



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
INGENIERÍA AMBIENTAL**

FACULTAD DE INGENIERÍA

**DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD MÁXIMA DE
DEGRADACIÓN DE MATERIA ORGÁNICA DISUELTA
EMPLEANDO REACTORES EMPACADOS
EXPERIMENTALES**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN INGENIERÍA
(AMBIENTAL)**

P R E S E N T A:

CHRISTOPHER ABNER GARCÍA GARCÍA

TUTOR: DR. VÍCTOR MANUEL LUNA PABELLO



MÉXICO, D. F.

JUNIO, 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dra. Petia Mijaylova Nacheva

Secretario: Dr. Oscar González Barceló

Vocal: Dr. Víctor Manuel Luna Pabello

1^{er}. Suplente: Dr. Marco Antonio Garzón Zúñiga

2^{do}. Suplente: Dr. Germán Buitrón Méndez

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Microbiología Experimental, del Departamento de Biología de la Facultad de Química, de la Universidad Nacional Autónoma de México.

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Víctor Manuel Luna Pabello

AGRADECIMIENTOS

- Al Dr. Víctor Manuel Luna Pabello, por darme una gran oportunidad al aceptarme bajo su tutela y permitirme alcanzar esta meta.
- Se agradece el apoyo económico otorgado por el Proyecto PAPIME, clave EN213104: Desarrollo, montaje y validación de prácticas de laboratorio para la enseñanza de la microbiología ambiental; Proyecto PAPIIT, clave IN215006-3: Determinación de la capacidad desinfectante de aguas residuales domésticas usando agregados minerales naturales y artificiales conteniendo plata. El Proyecto PAIP 6190-14 (VMLP) FQ-UNAM, para la compra de materiales y reactivos empleados para la realización del presente trabajo de tesis.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para llevar a cabo el desarrollo de este trabajo de tesis.

ÍNDICE

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO DE REFERENCIA	4
2.1. Industria azucarera-alcoholera en México	4
2.2. Problemática de las vinazas.	8
2.3. Tratamiento de las vinazas.	9
2.4. Humedales artificiales	11
2.5. Los humedales artificiales conceptualizados como reactores empacados	13
2.6. Estudios previos realizados	14
3. OBJETIVOS Y ESTRATEGIA DE TRABAJO	16
3.1. General	16
3.2. Particulares	16
3.3 Hipótesis	16
3.4. Justificación	16
3.5. Estrategia General de Trabajo	18
3.6. Alcances	19
3.7. Materiales	20
4. Primera Etapa Experimental.....	21
4.1. Caracterización fisicoquímica de vinazas crudas	21
4.2. Pruebas de toxicidad aguda de vinazas crudas.....	21
4.3. Determinación de propiedades físicas del medio de empaque.....	22
4.4. Preparación de inóculo microbiológico	24
4.4.1. Aclimatación del inóculo a vinazas	24
4.4.2. Determinación de actividad degradadora bacteriana	25
4.4.3. Análisis de la Actividad Enzimática	25
4.5. Resultados y discusión de esta etapa.....	25
4.6. Conclusiones parciales	37
5. Segunda Etapa Experimental.....	38
5.1. Construcción de las columnas empacadas experimentales	38
5.2. Operación de columnas experimentales empacadas	38
5.3. Pruebas de toxicidad aguda de vinazas tratadas	40

5.5. Resultados y discusión de esta etapa.....	40
5.6. Conclusiones parciales	51
6. Tercera Etapa Experimental.....	52
6.1. Construcción de los arreglos de columnas empacadas en serie	52
6.2. Operación de los arreglos de columnas empacadas en serie	53
6.3. Pruebas de toxicidad aguda con vinazas tratadas.....	53
6.4. Resultados de esta etapa y discusión.....	53
6.5. Conclusiones parciales	62
7. CONCLUSIONES GENERALES	63
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
9. ANEXOS	71
Anexo I. Prueba de toxicidad aguda con semillas de lechuga	71
Anexo II. Análisis de la actividad enzimática	76
Anexo III. Determinación de fenoles totales.....	79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Distribución de los Ingenios Azucareros en México.	4
Tabla 2. Volumen de descarga de aguas residuales industriales en 2005.....	7
Tabla 3. Principales características fisicoquímicas de las vinazas.....	9
Tabla 4. Características de procesos biológicos usados en tratamiento de vinazas.	10
Tabla 5. Características fisicoquímicas determinadas a las vinazas.....	26
Tabla 6. Características físicas de la cuarcita.	30
Tabla 7. Resultados de la actividad enzimática del inóculo.	32
Tabla 8. Actividad enzimática por tipo de enzimas.....	33
Tabla 9. Diferencias estadísticamente significativas para la DQO.	45
Tabla 10. Diferencias estadísticamente significativas para el pH.....	46
Tabla 11. Diferencias estadísticamente significativas para el OD.	46
Tabla 12. Porcentajes de toxicidad de las vinazas tratadas.....	49
Tabla 13. Diferencias significativas para las dimensiones obtenidas de radículas....	50
Tabla 14. Diferencias significativas para las dimensiones obtenidas de hipocotilos.	50
Tabla 15. Secuencias de los tamaños de medio de empaque.	52
Tabla 16. Valores finales de DQO para las columnas empacadas.	58
Tabla 17. Concentración final de compuestos fenólicos en vinazas	59
Tabla 18. Valores de pH de los arreglos de columnas.	60
Tabla 19. Variación del porcentaje de toxicidad de vinazas tratadas	60
Tabla 20. Condiciones de la prueba de toxicidad aguda.....	73
Tabla 21. Enzimas analizadas con el sistema API-Zym.....	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama general del proceso de industrialización de la caña de azúcar....	6
Figura 2. Diagrama de un humedal de flujo a) superficial y b) subsuperficial.	12
Figura 3. Esquema de un permeámetro de carga constante.	23
Figura 4. Apariencia de las vinazas muestreadas.	26
Figura 5. Semillas con a) dilución menor de vinazas b) dilución patrón de vinazas..	27
Figura 6. Grafica de la elongación de radículas con vinazas crudas.....	27
Figura 7. Grafica de la elongación de hipocotilos con vinazas crudas.	28
Figura 8. Variación del porcentaje de toxicidad de las vinazas crudas.	29
Figura 9. Aspecto de la cuarcita en sus diferentes granulometrías empleadas.....	30
Figura 10. Algunos microorganismos encontrados en el inóculo obtenido.....	31
Figura 11. Medios mínimos selectivos usados en el análisis de rutas tróficas.	31
Figura 12. Bacterias Gram negativas predominantes en el inóculo obtenido.....	32
Figura 13. Galería API-Zym con coloraciones indicadoras de las enzimas.....	33
Figura 14. Actividad enzimática general del inóculo microbiológico obtenido.	34
Figura 15. Actividad enzimática de proteasas.	35
Figura 16. Actividad enzimática de carbohidrasas.	35
Figura 17. Actividad enzimática de fosfatasas.	36
Figura 18. Actividad enzimática de lipasas.....	36
Figura 19. Diagrama del diseño de una columna empacada experimental.	38
Figura 20. a) Columnas construidas, b) válvulas de muestreo y c) difusor de aire ...	40
Figura 21. Aspecto del medio de empaque cubierto por biopelícula.	41
Figura 22. Abundancia de biopelícula en el medio de empaque	41
Figura 23. Comportamiento de la DQO.....	42
Figura 24. Comportamiento del pH.	43
Figura 25. Comportamiento de la concentración de OD.	44
Figura 26. Vinazas tratadas en columnas empacadas con cuarcita.....	47
Figura 27. Pruebas de toxicidad realizadas con las vinazas tratadas.	48
Figura 28. Dimensiones de elongación de radículas.....	48
Figura 29. Dimensiones de elongación de hipocotilos.	49

Figura 30. Diagrama de un arreglo en serie de las columnas empacadas.....	52
Figura 31. Arreglos de columnas empacadas utilizados.	54
Figura 32. Variación en la concentración de DQO para el Arreglo I.....	55
Figura 33. Variación en la concentración de DQO para el Arreglo II.....	55
Figura 34. Variación en la concentración de DQO para el Arreglo III.....	56
Figura 35. Variación en la concentración de DQO para el Arreglo IV.	56
Figura 36. Variación en la concentración de DQO para el Arreglo V.	57
Figura 37. Variación en la concentración de DQO para el Arreglo VI.	57
Figura 38. Variación en la concentración de compuestos fenólicos	58
Figura 39. Variación del pH para los arreglos de columnas empacadas.....	59
Figura 40. Toxicidad aguda de vinazas tratadas sobre a) radículas y b) hipocotilos.	61
Figura 41. Esquema de plántula de lechuga (<i>Lactuca sativa</i> L.)	71
Figura 42. Estadios de la semilla de lechuga durante la prueba.	74
Figura 43. Escala de color del sistema API-Zym.....	77

ABREVIATURAS

ANOVA	Analysis of Variance (<i>siglas en inglés</i>)
APHA	American Public Health Association
ASTM	American Section of the International Association for Testing Materials (<i>siglas en inglés</i>)
CNA	Comisión Nacional del Agua
CNIAA	Cámara Nacional de la Industria Azucarera-Alcoholera
CU	Ciudad Universitaria
DBO	Demanda Bioquímica de Oxígeno
DQO	Demanda Química de Oxígeno
g	Gramo
INEGI	Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática
MAPAS	Manual de Agua Potable, Alcantarillado y Saneamiento
μL	Microlitro (1 litro/1'000,000)
mg	Miligramo (1 gramo/1,000)
mL	Mililitro (1 litro/1,000)
mm	Milímetro (1 metro/1,000)
NOM	Norma Oficial Mexicana
OD	Oxígeno Disuelto (concentración)
OECD	Organization Economic Co-operation and Development (<i>siglas en inglés</i>)
pH	Potencial de Hidrógeno
PIB	Producto Interno Bruto
PTAR	Planta de Tratamiento de Aguas Residuales
PVC	Policloruro de vinilo
SEMARNAT	Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales
SPSS	Statistical Package for Social Sciences (<i>software</i>)
US-EPA	United States Environmental Protection Agency (<i>siglas en inglés</i>)

RESUMEN

Teniendo como objetivo el analizar la biodegradación aerobia de las vinazas en reactores empacados experimentales, el presente trabajo de tesis se llevó a cabo en tres etapas experimentales. En la primera etapa, se realizó el muestreo y la respectiva caracterización fisicoquímica de vinazas, producidas en la zafra del 2006 en el ingenio azucarero ubicado en el municipio de Martínez de la Torre, Ver. De manera adicional, se evaluó la toxicidad aguda de las vinazas sin tratamiento, con semillas de lechuga (*Lactuca sativa L.*), y se observó que tienen una toxicidad aguda del 100%, con respecto a un tóxico de referencia. Como medio de empaque de los reactores experimentales propuestos, se seleccionó la cuarcita, a la cual se le determinaron las propiedades físicas de densidad real, densidad aparente, porosidad y conductividad hidráulica. Además, se obtuvo un inóculo microbiológico aclimatado a las vinazas, al cual se le realizó un análisis de las rutas tróficas principales, observándose la presencia de microorganismos amilolíticos, proteolíticos y sacarolíticos, verificando lo anterior con un análisis de actividad enzimática, predominando las actividades proteolítica y sacarolítica.

En la segunda etapa, se diseñaron y construyeron columnas de PVC, las cuales se pusieron en operación con tres diferentes tamaños del medio de empaque (3, 6 y 9 mm). Regularmente se midieron los parámetros de pH, OD y DQO. El pH se midió para observar si la biodegradación afecta dicho parámetro; la concentración de OD para verificar que se mantuvieran condiciones aerobias ($> 2 \text{ mg OD/L}$). Asimismo, se midió la DQO para analizar la remoción de materia orgánica disuelta. De esta manera, se determinaron las condiciones de saturación del medio de empaque.

Se observó que los reactores empacados experimentales propuestos (columnas empacadas con cuarcita) llevaron a cabo un tratamiento aerobio adecuado, obteniéndose eficiencias de remoción entre el 77 y el 85% de la materia orgánica disuelta medida como DQO. Nuevamente se evaluó la toxicidad aguda de las vinazas tratadas con las columnas y se observó una disminución mayor al 50% de dicha toxicidad, con respecto a un tóxico de referencia. Se realizó un análisis

estadístico de los datos obtenidos, con el objetivo de verificar si existen diferencias significativas entre los tres tamaños de partícula del medio de empaque, en cuanto a la remoción de DQO y disminución de toxicidad aguda.

Los resultados de la segunda etapa dieron pauta a la tercera y última etapa experimental. Se emplearon seis arreglos de tres columnas empacadas con medio de diferente tamaño de partícula y colocadas en diferente secuencia. Lo anterior con el objetivo de determinar si alguna de estas secuencias de tamaños de medio, permite obtener la mayor eficiencia de remoción de materia orgánica disuelta contenida en las vinazas. Se midió regularmente el pH, la concentración de DQO y de compuestos fenólicos, interpretándolos como materia orgánica disuelta. Al terminar el tiempo de experimentación, se obtuvieron eficiencias de remoción de compuestos fenólicos entre el 36 y el 45%, lo cual corresponde a lo esperado, ya que las eficiencias de remoción de DQO fueron de entre el 80 y el 90%. Finalmente, se evaluó la toxicidad aguda de las vinazas tratadas en los arreglos de columnas y se observó que la misma disminuyó entre un 60 y 80%, con respecto al tóxico de referencia y las vinazas crudas.

1. INTRODUCCIÓN

El abastecimiento de agua ha significado desde la antigüedad un aspecto de suma importancia para el desarrollo tanto sociocultural como económico del hombre. La industria es un indicador del desarrollo económico de los países, entre los que México cuenta con una gran gama de industrias. El consumo de agua por dichas industrias, su contaminación y depuración de la misma, plantea una problemática global. La industria azucarera-alcoholera ha trascendido a lo largo de la historia de nuestro país, desde sus orígenes en la época de la colonia hasta nuestros días, como una de las industrias más representativas en cuanto a generación de empleos e insumos se refiere, ya que la caña de azúcar ha sido sin lugar a dudas uno de los productos de mayor importancia para el desarrollo comercial en el continente Americano y Europeo.

Esta industria ha enfrentado problemas técnicos de diversa índole, entre ellos el aprovechamiento integral de la misma caña de azúcar, por ejemplo el de las mieles incristalizables. Al resolver el problema presentado por dichas mieles se generó uno aún mayor, el cual involucra a las vinazas. Las vinazas son las aguas residuales generadas en la destilación de alcohol etílico. Por su composición constituyen aguas con gran capacidad contaminante. Usualmente, son dispuestas en cuerpos de agua superficiales sin un tratamiento adecuado o son usadas como aguas de riego en los cañaverales. Sin embargo, la incorrecta disposición de las vinazas causa daños muy severos de difícil y costosa reparación.

La problemática económica, técnica y ambiental que plantean las vinazas, ha obligado a que se desarrollen alternativas para su resolución o mitigación. No obstante, pese a todos los avances tecnológicos con los que se cuenta actualmente, no se ha podido implantar una tecnología adecuada para su tratamiento. A este respecto, es importante destacar que la literatura científica sobre el tema, indica que para las aguas residuales con un contenido superior a los 1,000 mg/L de materia orgánica disuelta, medida como DBO₅, es recomendable desde el punto de vista técnico y económico, que sean tratadas por medio de sistemas de depuración

anaerobios (Metcalf y Eddy, 2003). Sin embargo, a raíz de la aplicación de sistemas de tratamiento alternativos a los sistemas anaerobios, como es el caso de los humedales artificiales (HA), ha sido necesario investigar la respuesta depurativa y factibilidad del empleo de los mismos para la depuración de limpieza residuales con alto contenido de materia orgánica disuelta. Al respecto, los HA se han utilizado, a nivel experimental, para el tratamiento de aguas residuales provenientes de industrias de productos lácteos y rastros (Brix y Schierup, 1985, Rivera *et al.*, 1996).

Los HA son sistemas biológicos constituidos principalmente por tres componentes: el medio de soporte, la vegetación utilizada y los microorganismos que se desarrollan en el sistema. Si bien, existen investigaciones asociadas con la depuración de diversos tipos de aguas residuales, su aplicación a escala real, prácticamente se enfoca al tratamiento de aguas residuales municipales o similares (Miranda Ríos y Luna Pabello, 2001). En este sentido, un problema importante a considerar, que prácticamente no ha sido abordado, es el taponamiento del lecho o medio de soporte, lo cual provoca problemas de diferente índole. Dichos problemas van desde el impedimento de flujo y generación de malos olores, hasta el aporte de contaminantes (debido a su saturación) haciendo inviable y contraproducente llevar a cabo el tratamiento de las aguas suministradas.

