No 10, *IWA Publishing*, Londres, 76 pp.
- Winkler N. A. (1994). Tratamiento biológico de aguas residuales. 5ª reimpression. *Limusa*, México.
- Ye F-X., Shen D. S. (2003). Acclimation of anaerobic sludge degrading chlorophenols and the biodegradation kinetics during acclimation period. *Chemosphere*. **54** (10), 1573-1580.
- Zhang B., Chen J-L., Wang F., Zhang W-M. y Zhang Q-X. (2006). Evaluation of the correlation between ammonia nitrogen and p-toluidine using sequencing batch reactor treating synthetic p-toluidine wastewater. *J. Environ. Sci.* **18** (2), 259-262.
- Zumstein E., Moletta R., Godon J. J. (2000). Examination of two years of community dynamics in an anaerobic bioreactor using fluorescence polymerase chain reaction (PCR) single-strand conformation polymorphism analysis. *Environ. Microbiol.* **2** (1), 69-78

---

# Publicaciones

---

Como resultados de esta tesis se publicaron los siguientes artículos:

- **Flores M.**, Moreno-Andrade I., Buitrón G. (2007). Biodegradation of p-toluidine in a sequencing batch reactor. *5<sup>th</sup> IWA Specialised Conference on Assessment and Control of Micropollutants / Hazardous Substances in Water*. 17-20/06/2007. Frankfurt, Alemania.
- **Flores M.**, Moreno I., Villatoro W., Buitrón G. Biodegradación de p-aminofenol y p-toluidina en biorreactores discontinuos secuenciales. VI Congreso Internacional y XII Nacional de Ciencias Ambientales de la Academia Nacional de Ciencias Ambientales, A.C. 06-08/06/2007. Chihuahua, Chihuahua.
- **Flores M.**, Moreno I., Villatoro W., Buitrón G. (2007). Biodegradación de aminas aromáticas por medio de un reactor discontinuo aerobio. XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. 17-25-29/06/2007. Morelia, Michoacán.
- **Flores M.**, Moreno-Andrade I., Villatoro W., Buitrón G. Biodegradación de p-aminofenol y p-toluidina en biorreactores discontinuos secuenciales. Sometida a la *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*.

## 8. 1 Características del Agua Residual.

Se tomaron muestras del agua residual sintética y se analizó su contenido en DQO, COD; NH<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub> y NO<sub>3</sub>, la tabla muestra el promedio de cada uno de estos parámetros y la concentración máxima encontrada.

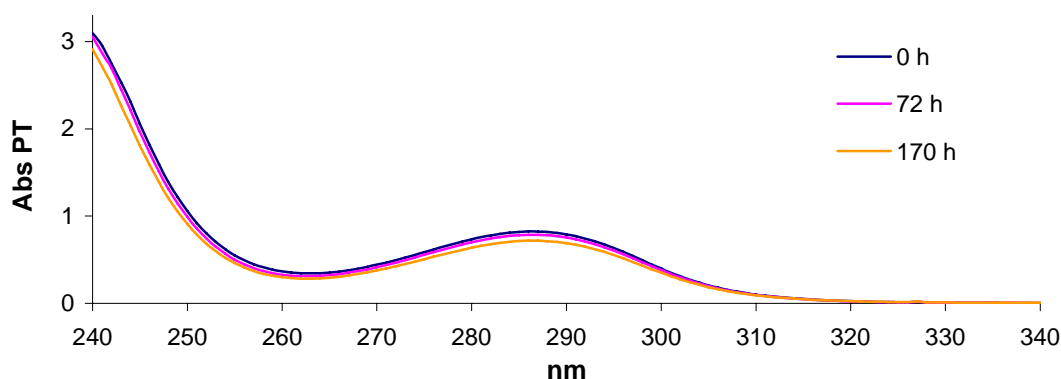
**Tabla 8. 1.** Promedio de los análisis del agua utilizada sin los compuestos tóxicos.

	Promedio, mg/L	Valor máximo, mg/L
DQO	142 ± 1	147
COD	42 ± 2	55
NH <sub>3</sub>	3 ± 0.1	3
NO <sub>2</sub>	0	-
NO <sub>3</sub>	1 ± 0.2	3.07

## 8. 2 Pruebas abióticas de los compuestos.

### Pérdida abiótica de la PT

Antes de iniciar la aclimatación a la PT se realizó una prueba abiótica para ver si existían pérdidas del compuesto debido a factores físicos. En el reactor se colocaron 2 L de agua con 50 mg/L de PT, se dejó con aireación y agitación durante 170 h, se tomó una muestra al inicio, a las 72 h y por último a las 170 h, las muestras se analizaron con espectrofotometría de UV a 233 nm (figura 8.1). La pérdida del compuesto bajo estas condiciones fue de 1.07 ± 0.1% / día