Tomando en cuenta lo anterior, surge la idea de conjuntar la necesidad de que las vinazas reciban un tratamiento que permita lograr la calidad adecuada para su descarga a algún cuerpo receptor y la posibilidad de explorar el uso de HA, dadas las bondades, técnicas y económicas que ofrece como tratamiento.

Para el desarrollo de esta idea, resulta conveniente centrarse en el medio de soporte del HA, el cual desempeña un papel crucial en la depuración de las aguas residuales. Este componente, es capaz de retener materia orgánica disuelta por lo que es importante cuantificar la capacidad de retención del mismo, sin la existencia de condiciones que permitan que se lleve a cabo la biodegradación de la misma. El estudio de este fenómeno permitiría determinar la velocidad de saturación del medio

de soporte y con ello establecer medidas preventivas y correctivas que permitan su mejor funcionamiento. Otro aspecto de interés es la capacidad de tratamiento, traducido a remoción y degradación de materia orgánica disuelta, bajo las condiciones aerobias. Usualmente, este fenómeno se lleva a cabo con la participación de la vegetación sembrada en el lecho, a través de su sistema radicular, permitiendo la difusión de oxígeno en el medio de soporte. Finalmente, un tercer aspecto de interés a estudiar, es el fenómeno de taponamiento, el cual a la fecha se le ha prestado muy poca atención. En este sentido, el interés de este tipo de investigación incidirá directamente en la rehabilitación y disminución del efecto de taponamiento en humedales ya instalados cuyo tiempo de vida útil se ha agotado o de aquellos que se requieran diseñar para recibir altas cargas de materia orgánica disuelta.

2. MARCO DE REFERENCIA

Desde la antigüedad, el hombre ha buscado alcanzar su máximo desarrollo sociocultural, religioso, político y económico; teniendo que superar las adversidades y limitaciones que se le han presentado. Desde la revolución industrial, el desarrollo económico de los países se ha estimado con base al grado de industrialización con el que cuentan. México se encuentra ubicado entre los países medianamente desarrollados, a pesar de que cuenta con una gran diversidad de industrias, desde microempresas hasta industrias transnacionales. Sin embargo, todo desarrollo industrial conlleva problemas que a lo largo del tiempo se han acentuado cada vez más, tal es el caso del consumo de agua por las industrias, su contaminación y respectiva depuración, obligando a buscar soluciones alternativas a la que ahora ya es una problemática global.

2.1. Industria azucarera-alcoholera en México

Una de las industrias de gran interés para México es la industria azucarera-alcoholera, ya que ha sido una de las de mayor importancia para el desarrollo comercial en los Continentes Americano y Europeo. La producción de azúcar en México comenzó prácticamente desde la llegada de los españoles al Continente Americano, instalándose los primeros ingenios en los estados de Morelos y Michoacán a finales del siglo XVI. En la actualidad México cuenta con 58 ingenios azucareros, de los cuales 27 son propiedad del Gobierno Federal y el resto pertenecen al Sector Privado (CNIAA, 2005). La Tabla 1 muestra la distribución de los ingenios azucareros en el país.

Tabla 1. Distribución de los Ingenios Azucareros en México.

Estado	Ingenios	Estado	Ingenios
Veracruz	15	Nayarit	2
Jalisco	6	Puebla	2
San Luis Potosí	4	Tamaulipas	2
Oaxaca	4	Morelos	2
Michoacán	3	Quintana Roo	1
Tabasco	3	Colima	1
Sinaloa	3	Campeche	1
Chiapas	2	Total	58

Fuente: CNIAA, 2005

Este sector ha sido tradicionalmente uno de los mayores generadores de empleos en el país, teniendo un efecto socioeconómico sobre 12 millones de personas, generando 440 mil empleos directos y 2.5 millones de empleos indirectos, representando aproximadamente el 0.5% del Producto Interno Bruto Nacional (PIB) (INEGI, 2005). La producción de caña de azúcar se lleva a cabo en 15 estados del país con una superficie de aproximadamente 680 mil hectáreas, que durante la zafra 2004/2005 el total de caña de azúcar molida fue de 50.9 millones de toneladas, teniéndose un rendimiento por hectárea en campo de 77.5 toneladas por hectárea, con una producción de 5.8 millones de toneladas de caña de azúcar dando un rendimiento de 8.8 ton de azúcar por hectárea (Unión Nacional de Cañeros, A. C., 2007).

El azúcar se consume en todo el mundo, puesto que es una de las principales fuentes de calorías en las dietas de todos los países. México ocupa el 7º lugar en producción de azúcar y el mismo en cuanto a consumo (Unión Nacional de Cañeros, A. C., 2007). El consumo de azúcar por habitante oscila alrededor de 44 kg/año, por lo que se producen y consumen aproximadamente 5.4 millones de toneladas de azúcar, de las cuales 5.2 millones corresponden a azúcar y 200 mil toneladas a alta fructosa. Se estima que en el 2008, el consumo llegue a 6 millones de toneladas.

A pesar de que esta agroindustria ofrece gran cantidad de empleos al año, desde su inicio, su desarrollo y hasta el momento, no ha cumplido con el aprovechamiento integral de sus productos o subproductos, generando residuos que aún pueden representar insumos que son desaprovechados, haciéndola una agroindustria menos rentable y competitiva a nivel mundial (Durán *et al.*, 1991a). Dada esta situación, se ha visto obligada a aprovechar los “desechos” generados en el proceso de producción de azúcar (Jiménez *et al.*, 2003). Una de las cualidades de estos desechos, es su naturaleza orgánica, su biodegradabilidad, así como su potencial reutilización, todo en lo cual se plantea la necesidad de estudios técnicos que proporcionen elementos de factibilidad para hacer rentable su aprovechamiento por el sector industrial en general y los ingenios en particular.

Estos residuos son:

- Bagazo: residuo sólido generado por la extracción del jugo de la caña con alto contenido calorífico.
- Cachaza: residuo rico en materia orgánica, hierro, fósforo y sílice, aunque con bajo contenido de cobre, zinc, manganeso y molibdeno.
- Melaza: es una mezcla de fructosa y glucosa conocida como miel incristalizable.
- Vinazas: residuo de fuerte acidez, que contiene sales, rico en materia orgánica, potasio, nitrógeno y fósforo.

De los desechos antes mencionados, se ha empleado la melaza como alimento para animales poligástricos, pero principalmente para la producción de alcohol etílico, razón por la cual muchos ingenios azucareros cuentan con su propia destilería (Cortés y Pérez, 1997). En la Figura 1 se presenta de manera general el proceso típico de obtención de azúcar y alcohol etílico, así como de los subproductos sólidos y líquidos asociados.

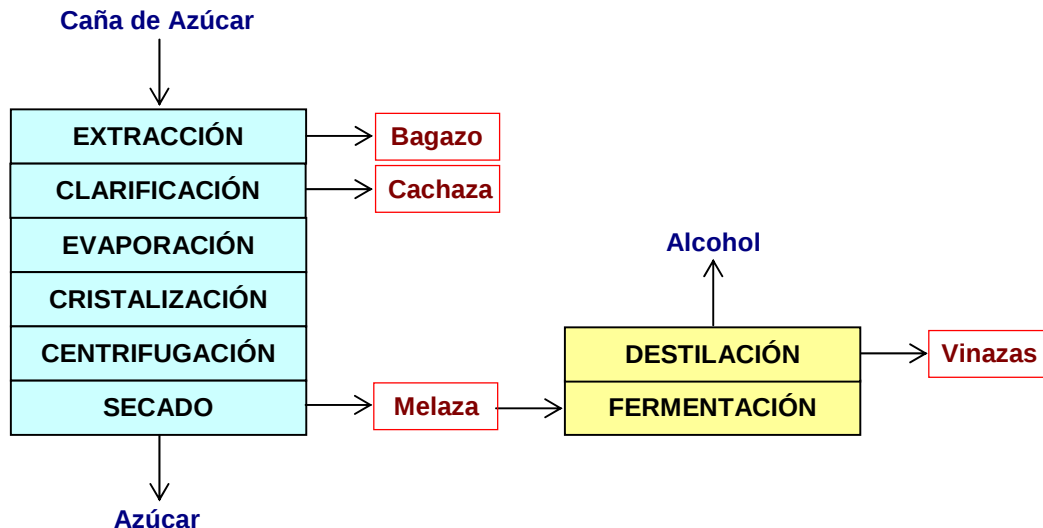


Figura 1. Diagrama general del proceso de industrialización de la caña de azúcar.

Una vez realizada la fermentación, mediante destilación fraccionada, se procede a la recuperación del alcohol etílico. El principal desecho en la producción del etanol son las vinazas, las cuales se producen aproximadamente en una proporción que puede variar en un intervalo de 10 a 20 litros de vinazas por cada litro de alcohol etílico

destilado a 96° G. L. (Ferreira y Montenegro, 1987; Hakuv, 1990; de la Cruz, 2002; Jiménez *et al.*, 2003). La capacidad de producción de alcohol etílico instalada en la actualidad es de aproximadamente 346,000 L/día, con rendimientos en un intervalo comprendido entre 230 y 250 L/tonelada de melaza procesada (Enríquez, 2005).

Uno de los principales problemas de la agroindustria azucarera-alcoholera en México, es la utilización de enormes cantidades de agua, que superan el millón de m³ al día (Bautista, 2000) confirniéndole el segundo lugar en requerimiento de dicho recurso. También ocupa el segundo lugar en cuanto a generación de agua residual, correspondiente al 24.4% del volumen de las descargas de la industria nacional (Tabla 2) ya que se desechan las aguas que provienen del lavado de la caña, de la clarificación del jugo, de la limpieza de los evaporadores, calentadores, purgas de las calderas, de los sistemas de enfriamiento y de los servicios sanitarios. Además, en la producción de alcohol etílico se desechan las aguas de enfriamiento de condensadores y tinas de fermentación los fondos de éstos y las vinazas de las torres de destilación (Durán *et al.*, 1991b).

Tabla 2. Volumen de descarga de aguas residuales industriales en 2005

Ramo Industrial	Descarga (m ³ /s)
Acuacultura	67.6
Azucarera	45.9
Petrolera	11.4
Servicios	10.3
Química	6.9
Celulosa y papel	5.5
Agropecuaria	3.2
Alimenticia	3.0
Cerveza y malta	1.6
Minera	0.8
Textil	0.7
Destilería y vitivinicultura	0.4
Beneficio de café	0.3
Curtiduría	0.1
Otros giros	12.9

Fuente: CNA, 2005

Se estima que por una tonelada de caña destinada para la producción de azúcar se obtiene alrededor de 45 kg de melaza que puede producir 12 L de alcohol, y entre 90 y 150 L de vinazas según los contenidos de sólidos totales (Orlando, 1991). Ante esto, se puede pensar que la producción de las vinazas es superior a 750 millones

de litros por año, por ello es necesario darles tratamiento o un uso adecuado para evitar la contaminación del ambiente. Se han propuesto diferentes alternativas de reutilización: reciclaje de volúmenes de efluente (Cedeño, 1995), combustión y aprovechamiento como alimento animal (Bermúdez, 1994). La composición de las vinazas es muy variable, pero como promedio cada metro cúbico de vinaza contiene: 1.8 kg de nitrógeno, 1.5 kg de pentóxido de difósforo y 4.5 kg de óxido de potasio (Gómez y Santiesteban, 2000) por lo que su uso principal es el fertirriego de los cañaverales aledaños a los ingenios (Montalvo, 1983), dada la gran cantidad de materia orgánica y nutrientes necesarios para su cultivo (Enríquez, 2005).

2.2. Problemática de las vinazas.

En particular, la industria azucarera-alcoholera es una de los cinco ramos industriales que más contamina las cuencas acuíferas del país (Durán *et al.*, 1991), ya que las vinazas son consideradas como uno de los efluentes más nocivos para el ambiente, porque aunque estos residuales no se caracterizan como tóxicos, su disposición en los cuerpos de agua implica un impacto ambiental negativo sobre la calidad del agua, así como en la flora y fauna silvestres (Rivera *et al.*, 2002). Pueden ocasionar cambios adversos en la composición de los suelos alterándolos químicamente (Huang, 1993; Huang, 1994). Además, las vinazas tienen un impacto negativo sobre el aire pues producen malos olores y aerosoles, que a su vez afectan a la población, incluso a distancias superiores a los 5 km del ingenio (Perdigón, 2005). Sin embargo, en algunos ingenios las vinazas son vertidas en cuerpos de agua, suelos agrícolas o a las redes de drenaje aledañas sin un tratamiento previo (NOM-002-SEMARNAT-1996; NOM-021-RECNAT-2000). La legislación actual prohíbe la descarga de este tipo de aguas residuales en ríos y cuerpos de agua, pero sí la permite en suelos agrícolas (CNA, 2005; NOM-001-SEMARNAT-1996).

Las vinazas tienen un poder altamente contaminante debido a que están compuestas por agua, sales minerales (potasio, azufre, magnesio, nitrógeno, fósforo y calcio), y un elevado contenido de materia orgánica disuelta o suspendida (Mahimairaja y Bolan, 2004), fluctuando entre el 6.5 y 7.5 % (Gómez y Santiesteban, 2000) lo que

les confiere altos valores de DBO₅ (25,000–40,000 mg O₂/L) y DQO (100,000–150,000 mg O₂/L) (Durán *et al.*, 1991; Bautista, 1998). Son de color marrón, olor característico a melaza y sabor a malta (Bermúdez, 2000), tienen un pH ácido (3.0–5.0), al igual que sólidos suspendidos y disueltos (8–12 %) (Sangave, 2005). Su composición es variable según provenga de melaza, jugo de caña o la mezcla de ambos y del proceso. Las vinazas provenientes de melaza presentan los mayores contenidos de materia orgánica y elementos minerales (Gloria y Orlando, 1983). La alta carga orgánica, su pH ácido y la elevada temperatura con la que son descargadas las vinazas, las convierten en un residuo líquido muy agresivo que puede ocasionar un gran impacto negativo sobre los recursos hídricos, ocasionando su eutrofización y dañando la vida silvestre aledaña a los ingenios azucareros (Jiménez, 1995; Decloux *et al.*, 2002). Sus principales características fisicoquímicas pueden observarse en la Tabla 3.

Tabla 3. Principales características fisicoquímicas de las vinazas.

Parámetro (g/L)	Concentración
DQO	60 – 120
DBO ₅	50 – 110
Sólidos totales	80 – 110
Sólidos volátiles totales	60 – 80
Sólidos suspendidos	4 – 6
Carbohidratos	5 – 10
Lípidos	4 – 8
Proteínas	30 – 40
Fósforo Total (PT)	0.09 – 0.12
Nitrógeno Total (NT)	2 – 8

Fuente: Reyes, 2006

2.3. Tratamiento de las vinazas.

Las presiones sociales, legales y ecológicas, han generado en los últimos años un incremento en la atención hacia el desarrollo de nuevas tecnologías para el tratamiento de las vinazas (Bramucci y Nagarajan, 2003). Se han ensayado métodos fisicoquímicos y biológicos, siendo éstos últimos los más apropiados por la gran cantidad de compuestos orgánicos biodegradables que presentan en su composición, permitiendo obtener una aceptable calidad de agua para su descarga en cuerpos receptores (Sheehan y Greenfield, 1980).

Dentro de los sistemas de tratamiento biológico para la depuración de vinazas, se han empleado sistemas aerobios como biodiscos, sistemas de lodos activados, biorreactores de membrana y biopelícula, así como biorreactores empacados de lecho fijo alcanzando, en general, porcentajes de remoción de DQO en el orden del 80 al 85% (Zamudio, 1993; Tchobanoglous, 2000; Cereceda, 2000; Nuissier, 2002; Rivas, 2003; TorOve, 2005). Entre los sistemas anaerobios, se encuentran los reactores anaerobios de lecho fluidizado, de lecho expandido y de lecho con carbón activado granular, de flujo ascendente y digestores anaerobios, los cuales han alcanzando eficiencias de remoción de DQO entre el 80 y el 91% (Cooper, 1980; Martínez, 2002; Rivera *et al.*, 2002; Ha *et al.*, 2005, Mijaylova, 2005). Además, se han empleado de manera combinada, sistemas que se consideran anaerobios/aerobios que implican la mezcla de dos o más de los diferentes sistemas antes mencionados logrando eficiencias de remoción de DQO entre el 90 y el 95% (Delgenes, 1997; Ahn *et al.*, 2005; Hong *et al.*, 2005).

En general, todos estos sistemas, ofrecen gran versatilidad en cuanto a diseño y adaptación a diversas situaciones, manteniendo una capacidad de operación aceptable. La Tabla 4, muestra las ventajas, desventajas y eficiencias de depuración obtenidas por los diferentes tipos de tratamiento empleados en la depuración de vinazas.

Tabla 4. Características de procesos biológicos usados en tratamiento de vinazas.

Tratamiento	Eficiencia	Ventajas	Desventajas
Aerobio	80 - 95%	Proceso relativamente rápido. Calidad del efluente alta. Apta para aguas superficiales.	Necesita un sistema de aireación. Consume mayor energía. Genera mayor cantidad de lodos secundarios.
Anaerobio	80 - 91 %	Menor gasto de energía. Aprovechamiento de biogás. Pocos lodos secundarios. Proceso eficiente con concentraciones altas de contaminantes.	Proceso lento y delicado por su operación. Reactores voluminosos con costos altos de construcción. Necesita aireación antes de su disposición final.
Combinación de Sistemas Anaerobios y Aerobios	90 - 95 %	Más rápido y más estable que los anteriores. Aprovechamiento del biogás. Calidad alta del efluente.	Necesita un sistema de aireación por lo que consume energía. Posiblemente requiere un calentamiento adicional.

Fuente: Reyes, 2006

2.4. Humedales artificiales

Por otra parte, de manera relativamente reciente, se ha despertado el interés en el uso de humedales artificiales (HA) para el tratamiento de aguas residuales domésticas e industriales. Este tipo de sistemas se basan en procesos naturales, que basan su capacidad depuradora en la combinación de procesos fisicoquímicos y biológicos. Existen diversos tipos de HA, entre los más empleados se encuentran los HA de flujo subsuperficial, los cuales contienen tres principales componentes que se relacionan e interactúan para llevar a cabo la depuración del agua residual,: 1) el medio de soporte, 2) las plantas vasculares y 3) los microorganismos (Miranda Ríos y Luna Pabello, 2001). En este tipo de humedales la remoción de contaminantes se lleva a cabo de tres formas: el medio de soporte o empaque, hace la función de filtro en el cual se retienen las impurezas sólidas que están contenidas en el agua (Bishop, 2005). La vegetación absorbe principalmente las sustancias nutritivas disueltas en el agua, compuestos nitrogenados y fosforados, para integrarlos en su biomasa. Adicionalmente, se cuenta con la presencia de una comunidad de microorganismos, que se adhieren a la superficie del material de empaque, llevando a cabo la mayor remoción de los contaminantes al metabolizarlos (Cereceda, 2000). Esta biodegradación es posible debido a que el medio de soporte proporciona una gran área de contacto entre el agua y los microorganismos, mientras que la vegetación permite las condiciones aerobias necesarias para llevar a cabo la transformación de dichos compuestos a CO₂, agua y biomasa.

Existe un equilibrio entre la biopelícula, el oxígeno requerido y la concentración de nutrimentos en el agua (Da Cámara, 2002; Emanuelsson, 2003). Cuando por algún motivo este equilibrio se rompe, por ejemplo con un exceso de nutrimentos, el funcionamiento del sistema se ve afectado de tal manera que, los espacios huecos existentes en el material de empaque se saturan de biomasa microbiana, disminuyendo la concentración de oxígeno disuelto en el agua, propiciando condiciones anaerobias, lo que provoca problemas de malos olores, deficiencia en la degradación de los nutrimentos y mal funcionamiento del sistema (Rousseau, 2003).

Los HA se diseñan y construyen para aumentar la eficiencia de depuración mediante la optimización de los procesos físicos, químicos y biológicos que ocurren naturalmente en los humedales (Chavarría, 2001, Ramírez, 2003, US-EPA, 1988; 2000). Como se puede apreciar en la Figura 2, los humedales pueden ser de flujo superficial, donde el agua fluye por encima del nivel del medio de soporte, o de flujo subsuperficial, donde el agua fluye por debajo del medio de soporte (Lara, 1999; Garc *et al.*, 2003).

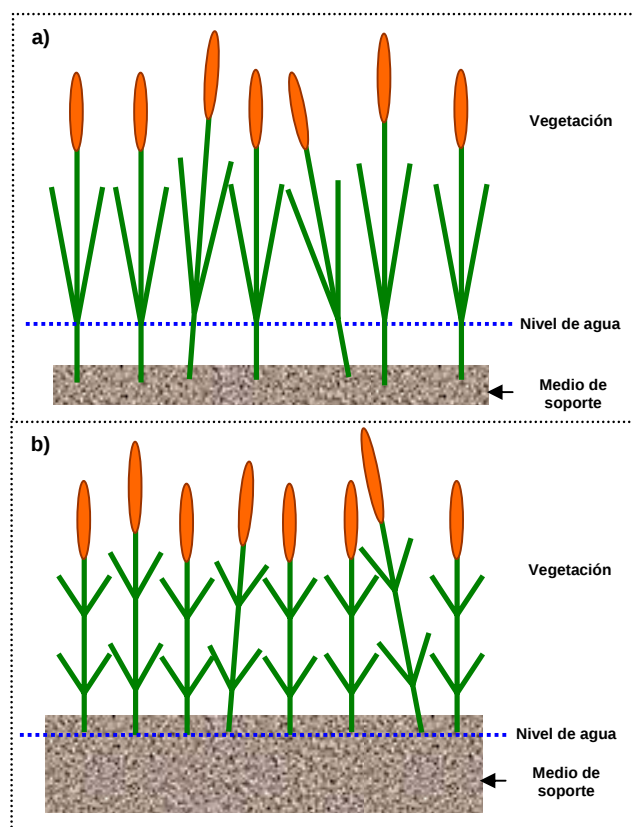


Figura 2. Diagrama de un humedal de flujo a) superficial y b) subsuperficial.

Su aplicación ha resultado exitosa en una amplia variedad de casos principalmente de aguas con bajas y medianas cargas orgánicas. No obstante, se desconoce la capacidad depuradora que pueda tener sobre aguas residuales con altas concentraciones de materia orgánica, como las provenientes de procesadoras de productos lácteos, mataderos o destilerías. Cabe señalar que la vida útil de un HA que depure aguas con alto contenido de materia orgánica puede llegar a ser muy limitada, debido principalmente a la saturación del medio de soporte, lo que

conllevaría a problemas de diferente índole como sería la muerte de la vegetación o de taponamiento originando corto circuitos hidráulicos (US-EPA, 2000). A efecto de conocer información que permita esclarecer la factibilidad o no de emplear este tipo de sistemas, así como de estudiar la capacidad del medio de soporte para depurar la materia orgánica suministrada, se puede conceptualizar un experimento que simplifique el fenómeno. En este sentido, una opción es eliminar la participación de las plantas vasculares y estudiar únicamente los otros dos componentes.

2.5. Los humedales artificiales conceptualizados como reactores empacados

Si se toma una fracción de un humedal subsuperficial (sin planta), dicha fracción se puede considerar como un reactor empacado. Al igual que un humedal de flujo subsuperficial, los reactores empacados son sistemas que están constituidos principalmente por un medio de soporte o empaque cuyas características influirán en la eficiencia de depuración de los reactores. Los tipos de empaques en uso común pueden ser medios minerales o fabricados. Ciertos tipos de medios minerales convencionales se utilizan para tratamientos a alta tasa, es decir aguas residuales con alta carga orgánica. Sin embargo, las principales desventajas de los medios minerales de empaque son: su peso y su limitado espacio vacío, que limita de un modo efectivo la profundidad de los lechos usados, donde la mitad del volumen del lecho está ocupado por el propio medio de empaque (US-EPA, 2000). El propósito de los medios de empaque es el de proporcionar un soporte sólido y estable para el crecimiento de los microorganismos, permitiendo exponer la máxima área superficial al flujo de líquido bajo tratamiento en contacto con el aire (US-EPA, 1999). Dependiendo de su granulometría, algunos medios rocosos o minerales proporcionan aproximadamente $149 \text{ m}^2/\text{m}^3$ de área superficial con menos del 40% de espacio vacío (Dafonte, 1999).

El uso de reactores empacados con material rocoso para el tratamiento de aguas residuales, es un sistema establecido desde hace tiempo, por lo que se ha acumulado una considerable experiencia operacional del funcionamiento de los

mismos, especialmente en el tratamiento, a baja tasa, con aguas de origen doméstico (Ramírez, 1997). Basándose en estas experiencias, se han desarrollado cierto número de relaciones útiles, empíricas y semiempíricas, para describir el funcionamiento de estos reactores.

Por otra parte, los reactores de alta tasa, son sistemas que operan con altas concentraciones de nutrientes (Kyung, 2005), y por ello, tienden a tener problemas de taponamiento y saturación del medio de empaque, esto debido al desmesurado crecimiento de biomasa que se acumula y a su vez genera cortocircuitos hidráulicos (MAPAS, 2001). Este tipo de reactores empacados generalmente recibe cargas de materia orgánica entre 0.4 y 3.2 kg de DBO/m³día siendo la carga hidráulica mayor a 3 m³ líquido/m³ de lecho al día (Fenoglio, 2001). Su eficiencia de remoción cae por lo general en el intervalo de 85 o 90% (Metcalf y Eddy, 2003). Se deben utilizar medios de soporte con tamaño de partícula grande (15 – 25 mm) a fin de reducir el riesgo de obstrucción. Además, la porosidad y propiedades fisicoquímicas del medio son factores que deben considerarse (Ramos, 1999).

Con altas concentraciones de nutrientes en la fase líquida, como en el caso de las vinazas, la tasa de difusión del oxígeno necesario para su degradación en condiciones aerobias es muy baja (Hibiya, 2003). En este tipo de estudios, generalmente, se introduce aire dentro del líquido, ya sea mediante un sistema de aireación o por convección y gravedad, lo cual favorece condiciones aerobias para la biodegradación microbiana de la materia orgánica. La introducción de aire con burbujas finas en el seno del líquido, es una forma muy eficiente para que la difusión del oxígeno se lleve a cabo, especialmente cuando se emplean los medios de empaque que tienen espacios intersticiales muy angostos (Romero, 1999).

2.6. Estudios previos realizados

En estudios previamente realizados, sobre el tratamiento aerobio de las vinazas (Reyes, 2006), se trabajó con muestras de un ingenio azucarero ubicado en el municipio de Comalcalco en el estado de Tabasco. En dichos estudios, se llevó a

cabo la caracterización de las vinazas, midiendo DQO, DBO₅, pH, SST, SVT y SVT empleando para ello las técnicas analíticas reconocidas nacional e internacionalmente. Las pruebas realizadas en matraces, evidenciaron que empleando una solución al 10% de vinazas ($\pm 8,000$ mg DQO/L), se lograba disolver oxígeno en una concentración superior a 2 mg/L, lo que permitía llevar a cabo la biodegradación de las vinazas bajo condiciones aerobias. Además, se realizaron experimentos en reactores empacados con escoria volcánica, operados bajo condiciones aerobias a diferentes valores de pH, y se obtuvo información que indicaba que conforme pasa el tiempo de experimentación, el control del pH pierde relevancia sobre la velocidad de biodegradación. Adicionalmente, se observó que a lo largo del proceso de biodegradación, predomina la actividad enzimática amilolítica. Los porcentajes de remoción de materia orgánica logrados fueron logrados. Se obtuvieron tasas de remoción de DQO de entre el 78 y el 85%.

Si bien, los estudios antes mencionados dan indicios del potencial que tienen los reactores empacados para la depuración de aguas residuales con alto contenido de material orgánico, no se cuenta con los suficientes elementos que permitan fundamentar el diseñar y describir el funcionamiento de los mismos, cuando se trata de operarlos a alta tasa. En este sentido, existen varias incógnitas por despejar. Por ejemplo, es importante determinar cual es la capacidad máxima de degradación de materia orgánica disuelta bajo condiciones aerobias, que puede ser removida mediante el uso de reactores biológicos empacados con un material no poroso; la importancia del diámetro de partícula empleada como empaque; la eficiencia depurativa de este tipo de sistema operando en serie, así como el nivel de toxicidad de las aguas tratadas.

3. OBJETIVOS Y ESTRATEGIA DE TRABAJO

3.1. General

- Analizar el proceso de biodegradación aerobia de las vinazas en reactores empacados alimentados por lote en un sistema cerrado.

3.2. Particulares

- Valorar la capacidad de retención de materia orgánica, el proceso de taponamiento y recuperación de funcionalidad del material de empaque.
- Determinar la eficiencia de remoción, de materia orgánica disuelta, de un reactor empacado experimental así como de compuestos fenólicos.
- Conocer mediante plantas vasculares, el grado de toxicidad aguda de las vinazas crudas y de las vinazas tratadas en cada etapa.

3.3 Hipótesis

Se puede llevar a cabo el tratamiento aerobio de las vinazas mediante reactores empacados con cuarcita, alcanzando eficiencias de remoción superiores al 80%, llevando a cabo la degradación biológica de la materia orgánica presente en las vinazas.

3.4. Justificación

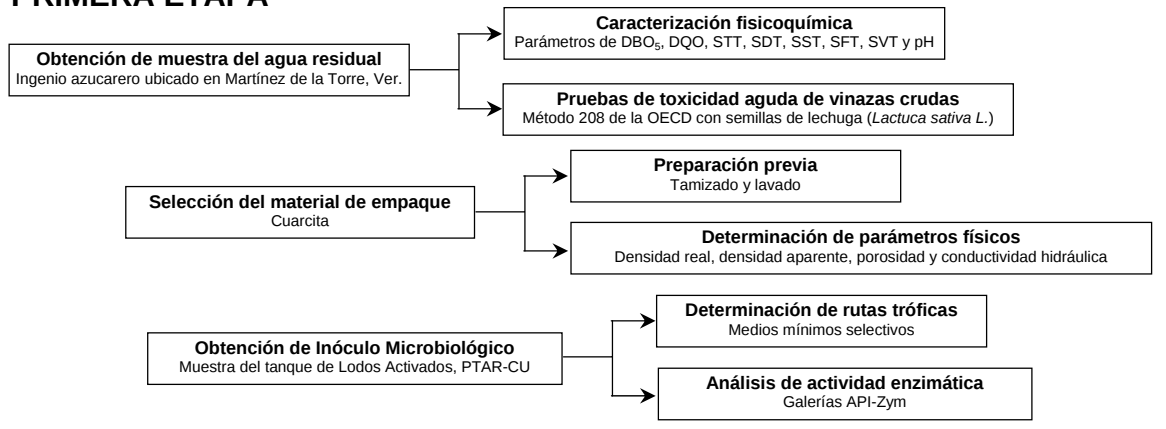
Se sabe que los humedales de flujo subsuperficial pueden manejar aguas residuales con baja y media carga de materia orgánica, pero se desconoce si funcionan al ser alimentados con aguas residuales con alto contenido de materia orgánica. En este sentido, un problema importante a considerar, que prácticamente no ha sido abordado, es el taponamiento del lecho o medio de soporte, lo cual ocasiona problemas de diversa índole, como son el impedimento de flujo, la generación de

malos olores, aporte de contaminantes al medio, haciendo contraproducente el tratamiento de las aguas suministradas.

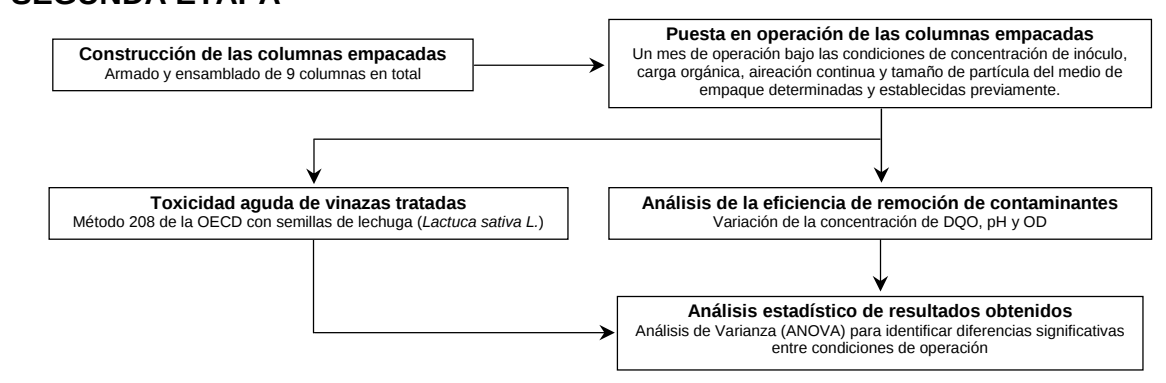
Tomando en cuenta la problemática ambiental que representan las vinazas, así como la posible alternativa de su tratamiento mediante sistemas no convencionales, anterior, surge la idea de conjuntar la necesidad de que las vinazas reciban un tratamiento que permita lograr la calidad adecuada para su descarga a algún cuerpo receptor y la posibilidad de explorar el uso de HA, dadas las bondades, técnicas y económicas que ofrece como tratamiento. Para el desarrollo de esta idea, resulta conveniente fraccionar los componentes del sistema y centrarse en el medio de soporte del HA, el cual desempeña un papel crucial en la depuración de las aguas residuales. Al ser este componente capaz de retener materia orgánica disuelta, es importante llevar a cabo su cuantificación, sin la existencia de condiciones que permitan que se lleve a cabo la biodegradación de la misma. El estudio de este fenómeno permitiría determinar la velocidad de saturación del medio de soporte y con ello establecer medidas preventivas y correctivas que permitan su mejor funcionamiento. Otro aspecto de interés es la capacidad de remoción y degradación de materia orgánica disuelta, bajo las condiciones aerobias. Este fenómeno se lleva a cabo con la participación de la vegetación sembrada en el lecho, a través de su sistema radicular, permitiendo que el oxígeno se difunda en el medio de soporte. Finalmente, un tercer aspecto de interés a estudiar, es el fenómeno de taponamiento, el cual a la fecha se le ha prestado muy poca atención. En este sentido, la investigación prevista, incidirá directamente en la rehabilitación y disminución del efecto de taponamiento en humedales artificiales ya instalados cuyo tiempo de vida útil se ha agotado, o bien, de aquellos que se requieran diseñar para recibir altas cargas de materia orgánica disuelta.