**Figura 8. 1.** Espectros de la PT tomados el espectrofotómetro durante la prueba abiótica

## 8. 3 Protocolos de las técnicas moleculares (Extracción y PCR)

### 8. 3. 1 Extracción del ADN

El protocolo empleado para la extracción del ADN fue el siguiente:

- En un tubo, se adicionaron 2ml de la muestra de lodos y una solución buffer que dispersa las partículas de la muestra y comienza a disolver ácidos húmicos, este es el primer paso para la lisis y se agitó en un vortex para mezclar la muestra y la solución buffer.
- Se adicionaron 60  $\mu$ l de la solución S1 y se agitó en un vortex ligeramente. La solución S1 contiene el detergente SDS que ayuda a la lisis de las células, rompe los ácidos grasos y lípidos asociados a la membrana celular.
- Se adicionaron 200 $\mu$ l de IRS (*Inhibitor Renoval Solution*), este reactivo precipita los ácidos húmicos y otros inhibidores de PCR.
- Se aseguraron los tubos horizontalmente en el disco del vortex pegándolos con cinta adhesiva y se agitaron por 10 minutos en un vortex, en este paso se produce una lisis de tipo mecánico pues el choque entre las células microbianas provoca que se rompan. Este protocolo utiliza una combinación de lisis mecánica y química.
- Se centrifugaron los tubos a 10 000 x g por 30 segundos. Tras la centrifugación se obtienen dos fracciones: un pellet que contiene partículas como vestigios celulares, sólidos, ácidos húmicos, etc., y un sobrenadante que contiene el ADN.
- Se transfirió el sobrenadante a un tubo de microcentrifuga limpio.
- Se adicionaron 250 $\mu$ L de la solución S2, se agito por 5 segundos e incubaron a 4°C por 5 minutos, la solución S2 contiene un reactivo que precipita proteínas que deben eliminarse ya que pueden reducir la pureza del DNA.
- Se centrifugaron los tubos por 1 minuto a 10 000 x g.
- Se desecho el pellet y se transfirió todo el sobrenadante a un tubo limpio de microcentrifuga, el pellet contiene residuos de ácidos húmicos, vestigios celulares y proteínas. Para una mejor obtención del DNA, se evita cualquier partícula del pellet.
- Se adicionaron 1.3  $\mu$ l de solución S3 (solución salina) al sobrenadante, evitando tocar las orillas del tubo y se agitó por 5 segundos. El DNA se une al sílice en altas concentraciones de sal.
- Se tomaron 700  $\mu$ L y se colocaron dentro de un filtro y se centrifugaron a 10 000 x g por un minuto, se descargó el líquido filtrado, se adicionó el sobrenadante restante en el filtro y se centrifugó a 10 000 x g por un minuto. Este proceso se repitió hasta que todo el sobrenadante pasara por el filtro. En este paso el DNA es enlazado selectivamente a la membrana de sílice del filtro, mientras los contaminantes pasan a través de ella.

- Se adicionó 300µL de la solución S4 y se centrifugó por 30 segundos a 10 000 x g, la solución S4 es una solución de lavado a base de metanol, con la que se hace una limpia adicional del ADN unido a la membrana de sílice del filtro.
- Se descargó el líquido filtrado del tubo, el líquido filtrado es el residuo que contiene la solución lavadora de metanol y los contaminantes que no se unen a la membrana de sílice.
- Se centrifugó otra vez por un minuto para remover los residuos de S4.
- Cuidadosamente se desplazó el filtro a un tubo nuevo, evitando que se contaminara con la solución S4
- Se adicionaron 50µL de la solución S5 (solución buffer estéril) en el centro de la membrana filtrante y se centrifugó por 30 segundos a 10 000 x g. La solución S5 pasa a través de la membrana y libera el DNA debido a que la solución S5 se adhiere al filtro de sílice en presencia de una solución salina.
- Desplazar el filtro, el líquido filtrado en el tubo contiene el DNA, se conservó congelado a -20°C.
- Se realizó un gel de azarosa al 0.7% para confirmar la extracción del DNA.

### 8. 3. 2 Amplificación del ADN

El protocolo empleado para PCR fue el siguiente:

- En tubos para PCR, se agregó 18 µL agua destilada.
- Se agitó en un vortex la enzima HSMM (Taq polimerasa) y se agregaron 25 µL de la enzima.
- Se adicionaron 2.5 µL del P2 y P3. Se utilizaron los primers universales GC-338F y 518R para la amplificación de acuerdo con Muyzer et al. (1995).
- Se colocaron los tubos para PCR en hielo.
- Se adicionó 1µL del DNA extraído de las muestras.
- Se realizó la amplificación de acuerdo con un ciclo de temperatura recomendado por BioRad, con el siguiente programa: activación inicial 95°C (15 min), 35 ciclos de: desnaturalización 94°C (1 min), 53°C para alineación (1 min) y elongación a 72°C (1 min) y una extensión final a 72°C (1 min).
- Se conservaron las muestras a -20°C.
- Se realizó un gel de azarosa al 2% para confirmar la amplificación del DNA.