3.5. Estrategia General de Trabajo

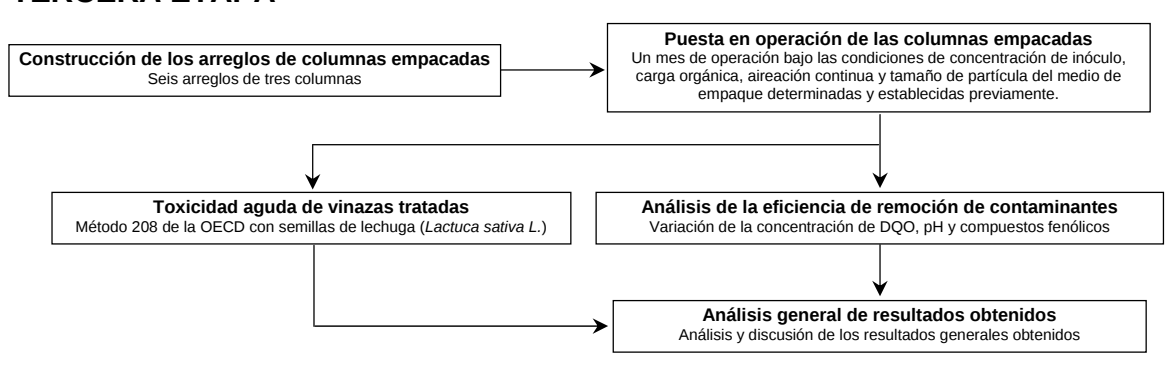
PRIMERA ETAPA



SEGUNDA ETAPA



TERCERA ETAPA



3.6. Alcances

Primera etapa

- Caracterización de las vinazas mediante los parámetros de DBO₅, DQO, STT, SDT, SST, SVT, SFT y pH de las vinazas crudas, según el Manual de Métodos Estandarizados (APHA, 1998).
- Evaluación de la toxicidad aguda de las vinazas crudas con semillas de lechuga (*Lactuca sativa*), según el método 208 de la guía para el análisis de sustancias químicas (OECD, 1993).
- Selección y preparación del medio de empaque, así como la determinación de su densidad aparente, densidad real, porosidad y conductividad hidráulica.
- Obtención de un inóculo microbiológico aclimatado a las vinazas, identificación de rutas tróficas y análisis de la actividad enzimática de dicho inóculo.

Segunda etapa

- Diseño, construcción y empackado de las columnas experimentales.
- Evaluación de la variación de DQO, pH y OD, durante la operación de las columnas empacadas experimentales.
- Determinación de la toxicidad aguda de las vinazas tratadas obtenidas de las columnas empacadas experimentales.
- Análisis estadístico para determinar diferencias significativas entre las diferentes condiciones de operación.

Tercera etapa

- Acomodo de las columnas empacadas experimentales en arreglos de tres columnas en serie.
- Evaluación de la variación de DQO, pH y compuestos fenólicos durante la operación de los arreglos de columnas empacadas experimentales.
- Evaluación de la toxicidad aguda de las vinazas tratadas obtenidas de los arreglos de columnas empacadas experimentales.
- Análisis y discusión general de los resultados obtenidos.

3.7. Materiales

Columnas experimentales

- Medio de empaque seleccionado (cuarcita).
- Tubos de PVC de 65 cm de longitud y 7 cm de diámetro interno.
- Discos de piedra difusora de aire de 7 cm de diámetro interno.
- Manguera flexible de silicón para conexiones de aire de 5 mm de diámetro.
- Bomba compresora de aire con flujo de 2,500 cm³ de aire/minuto.
- Galerías Api ZYM de la marca BioMérieux®

Sustancias y Reactivos

- Vinazas, obtenidas del complejo azucarero de Martínez de la Torre, Ver.
- Reactivos y medios de cultivo selectivos para identificación de actividad metabólica

Equipo

- Medidor de oxígeno disuelto marca Corning con membrana para O₂
- Potenciómetro marca Oakton, con electrodo de vidrio marca Orion
- Horno modelo Robertshaw de Controls Company
- Mufla modelo F-A1525M, marca Thermolyne Corporation
- Incubadora modelo 774, marca J. M. Ortiz

Programas de Software

- Statistical Package for Social Sciences SPSS, versión 12.0

4. Primera Etapa Experimental

Esta primera etapa consistió en la caracterización fisicoquímica de las vinazas, así como pruebas de toxicidad aguda de las mismas; la determinación de parámetros físicos de interés del medio de empaque y la obtención de un inóculo aclimatado a las vinazas, así como un análisis trófico y de la actividad enzimática del mismo.

4.1. Caracterización fisicoquímica de vinazas crudas

Se determinaron características fisicoquímicas de las vinazas mediante las técnicas establecidas en el manual de métodos estándar (APHA, 1998).

- Sólidos totales (ST) (método 2540-B).
- Sólidos disueltos (SD) (método 2540-C).
- Sólidos suspendidos (SS) (método 2540-D).
- Sólidos fijos (SF) y sólidos volátiles (SV) (método 2540-E).
- Demanda bioquímica de oxígeno (DBO₅) (método 5210-B).
- Demanda química de oxígeno (DQO) (método 5220-C).
- Nitrógeno. Para este parámetro se consideraron las concentraciones de nitrógeno en sus diferentes estados de oxidación: amoniacal, nitritos y nitratos; empleándose los métodos: 4500-NH₃, 4500-NO₂⁻ y 4500-NO₃⁻.
- Fósforo. Conocido como ortofosfatos, este parámetro se determinó mediante el método 4500-P, también conocido como método colorimétrico del ácido vanadomolibdenfosfórico.
- Potencial de hidrógeno (pH). Este parámetro fue determinado de manera electroquímica con un potenciómetro digital de electrodo automático.
- Compuestos fenólicos totales. Estos compuestos se determinaron con una técnica titulométrica en retroceso (Anexo III).

4.2. Pruebas de toxicidad aguda de vinazas crudas

Según el método 208 de la guía de la OECD, se llevó a cabo un bioensayo de toxicidad aguda empleando semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.), la cual es una prueba estática, en la que se pueden evaluar los efectos fitotóxicos de las vinazas en

el proceso de germinación de las semillas y en el desarrollo de las plántulas durante los primeros días de crecimiento, determinando así, la inhibición en la germinación y la inhibición en la elongación de la radícula y del hipocotilo. Se preparó una dilución patrón de vinazas (una parte de vinazas y nueve de agua destilada) la cual se consideró como una dilución al 10% del valor total de DQO con aproximadamente 8,000 mg de O₂/L. Se prepararon seis diluciones a partir de esta dilución patrón empleando un intervalo de concentraciones (100, 50, 25, 12, 6, 3 y 1.5%). Para estas diluciones menores se utilizó agua dura reconstituida (APHA, 1998).

Se utilizó un control positivo de (ZnSO₄) a una concentración de 1 mg/mL, como tóxico de referencia. También se empleó un control negativo que consistió en agua dura reconstituida. La prueba se realizó en una incubadora cerrada a una temperatura constante, de 22 ± 2 °C durante 120 h. Se consideraron 20 semillas por réplica y se realizaron tres réplicas. Se tomaron como referencia un blanco negativo que consistió en agua dura reconstituida (APHA, 1998) y como blanco positivo una dilución de sulfato de zinc (II) a una concentración de 1 mg de ZnSO₄/mL. Al evaluar la toxicidad aguda de las vinazas se compararon las dimensiones obtenidas contra el blanco negativo como las máximas con un 0% de toxicidad y contra el blanco positivo como el 100% de toxicidad. El porcentaje de inhibición se midió con el grado de inhibición en la germinación o en la elongación de la radícula e hipocotilo (Anexo I).

4.3. Determinación de propiedades físicas del medio de empaque

Se determinaron las propiedades físicas del material de empaque seleccionado mediante los siguientes métodos:

➤ **Densidad aparente (ρ_{Ap})**

Se pesó una probeta graduada limpia y se registró su peso; se consideró un volumen de 100 mL y se llenó de medio de empaque, de manera lo más uniforme posible. Se volvió a pesar la probeta y se registró. Se calculó la densidad aparente con la siguiente ecuación:

Ecuación 1 $\rho_{Ap} = (\text{peso con material} - \text{peso sin material}) \text{ g/100 mL}$

➤ Densidad real (ρ_R)

Se tomó una probeta graduada, se llenó con agua hasta un volumen de 100 mL. Se pesaron 10 g del medio y se depositaron en la probeta con agua. Se calculó según la siguiente ecuación:

Ecuación 2 $\rho_R = 10 \text{ g}/(\text{volumen con material} - \text{volumen sin material}) \text{ mL}$

➤ Porosidad (P)

Se refiere al espacio libre de la matriz del medio, conformado por los poros que quedan entre las partículas del medio. Se calculó con la ecuación:

Ecuación 3 $P = 100 \left(1 - \frac{\rho_{Ap}}{\rho_R} \right)$

➤ Conductividad hidráulica (k)

El coeficiente de conductividad hidráulica k es una medida de la capacidad de un medio poroso para conducir agua bajo un gradiente de potencial hidráulico (cm^3/s). Este coeficiente se determinó mediante un permeámetro de carga constante (Norma ASTM D2434), el cual es un dispositivo muy simple (Figura 3).

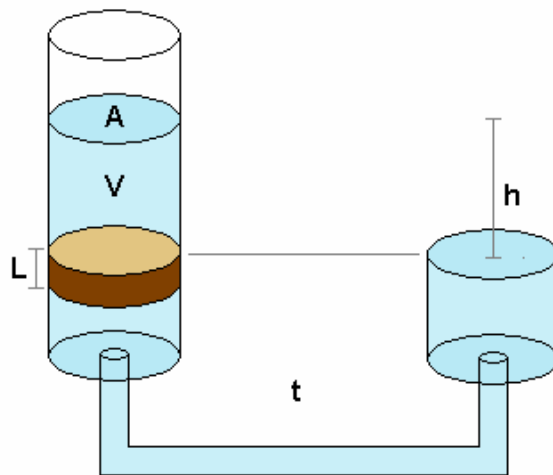


Figura 3. Esquema de un permeámetro de carga constante.

El cálculo de la conductividad hidráulica se realizó poniendo una capa de medio de empaque con un horizonte de longitud L, dentro de un tubo de área transversal A, y se sometió a una carga hidráulica h. El agua fluyó a través de la muestra, midiéndose

tiempo t que tarda en pasar el volumen V de agua. De esta manera, aplicando la ley de Darcy:

Ecuación 4
$$Q = \frac{dV}{dt} = Aki$$

La ecuación de continuidad del gasto establece:

Ecuación 5
$$Q = Av$$

A es el área del conducto y v la velocidad del flujo. Llevando esta expresión a la Ley de Darcy, se deduce que:

Ecuación 6
$$v = ki$$

El intervalo en que la ley de Darcy es aplicable, la velocidad del flujo es directamente proporcional al gradiente hidráulico; esto indica que, dentro del campo de aplicabilidad de la ley de Darcy, el flujo en el suelo es laminar. El gradiente hidráulico medio vale:

Ecuación 7
$$i = \frac{(h_1 - h_2)}{L}$$

Entonces:

Ecuación 8
$$k = \frac{VL}{hAt}$$

En estas ecuaciones, k es el coeficiente de permeabilidad del suelo, en cuyo valor numérico se reflejan propiedades físicas del suelo y en cierta medida ese valor indica la mayor o menor facilidad con que el agua fluye a través del suelo, estando sujeta a un gradiente hidráulico dado.

4.4. Preparación de inóculo microbiológico

4.4.1. Aclimatación del inóculo a vinazas

Se tomó una muestra de lodos biológicos del tanque de lodos activados de la PTAR de CU. Dichos lodos fueron aclimatados a las vinazas diluidas (aproximadamente al

10%), durante quince días de incubación en completa oscuridad a 22 °C, con agitación y aireación constantes.

4.4.2. Determinación de actividad degradadora bacteriana

Se emplearon cinco medios de cultivo que, por su composición, permitieron la identificación, por separado, de la presencia y actividad degradadora específica de bacterias amilolíticas, proteolíticas, sacarolíticas, lipolíticas y celulolíticas.

4.4.3. Análisis de la Actividad Enzimática

Esta prueba se realizó empleando galerías API-Zym de la marca BioMérieux®, para la cual se siguieron las instrucciones del fabricante (Anexo II). Estas galerías permiten observar rápida y simultáneamente 19 actividades enzimáticas a partir de pequeñas cantidades de muestra. De acuerdo a una tabla de lectura, la cual es una escala de intensidad de color proporcionada por el fabricante, es posible estimar el nivel de actividad enzimática que se registra con valores en un intervalo que va de 0 a 5, siendo 5 la actividad más alta.

Para realizar la evaluación de la actividad enzimática, según instrucciones del fabricante, se agregaron 5 mL de agua destilada en las cámaras de humidificación y 65 µL de muestra del inóculo en cada uno de los pozos en condiciones asépticas. Se incubaron las galerías a 35 °C durante 4 horas, después de este tiempo, se retiró la muestra de vinaza para evitar interferencia en la lectura debido a su coloración. Posteriormente, se adicionó una gota de los reactivos Zym-A y Zym-B en cada pozo.

4.5. Resultados y discusión de esta etapa

Caracterización fisicoquímica de las vinazas crudas

Las características fisicoquímicas de las vinazas muestreadas, procedentes del complejo azucarero-alcoholero ubicado en el municipio de Martínez de la Torre, en el estado de Veracruz, se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Características fisicoquímicas determinadas a las vinazas.

Parámetro	Valor medio determinado	Parámetro	Valor medio determinado
DBO ₅	60.5 ± 3.2	DQO	80.2 ± 2.2
STT	125.0 ± 1.7	Fenoles totales	3.75 ± 1.6
SST	35.4 ± 1.9	Nitratos	8.8 ± 1.2
SSF	5.3 ± 1.2	Nitritos	0.1 ± 1.2
SSV	30.5 ± 1.1	Amoniaco/Amonio	1.2 ± 1.2
SDT	90.3 ± 1.4	Ortofosfatos	4.7 ± 2.2
SDF	15.8 ± 1.8	Sulfatos	16.0 ± 1.3
SDV	75.2 ± 1.1	pH (unidades)	3.5 ± 0.0
Acidez	3.8 ± 2.4		

Valores expresados en g/L, a menos que se especifique otra unidad.

Además, las características organolépticas que presentaron las vinazas son las siguientes: olor muy característico semejante a la melaza, color ocre oscuro y sabor agrio. La Figura 4, muestra el aspecto de las vinazas obtenidas.



Figura 4. Apariencia de las vinazas muestreadas.

La mayoría de los sólidos contenidos en las vinazas se encuentran disueltos. La relación observada entre sólidos fijos y volátiles fue de 5.25, por lo que se infiere que la mayoría de los compuestos contenidos en las vinazas son orgánicos. Además, fue posible observar que tienen una relación DBO₅/DQO de 0.75, por lo que se asume que dicha materia orgánica es biodegradable. El pH de las mismas fue muy ácido, con alta concentración de nitratos, sulfatos y ortofosfatos en forma iónica.

Pruebas de toxicidad aguda de vinazas crudas

Se observó que las vinazas, al 10% de su concentración original, ocasionan el 100% de inhibición en la germinación de las semillas de lechuga. Cuando se emplearon concentraciones menores a la solución patrón, se observó germinación y elongación de radículas e hipocotilos de las semillas de lechuga (Figura 5).

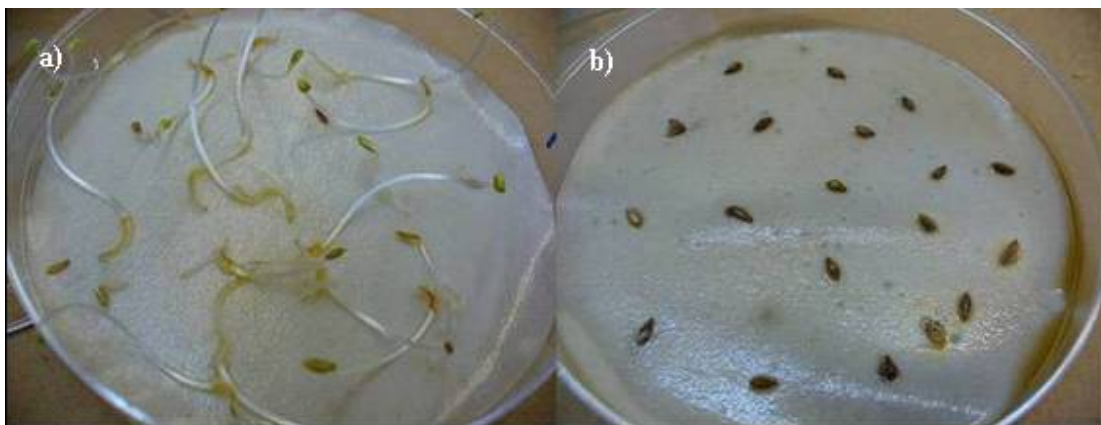


Figura 5. Semillas con a) dilución menor de vinazas b) dilución patrón de vinazas.

La Figura 6, muestra la gráfica de las dimensiones promedio de las radículas y la Figura 7, las dimensiones de los hipocotilos. Se observó que la dilución de vinazas al 10% tiene la misma toxicidad que el blanco positivo, correspondiente al tóxico de referencia que fue una sal de zinc (1 mg de ZnSO_4/mL). Sin embargo, a diluciones mayores, es decir por debajo del 1% de vinazas, la toxicidad de las vinazas disminuyó hasta valores muy cercanos a los del blanco negativo.

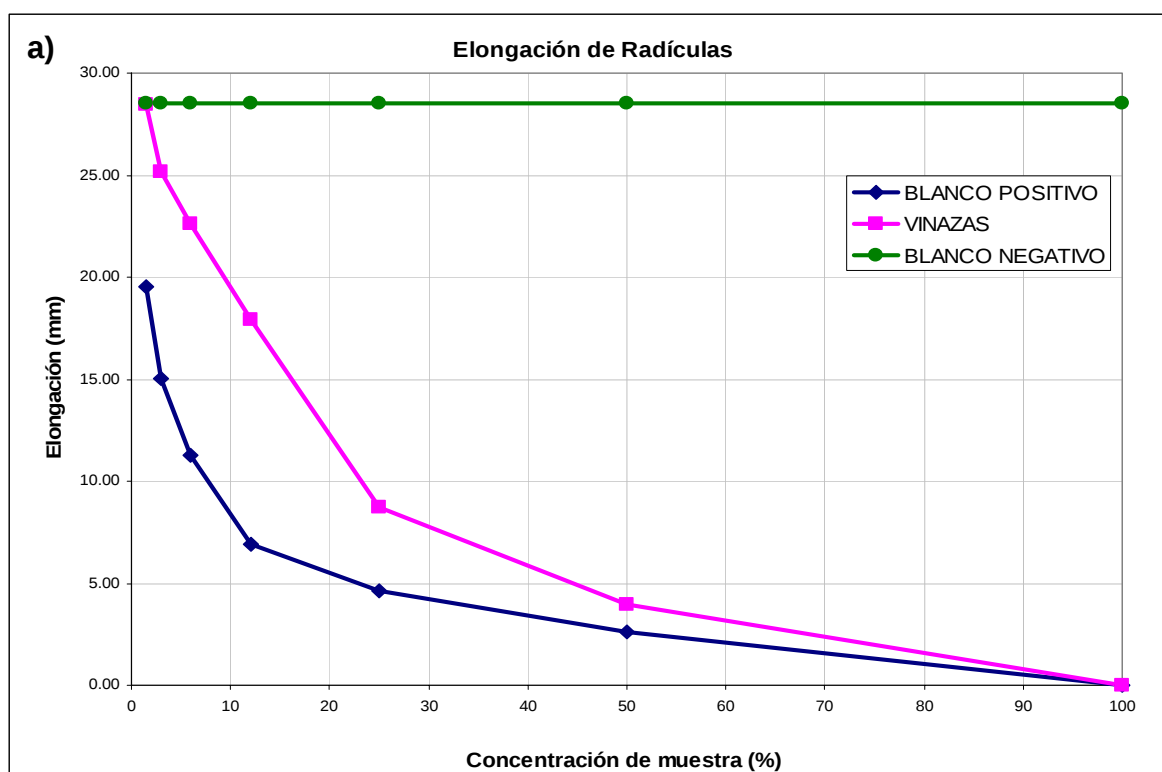


Figura 6. Gráfica de la elongación de radículas con vinazas crudas.

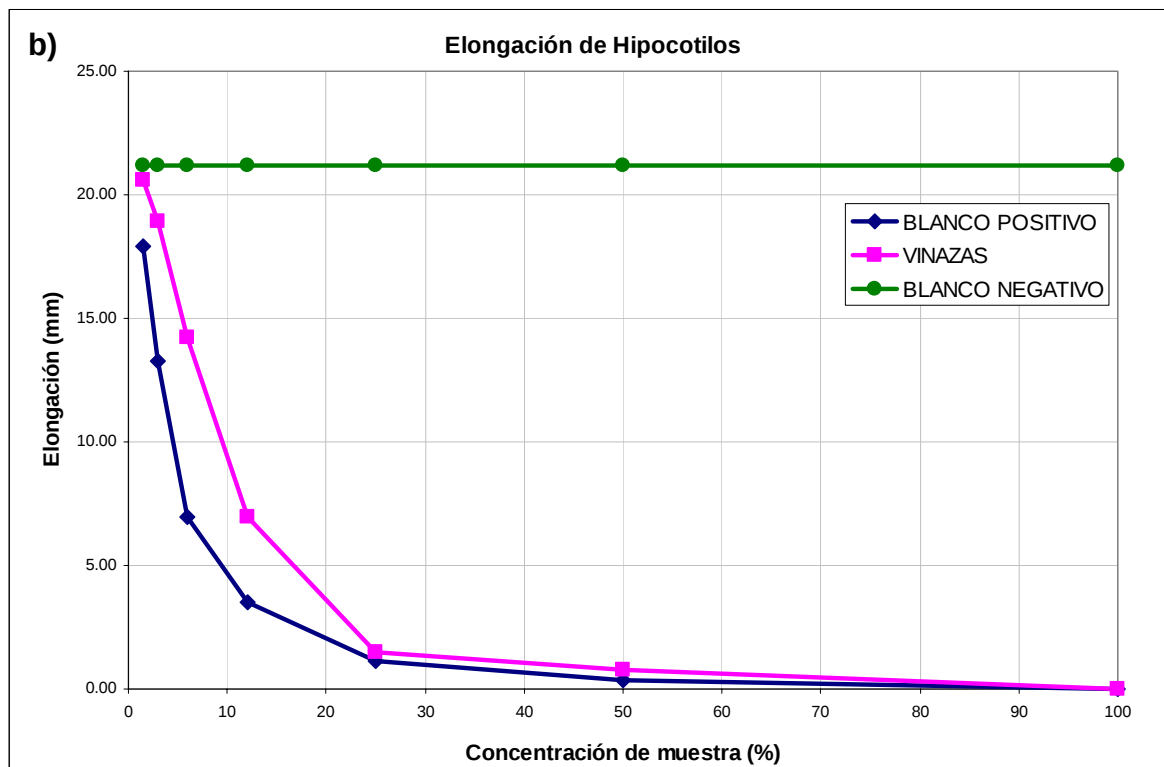


Figura 7. Grafica de la elongación de hipocotilos con vinazas crudas.

Para las radículas, se obtuvo un máximo aproximado de 28.5 mm con el blanco negativo, teniéndose una reducción del 100 al 0.18% de toxicidad conforme se aumentó la dilución de las vinazas. Por otro lado, al analizar las dimensiones de los hipocotilos, se obtuvo un máximo de 21.2 mm aproximadamente para el blanco negativo, con una reducción de toxicidad del 100 al 2.83%, conforme aumentó la dilución de las vinazas.

Al realizar un análisis de la variación de la toxicidad, conforme la dilución de las vinazas aumentó, se pudo observar que a una dilución menor al 1% de las vinazas, su toxicidad aguda disminuye hasta permitir que la elongación de radículas e hipocotilos alcancen dimensiones muy cercanas a las obtenidas con el blanco negativo (agua dura reconstituida). Esta variación de toxicidad se puede observar en la gráfica de la Figura 8, en donde la concentración de muestra del 100% corresponde a la concentración de vinazas al 10%, que fue la que se utilizó en este trabajo como solución patrón.

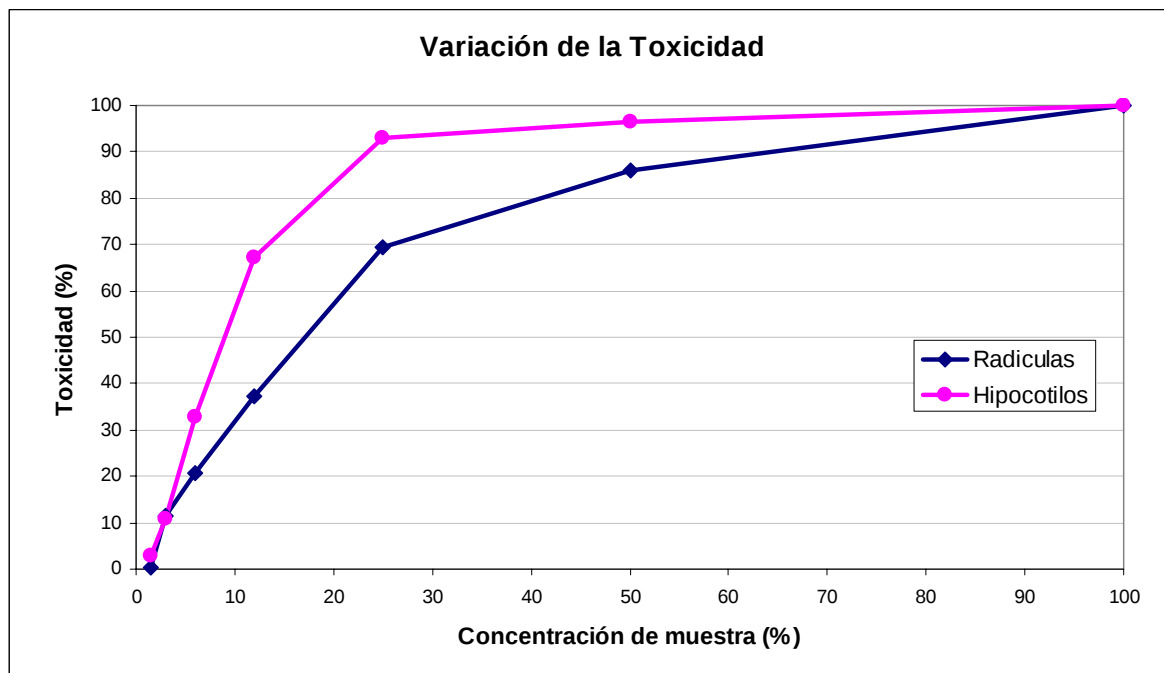


Figura 8. Variación del porcentaje de toxicidad de las vinazas crudas.

Determinación de parámetros físicos del medio de empaque

Después de llevar a cabo un análisis de características, disponibilidad y costos de diversos materiales minerales, generalmente utilizados en la construcción, se seleccionó a la cuarcita como material de empaque para las columnas, ya que tiene las siguientes cualidades:

- No se descompone, degrada o desmorona en el agua.
- Presenta coloraciones muy variadas.
- Su superficie es rugosa pero no porosa.
- No tiene elementos o componentes nutritivos que se disuelvan.
- No absorbe agua dentro de su estructura.
- Es un material sumamente resistente.

Además, es un material muy económico por su abundancia en la naturaleza. Dicho material se adquirió, lavó y tamizó para obtener granulometrías de diferentes tamaños medios de partícula (3 mm, 6 mm y 9 mm). La Figura 9 muestra el aspecto de este material y sus diferentes granulometrías empleadas.



Figura 9. Aspecto de la cuarcita en sus diferentes granulometrías empleadas.

Se determinaron las propiedades físicas del medio de empaque mediante pruebas sencillas, involucrando el peso y volumen del material, así como de un permeámetro de carga constante construido para determinar la conductividad hidráulica. Dichas propiedades determinadas se muestran en la Tabla 6. Se observó que la cuarcita no absorbe agua ni se desquebraja por la humedad; tiene una gran dureza, es muy resistente, tiene superficie lisa y no se desgasta en medios ácidos o básicos.

Tabla 6. Características físicas de la cuarcita.

Parámetro	Medio de 3 mm	Medio de 6 mm	Medio de 9 mm
Densidad real (g/cm ³)	2.5 ± 0.0	2.5 ± 0.0	2.5 ± 0.0
* Densidad aparente (g/cm ³)	1.47 ± 0.17	1.37 ± 0.15	1.27 ± 0.19
* Porosidad (%)	41 ± 0.12	45 ± 0.10	49 ± 0.11
* Conductividad hidráulica (cm ³ /s)	0.436 ± 0.21	0.468 ± 0.18	0.482 ± 0.17
* Valores promedio			

Aclimatación del inóculo a vinazas crudas

Se obtuvo un inóculo microbiológico a partir de una muestra del tanque de lodos activados de la planta de CU, el cual se colocó en una dilución de vinazas al 10%, con agitación y aireación continuas, bajo condiciones de oscuridad y temperatura controlada durante quince días. Se observó degradación de las mismas ya que se obtuvo una concentración considerable de biomasa, partiendo de un valor de 5.5 mg/L hasta 50 mg/mL y la concentración de DQO disminuyó paulatinamente (de 10,000 a 7,500 mg DQO/L). Se pudieron observar bajo el microscopio algunos de los microorganismos presentes en el inóculo obtenido, entre los cuales se encontraron rotíferos, ciliados, amibas, flagelados y predominantemente bacterias (Figura 10).



Figura 10. Algunos microorganismos encontrados en el inóculo obtenido.

Análisis microbiológico de rutas tróficas

Mediante el uso de medios selectivos se identificó la ruta trófica de las bacterias del inóculo obtenido, se observó crecimiento de colonias en los medios para microorganismos amilolíticos, sacarolíticos, proteolíticos y mesófilos aerobios, con lo cual se asume que dentro del inóculo obtenido se tiene un consorcio bacteriano tan amplio que es posible llevar a cabo la degradación de las vinazas (Figura 11). De manera adicional, se preparó medio mínimo con vinazas como único sustrato y se observó el crecimiento del mismo tipo de bacterias las cuales fueron identificadas como bacterias Gram negativas mediante tinciones (Figura 12).

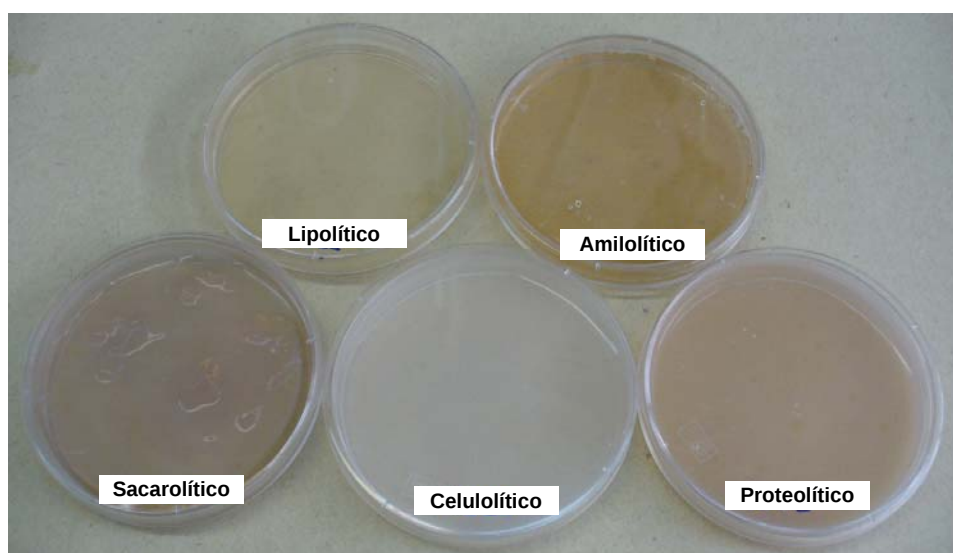


Figura 11. Medios mínimos selectivos usados en el análisis de rutas tróficas.

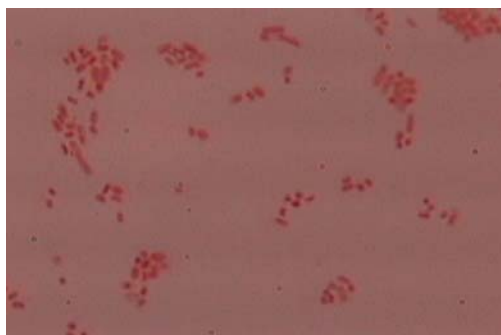


Figura 12. Bacterias Gram negativas predominantes en el inóculo obtenido.

Análisis de la Actividad Enzimática

Se realizó un análisis de la actividad enzimática de los primeros 15 días de aclimatación de los microorganismos presentes en el inóculo mediante galerías API-Zym, ya que durante este tiempo se observó mayor diversidad de actividad enzimática de los microorganismos. Se asignaron valores numéricos donde 0 representó la ausencia de dicha actividad enzimática o una concentración no detectable de enzima, siendo 5 la máxima actividad registrada. En la Tabla 7 se muestran los resultados de este análisis.

Tabla 7. Resultados de la actividad enzimática del inóculo.

Enzima Identificada	Días de Análisis															A E
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fosfatasa alcalina	0	1	1	1	2	2	3	3	3	3	3	2	1	1	1	27
Estearasa (C4)	1	1	2	2	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1	1	27
Estearasa lipasa (C8)	1	2	3	3	3	3	3	3	3	1	0	0	0	0	0	25
Lipasa (C14)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	15
Leucina arilamidasa	3	3	3	4	5	5	5	5	3	1	1	1	1	1	1	42
Valina arilamidasa	3	3	3	3	3	3	3	3	2	2	2	1	1	1	1	34
Cistina arilamidasa	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	26
Tripsina	3	3	4	4	4	5	5	4	2	2	2	2	2	2	2	46
α -quimiotripsina	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	10
Fosfatasa ácida	0	0	1	1	1	2	2	2	3	2	1	1	1	1	1	19
Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa	1	2	2	2	2	2	2	3	3	3	2	2	2	2	2	32
α -galactosidasa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
β -galactosidasa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
β -glucoronidasa	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	19
α -glucosidasa	4	4	4	3	3	3	2	2	2	2	2	1	1	1	1	35
β -glucosidasa	4	4	5	5	5	4	4	3	2	2	2	1	1	1	1	44
N-acetil- β -glucosaminidasa	2	2	3	3	3	4	4	5	5	4	3	1	1	0	0	40
α -manosidasa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
α -fucosidasa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Actividad Enzimática	28	31	37	37	39	41	41	41	36	28	23	16	15	14	14	

En la tabla anterior las columnas representan los días que se realizó el análisis y las filas representan las enzimas identificadas con las galerías API-Zym. La Figura 13 muestra una galería API-Zym con las coloraciones indicadoras de cada enzima.



Figura 13. Galería API-Zym con coloraciones indicadoras de las enzimas.

Las enzimas detectadas con las galerías API-Zym se agruparon por el tipo de enzima en: fosfatasas, proteasas, carbohidrasas y lipasas. La Tabla 8 muestra la actividad enzimática de cada uno de estos grupos, así como el porcentaje de actividad correspondiente.

Tabla 8. Actividad enzimática por tipo de enzimas

Tipo de enzimas	Enzimas	AE (puntos)	AE grupo (puntos)	AE porcentual (%)
Proteasas	Tripsina	46	158	35.91
	Leucina arilamidasa	42		
	Valina arilamidasa	34		
	Cistina arilamidasa	26		
	α -quimiotripsina	10		
Carbohidrasas	β -glucosidasa	44	138	31.36
	N-acetil- β -glucosaminidasa	40		
	α -glucosidasa	35		
	β -glucoronidasa	19		
	α -galactosidasa	0		
	β -galactosidasa	0		
	α -manosidasa	0		
	α -fucosidasa	0		
Fosfatasas	Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa	32	78	17.50
	Fosfatasa alcalina	27		
	Fosfatasa ácida	19		
Lipasas	Estearasa (C4)	27	67	15.23
	Estearasa lipasa (C8)	25		
	Lipasa (C14)	15		

La columna marcada como AE representa la suma de todos los valores obtenidos para cada enzima, mientras que la fila indicada como *Actividad Enzimática* representa la actividad enzimática diaria de todas las enzimas. Analizando por columnas, se pudo observar que la actividad enzimática aumentó durante los

primeros días, alcanzando el máximo registrado al sexto día, para después comenzar a disminuir, tal como se puede observar en la Figura 14.

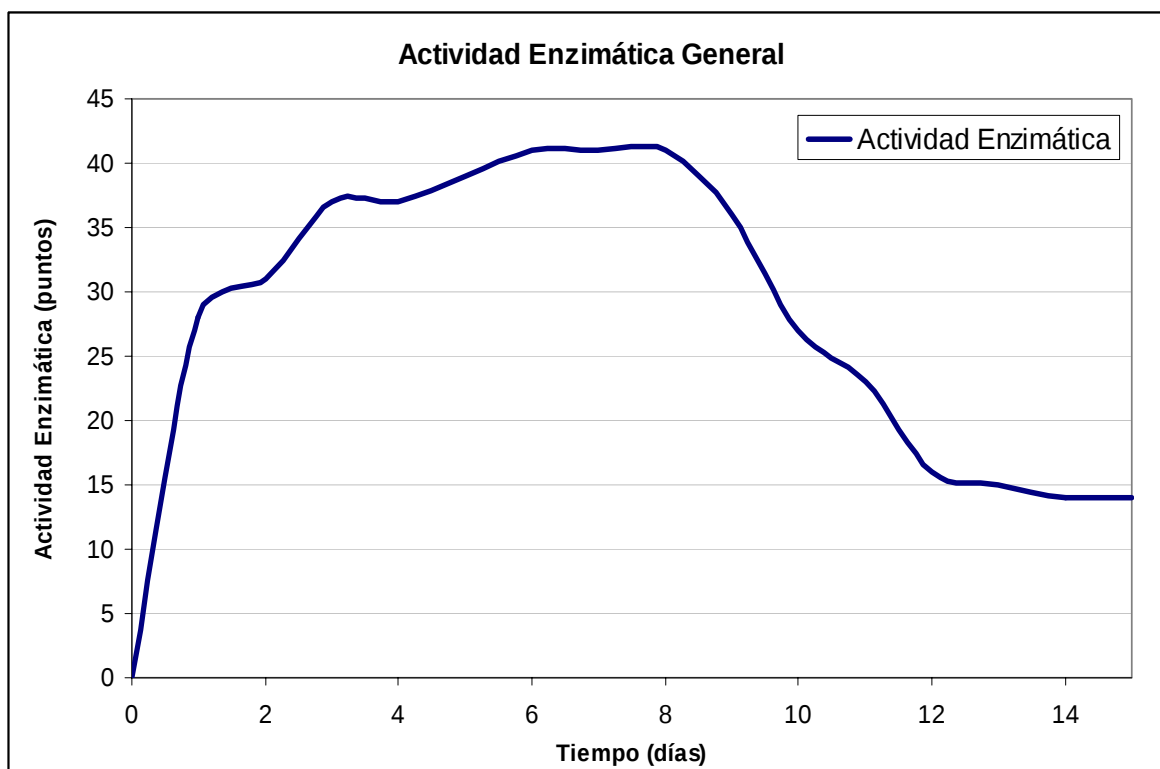


Figura 14. Actividad enzimática general del inóculo microbiológico obtenido.

Analizando por filas la Tabla 7, en primer lugar se registró una actividad proteolítica (con 158 puntos), destacando la tripsina con 46 puntos de actividad y la leucina arilamidasa con 42 puntos. En segundo lugar se observó actividad sacarolítica con (138 puntos), donde la β -glucosidasa alcanzó 44 puntos y la N-acetil- β -glucosaminidasa 40 puntos. Se observó que la actividad fosfolítica ocupó el tercer lugar con (78 puntos), teniendo la Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa una actividad de 32 puntos y la fosfatasa alcalina 27 puntos. Finalmente, la actividad lipolítica fue la que menor cantidad de puntos registró (67 puntos), siendo la estearasa (C4) la que alcanzó 27 puntos y la estearasa lipasa (C8) 25 puntos. Las actividades de todas las enzimas y de cada uno de los grupos de enzimas se pueden observar de manera gráfica en las figuras 15 a la 18.

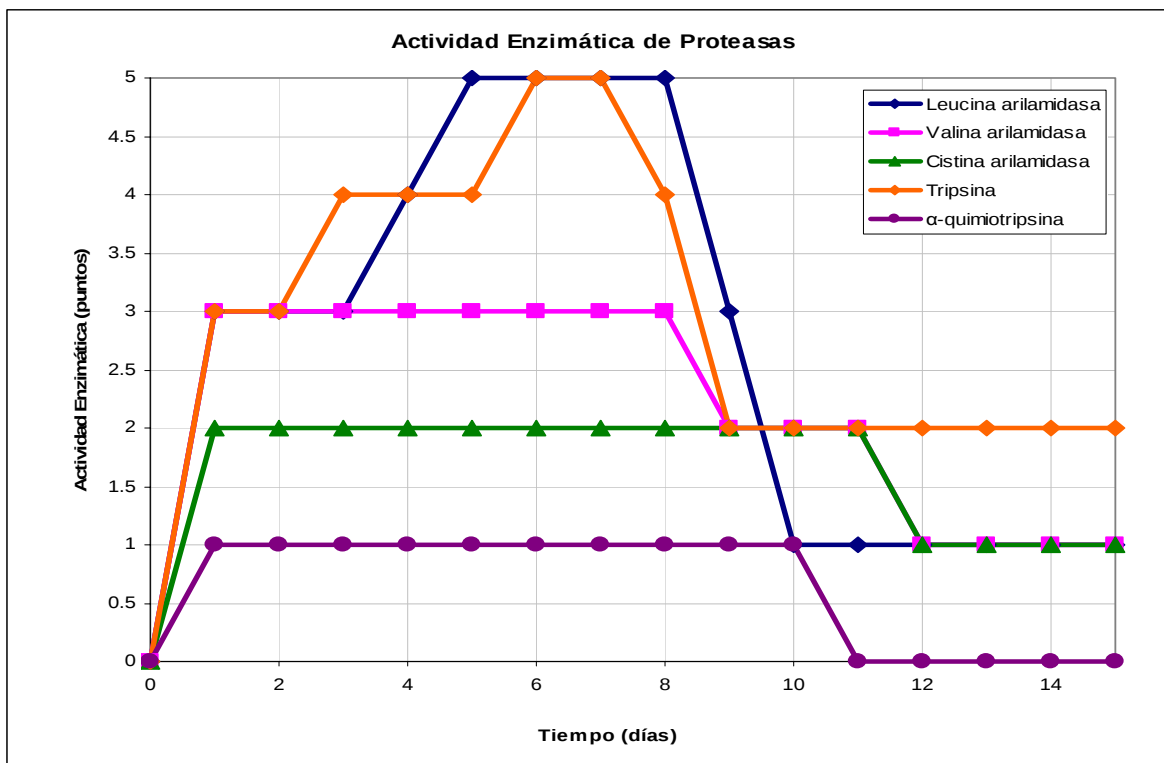


Figura 15. Actividad enzimática de proteasas.

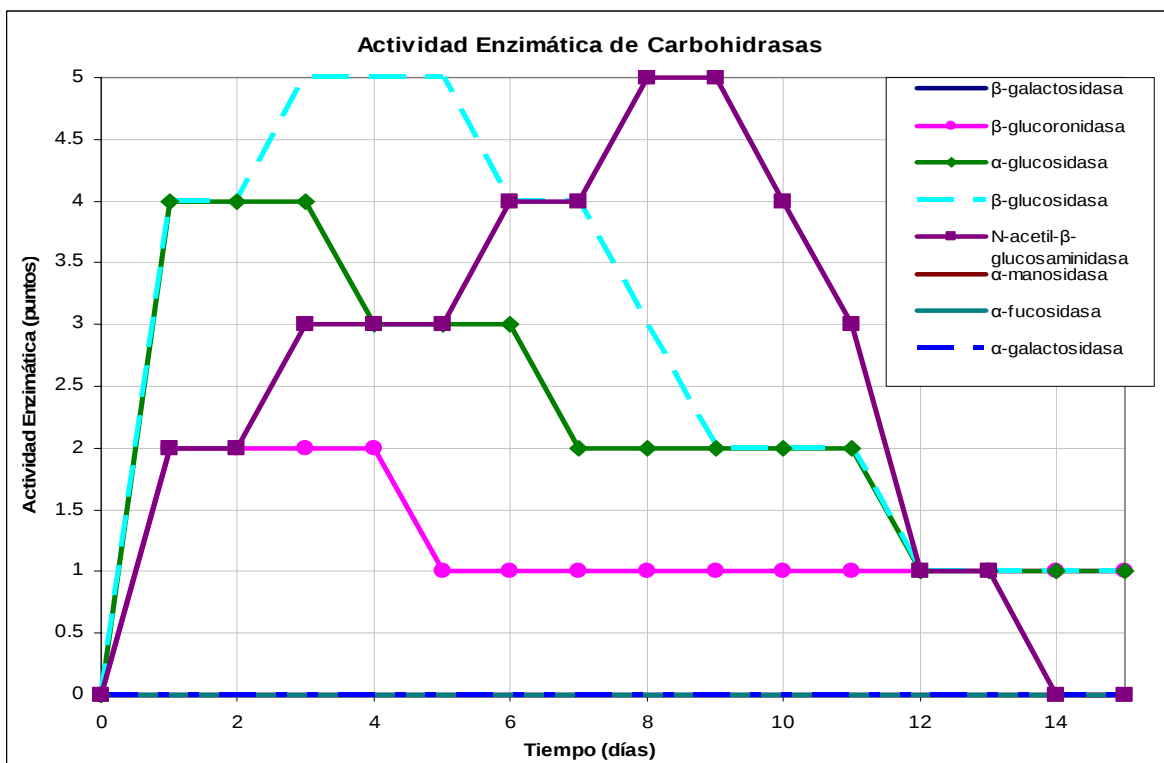


Figura 16. Actividad enzimática de carbohidrasas.

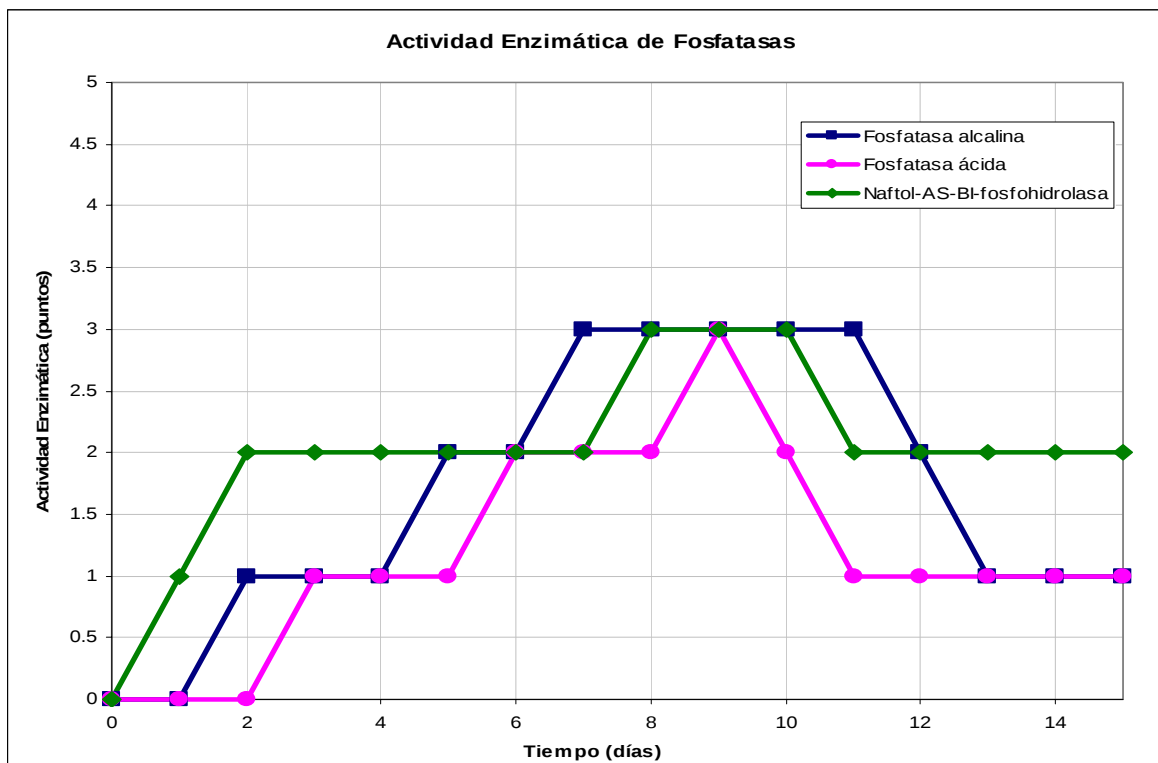


Figura 17. Actividad enzimática de fosfatasas.

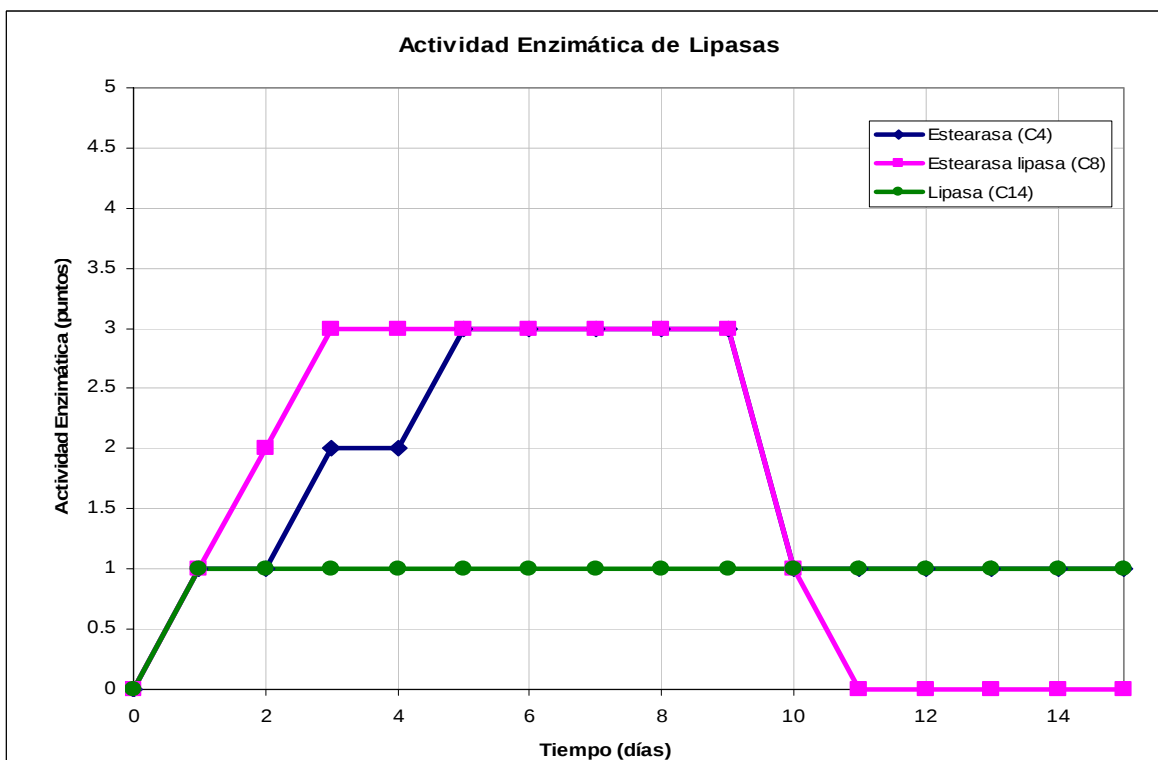


Figura 18. Actividad enzimática de lipasas.

En las gráficas de las figuras anteriores, se puede observar que hay enzimas cuya actividad aumenta, alcanza un máximo y vuelve a disminuir, mientras que otras permanecen a un nivel constante de actividad u otras simplemente no presentaron actividad. Este comportamiento lo presentaron varias enzimas como la tripsina, la N-acetil- β -glucosaminidasa y la β -glucosidasa, aumentando durante los primeros días y disminuyendo posteriormente. Por otro lado, otras enzimas como la β -galactosidasa o la α -fucosidasa, no fueron detectadas a ningún tiempo, asumiéndose que dicha actividad enzimática no existió por falta del sustrato indicado. Ante tales comportamientos, se asumió que la actividad enzimática más diversa se presenta principalmente en los primeros días de aclimatación del inóculo a las vinazas.

4.6. Conclusiones parciales

- Las vinazas muestreadas, mostraron un alto contenido de materia orgánica, interpretado mediante los parámetros de DBO₅ y DQO. Además, presentaron pH ácido y alto contenido de sólidos suspendidos y disueltos, lo cual era esperado de acuerdo a la bibliografía consultada.
- La toxicidad aguda de las vinazas crudas, es decir sin un tratamiento, equivale a la toxicidad del blanco positivo que se uso de referencia (sal de Zn⁺²), con un valor del 100%. Esta toxicidad se interpretó como el grado de inhibición de la germinación de las semillas y la respectiva elongación de radículas e hipocotilos.
- El medio de empaque seleccionado fue la cuarcita, cuyas propiedades físicas fueron determinadas para fines prácticos, resultó ser un material muy adecuado para la realización de los posteriores experimentos.
- El inóculo microbiológico obtenido fue aclimatado exitosamente a las vinazas, ya que se obtuvo una disminución de la DQO (de 10,000 a 7,500 mg DQO/L); un aumento en la concentración de biomasa (de 5.5 mg/mL a 50 mg/mL) y una especialización de rutas tróficas con una gran variedad de actividad enzimática.

5. Segunda Etapa Experimental

Con base a los datos obtenidos de la etapa anterior, y del inóculo microbiológico especializado en la degradación de vinazas, se procedió a la segunda etapa, la cual consistió específicamente en pruebas de degradación aerobia de vinazas dentro de columnas empacadas con cuarcita.

5.1. Construcción de las columnas empacadas experimentales

Las columnas experimentales empacadas fueron diseñadas para contener un horizonte del medio de empaque de 50 cm. Se adaptó un difusor de aire en la parte inferior de las columnas, con el objetivo que el aire atravesase el horizonte de medio de empaque y permitió que las mismas operaran bajo condiciones aerobias. También se les agregaron puntos de muestreo a diferentes alturas de las columnas (Figura 19).

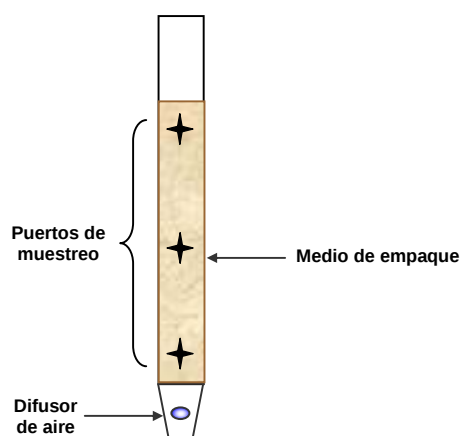


Figura 19. Diagrama del diseño de una columna empacada experimental.

5.2. Operación de columnas experimentales empacadas

Preparación de las columnas experimentales empacadas

Las columnas experimentales construidas, se empacaron 50 cm de horizonte con cuarcita, el medio de empaque seleccionado. Se les dio un espacio extra de manera vertical, tomándose en cuenta también el espacio ocupado por el aire bombeado a la columna, lo que provoca la expansión del agua. El sistema de aireación que se adaptó a cada una de las columnas consistió en una bomba neumática de tamaño

pequeño con un flujo continuo de aire de 2,500 cm³ de aire/minuto, se consideró este flujo debido a que las dimensiones de las columnas no permitían un tiempo de contacto suficiente entre la masa de agua y el aire inyectado. Este flujo de aire se hacía pasar a través de un matraz con agua destilada para que el aire se humedeciera y así disminuir la pérdida de agua por evaporación.

Con el objetivo de eliminar los sólidos suspendidos, primeramente se filtraron las vinazas (Equipo de filtración Millipore con filtro GFA de 1.16 micras). Posteriormente, se colocó una parte de vinazas en nueve de agua destilada para obtener una dilución con una concentración aproximada de 8,000 mg/L de DQO. Se preparó una mezcla de vinazas diluidas y el inóculo microbiológico para llenar las columnas con ella (para las columnas con medio de empaque de 3 mm se ocuparon 300 mL, para las de 6 mm fueron 390 mL y para las de 9 mm se ocuparon 450 mL de vinazas diluidas). Se manejaron tres columnas para cada tamaño de partícula de la cuarcita, teniéndose en total nueve columnas.

Operación de las columnas

Inicialmente se determinaron los parámetros de DQO, pH y concentración de OD de la mezcla de vinazas con inóculo para tenerlos como referencia posterior. El parámetro de OD se determinó con equipo especializado que consistió en un medidor digital de electrodo de membrana, el pH con un potenciómetro digital de electrodo automático y la DQO mediante el método titulométrico de la APHA. Las columnas empacadas se pusieron en aireación continua durante 30 días, tiempo durante el cual se determinaron cada 5 días los parámetros antes mencionados, con un total de 7 determinaciones. Las muestras se tomaron en los diferentes puntos de muestreo colocados en las columnas. De esta manera se podrá observar de manera paralela la variación en la concentración de DQO en cada columna para los diferentes tamaños de granulometría del medio de empaque. A partir de los datos que se registraron, se obtuvieron gráficas de los tres parámetros de interés: la variación de la concentración de DQO, pH y de la concentración de OD.

5.3. Pruebas de toxicidad aguda de vinazas tratadas

Después del tiempo de experimentación, se vaciaron las columnas y se realizó una prueba de toxicidad aguda a las nueve muestras de vinazas tratadas, siguiendo la misma metodología realizada con las vinazas crudas. Se manejaron muestras de vinazas tratadas, vinazas crudas, un control positivo (1 mg de ZnSO_4/mL) y un control negativo que consistió en agua dura reconstituida (APHA, 1998).

5.5. Resultados y discusión de esta etapa

Construcción de columnas

Se construyeron columnas con tubos de PVC hidráulico de 65 cm de longitud y 7 cm de diámetro interno. En el extremo inferior se les adaptó un disco difusor de aire y a diferentes alturas de la columna, cuatro válvulas de muestreo, con el fin de obtener muestras representativas y verificar si las condiciones de la columna fueron homogéneas tal como se muestra en la Figura 20.



Figura 20. a) Columnas construidas, b) válvulas de muestreo y c) difusor de aire

Desarrollo de biopelícula

Durante el tiempo de experimentación se desarrolló biopelícula sobre el medio de empaque, siendo visiblemente más abundante en el medio de tamaño más pequeño, que en el medio de tamaño más grande. La Figura 21 se muestra el aspecto macroscópico del medio de empaque después del tiempo de experimentación.



Figura 21. Aspecto del medio de empaque cubierto por biopelícula.

Al observar los diferentes tamaños de medio de empaque de manera microscópica, se pudo observar mayor crecimiento de biopelícula en el medio de empaque de menor tamaño (aproximadamente 0.230 mm de grosor), ya que la misma cubrió la mayoría de la superficie del medio (70 % del área superficial). Mientras que en el medio de mayor tamaño, se obtuvo un grosor de biopelícula de aproximadamente 0.180 mm, cubriendo solamente la superficie de manera parcial (40%). La Figura 22 muestra el aspecto de la biopelícula sobre los medios de empaque (3, 6 y 9 mm).

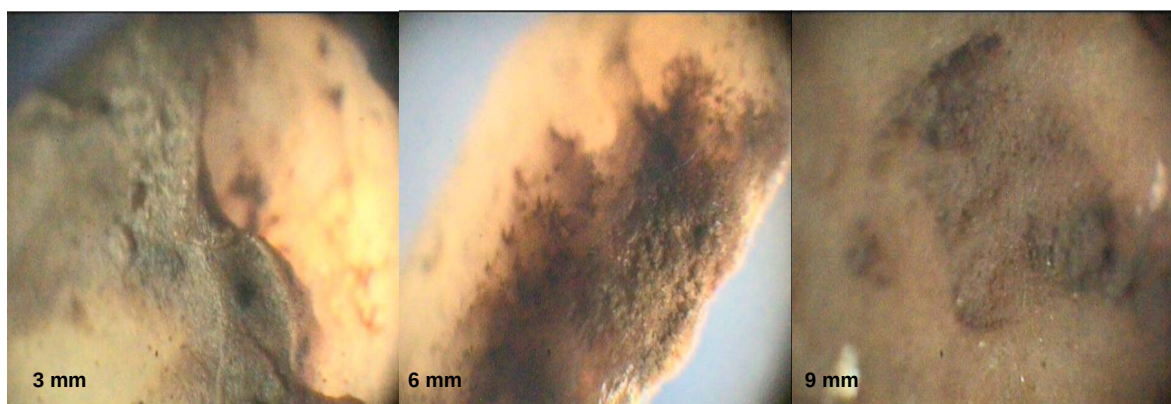


Figura 22. Abundancia de biopelícula en el medio de empaque

Por tanto, se puede inferir que el medio de tamaño más pequeño será el primero en saturarse de biomasa, luego el de tamaño mediano y finalmente el de tamaño más grande. La capacidad de saturación del medio, que se traduce a taponamiento y generación de cortocircuitos hidráulicos, estará en función de la velocidad de crecimiento de la biopelícula y la concentración de materia orgánica disuelta disponible.

Variación de la DQO

Se observó que las columnas con medio de empaque de igual granulometría, presentaron concentraciones de DQO muy semejantes. Por otro lado, al hacer una comparación entre las columnas de diferente granulometría, se obtuvieron remociones de DQO muy diferentes, las cuales se pueden observar de manera gráfica en la Figura 23.

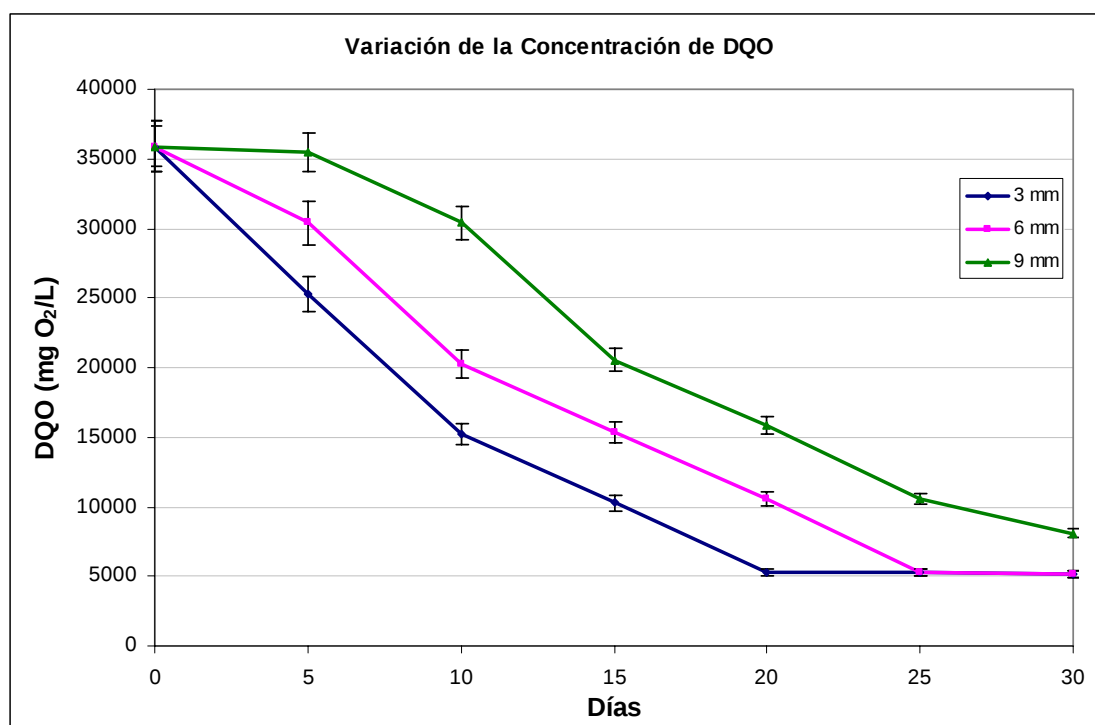


Figura 23. Comportamiento de la DQO.

Se partió de una concentración inicial de 8,000 mg de O₂/L como DQO, sin embargo, al adicionar el inóculo microbiano, este valor se incrementó hasta aproximadamente 35,000 mg O₂/L, debido a la. El porcentaje de remoción de DQO varió para cada tamaño de partícula, teniéndose un valor del 85% para las columnas de medio de empaque de 3 y 6 mm de tamaño de partícula, alcanzándose valores de 5,000 mg de O₂/L. Mientras que las columnas con medio de empaque con tamaño de partícula de 9 mm, mostraron un porcentaje de remoción del 77% con un valor final medio de 8,000 mg de O₂/L. Se observó mayor remoción de DQO en las columnas con el medio de empaque de menor tamaño de partícula, aunque se llenaron con menor volumen de agua (300 mL).

Por otro lado, se registró menor remoción de DQO en las columnas con medio de tamaño de partícula más grande (6 y 9 mm) las cuales se llenaron respectivamente con mayor volumen de agua (370 y 450 mL), lo que implicaría diferentes tiempos de retención hidráulica para tratar el mismo volumen de agua, ya que las diferentes porosidades del medio de empaque obliga a que el volumen de agua dentro de las columnas sea diferente

Variación del pH

Inicialmente se registró un pH ácido de 3.5 y al final del tiempo de experimentación, se observó una tendencia global en todas las columnas hacia un pH alcalino superior a 9.0 unidades, por lo que se asumió que el proceso de biodegradación de los compuestos disueltos en las vinazas afecta directamente este parámetro (Figura 24).

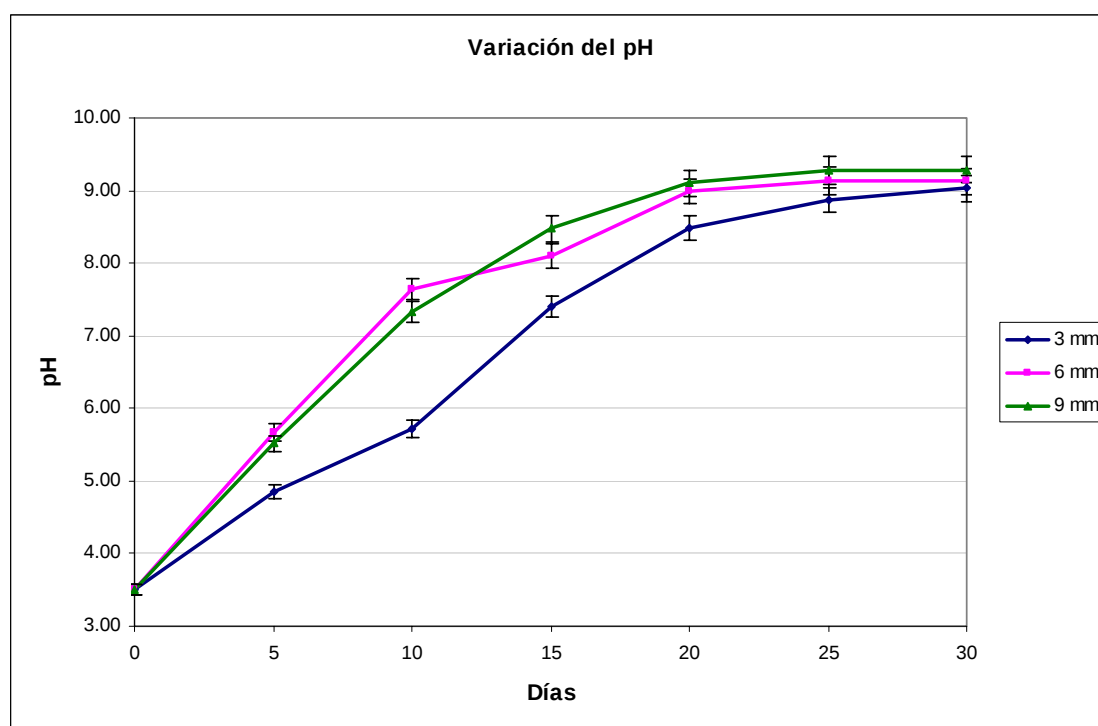


Figura 24. Comportamiento del pH.

Se observó un aumento significativo en el pH conforme el tiempo de experimentación avanzó y al mismo tiempo la concentración de DQO no varió considerablemente, se dedujo que los microorganismos fueron inhibidos por dicho parámetro, lo cual indica

que se debe tener un control del pH para poder llevar a cabo la subsiguiente degradación de las vinazas de manera más eficiente.

Por otro lado, se observó que la acidez de las vinazas disminuyó considerablemente, ya que de tener un valor de 380 mg/L de CaCO_3/L llegó a valores menores a 150 mg de CaCO_3/L , por lo que se asumió que el incremento del pH se debió a la pérdida de acidez de las vinazas.

Variación del OD

En cuanto a la concentración de oxígeno disuelto (OD), se registró inicialmente un valor superior a 2 mg O_2/L , lo cual evidenció que las columnas se mantuvieron bajo condiciones aerobias. A lo largo del tiempo de experimentación, se observó un incremento en la concentración del OD dentro de las columnas, tal como se puede observar en la Figura 25, por lo que se asumió que al disminuir la concentración de compuestos disueltos en el agua, el oxígeno pudo disolverse con mayor facilidad en el agua.

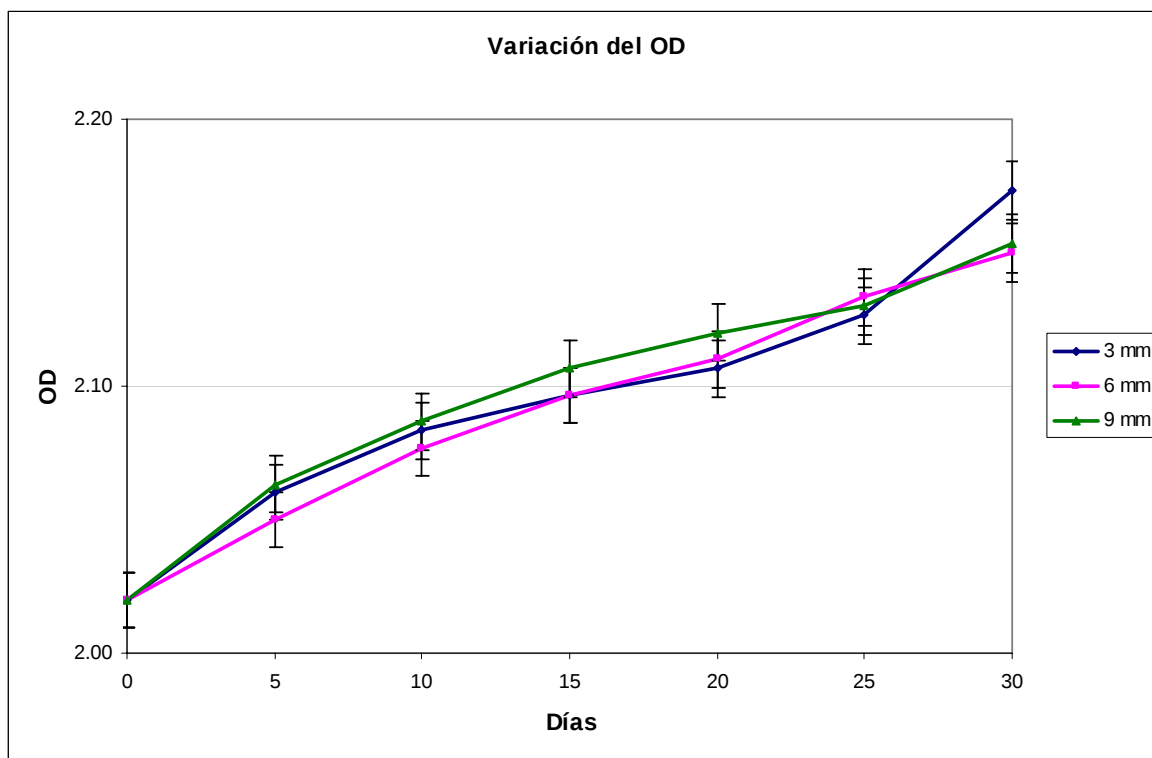


Figura 25. Comportamiento de la concentración de OD.

Sin embargo, se pudo apreciar que esta variación es solamente en el orden de 0.1 mg de OD/L, lo cual para fines prácticos es poco significativo. Bajo el supuesto que la biomasa se inhibió por el pH alcalino, se puede asumir que la concentración de OD se elevó porque el consumo de oxígeno por la misma disminuyó también.

Análisis estadístico de datos obtenidos

El diseño experimental consistió en un diseño simple con tres variables a evaluar. Se consideraron tres niveles de tratamiento: tres tamaños de partícula (3, 6 y 9 mm) con tres columnas para cada uno, teniéndose en total nueve columnas; de cada columna se tomaban tres muestras para determinar DQO, pH y concentración de OD. De estos datos, se llevó a cabo un Análisis de Varianza (ANOVA) mediante el Paquete Estadístico para Ciencias Sociales (SPSS por sus siglas en inglés) versión 12.0, empleando una comparación múltiple de Tukey para encontrar diferencias estadísticamente significativas ($\alpha = 0.05$).

Se observó que desde el inicio de la experimentación, y hasta aproximadamente 20 días, la diferencia de concentración de DQO para los tres tamaños de partícula del medio de empaque es muy notoria (Tabla 9). Llegando hasta cierto tiempo de operación en donde dichas diferencias se van reduciendo, observándose una tendencia final hacia una concentración aproximada de 5,000 mg de DQO/L, a partir de la cual no se observaron diferencias entre los tres tamaños de partícula.

Tabla 9. Diferencias estadísticamente significativas para la DQO.

DQO (mg/L)							
COLUMNAS	Día 0	Día 5	Día 10	Día 15	Día 20	Día 25	Día 30
3 mm	35897 _a	25316 _a	15189 _a	10256 _a	5263 _a	5233 _a	5112 _a
6 mm	35897 _a	30379 _b	20253 _b	15384 _b	10526 _b	5286 _a	5112 _a
9 mm	35897 _a	35443 _c	30379 _c	20512 _c	15789 _c	10572 _c	8071 _b

Nota: a, b y c representan bloques estadísticamente diferentes

De manera similar, en el pH también observaron diferencias significativas entre los 5 y los 20 días de experimentación. Después de este tiempo, el pH dejó de variar considerablemente manteniéndose casi constante en valores superiores a las 9.0 unidades. Independientemente del tamaño de partícula del medio de empaque, este comportamiento fue el mismo en todas las columnas (Tabla 10).

Tabla 10. Diferencias estadísticamente significativas para el pH.

pH							
COLUMNAS	Día 0	Día 5	Día 10	Día 15	Día 20	Día 25	Día 30
3 mm	3.50 _a	4.85 _a	5.71 _a	7.40 _a	8.49 _a	8.86 _a	9.03 _a
6 mm	3.50 _a	5.52 _b	7.33 _b	8.10 _b	8.99 _b	9.13 _b	9.12 _b
9 mm	3.50 _a	5.67 _c	7.64 _c	8.47 _c	9.10 _b	9.27 _b	9.29 _c

Nota: a, b y c representan bloques estadísticamente diferentes

En cuanto a la concentración de OD, fue posible observar que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tamaños de partícula del medio de empaque como se observa en la Tabla 11. Sin embargo, la mayor concentración de OD registrada se tuvo en las columnas con medio de empaque de mayor tamaño de partícula, asumiéndose que la disolución y difusión del oxígeno fue mayor debido a la mayor porosidad del medio de empaque.

Tabla 11. Diferencias estadísticamente significativas para el OD.

OD (mg/L)							
COLUMNAS	Día 0	Día 5	Día 10	Día 15	Día 20	Día 25	Día 30
3 mm	2.020 _a	2.050 _a	2.076 _a	2.096 _a	2.106 _a	2.126 _a	2.150 _a
6 mm	2.020 _a	2.060 _a	2.083 _a	2.096 _a	2.110 _a	2.130 _a	2.153 _a
9 mm	2.020 _a	2.063 _a	2.086 _a	2.106 _a	2.120 _a	2.133 _a	2.173 _a

Nota: a, b y c representan bloques estadísticamente diferentes

Pruebas de toxicidad aguda para las vinazas tratadas

A las nueve muestras de vinazas diluidas al 10% que fueron tratadas en las columnas empacadas, se les aplicó esta prueba para evaluar si la fitotoxicidad de las mismas había o no disminuido. Para ello, se determinó tanto la inhibición en la germinación de las semillas, como la elongación de radículas e hipocotilos de las plántulas de lechuga empleadas.



Figura 26. Vinazas tratadas en columnas empacadas con cuarcita.

Las vinazas obtenidas presentaron diferente coloración después del tratamiento en las columnas (Figura 26). El agua proveniente de las columnas con material de empaque de mayor tamaño, mostró tonalidad más oscura y opaca, mientras que el agua de las columnas empacadas con medio de empaque de menor tamaño, tuvo tonalidad más clara y transparente.

Asimismo, fue posible observar que el grado de inhibición de las vinazas tratadas sobre la germinación, como en la elongación de las radículas e hipocotilos, disminuyó considerablemente hasta valores inferiores al 50%. Las vinazas tratadas permitieron que todas las semillas germinaran, observándose una elongación, tanto de radícula como de hipocotilo, variando desde unos cuantos milímetros a varios centímetros de longitud (Figura 27).

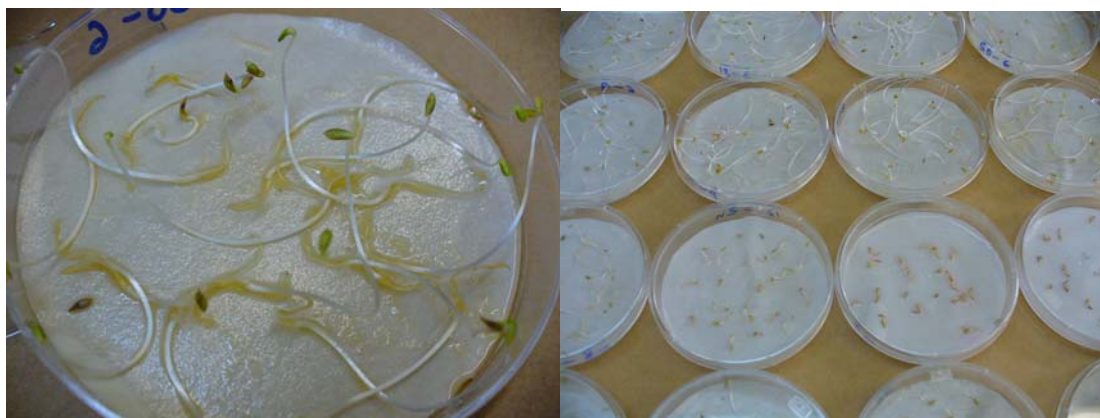


Figura 27. Pruebas de toxicidad realizadas con las vinazas tratadas.

Es importante resaltar, que todas las muestras de vinazas tratadas permitieron la germinación y la elongación de raíces e hipocotilos. De igual forma, es importante señalar que la toxicidad de las vinazas disminuyó considerablemente cuando estas fueron tratadas en las columnas y conforme la dilución de las vinazas fue mayor, tal como se puede apreciar en la Figura 28 y Figura 29.

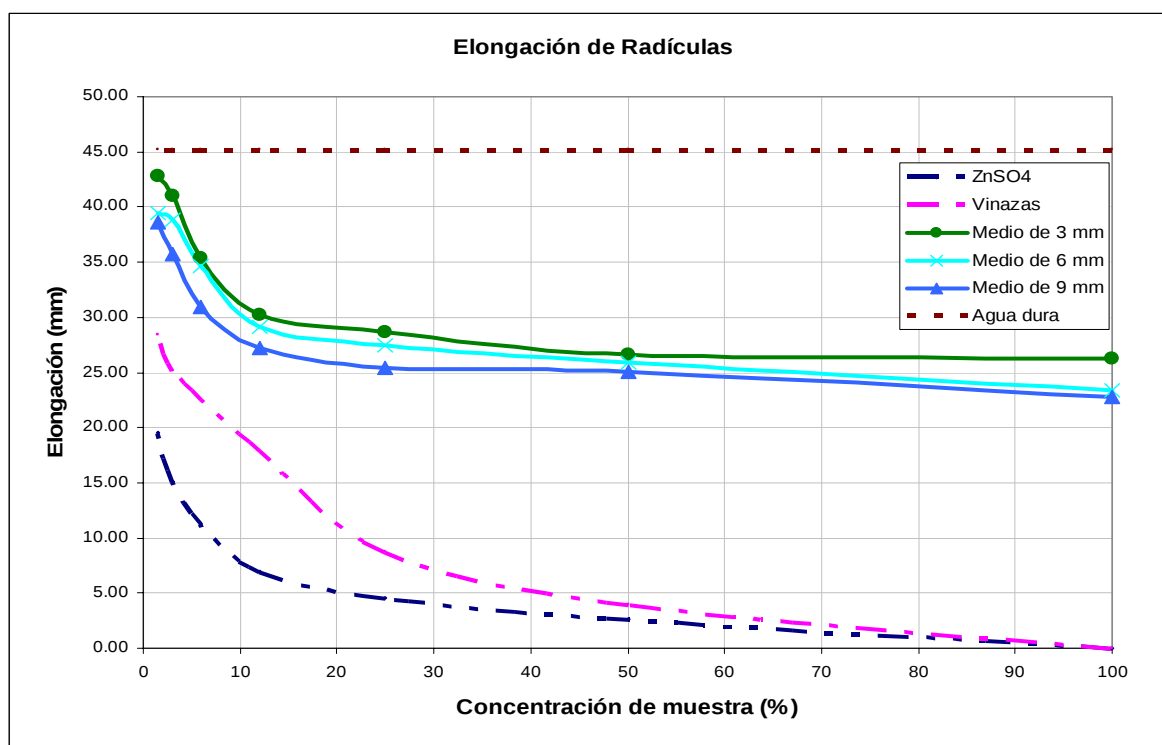


Figura 28. Dimensiones de elongación de radículas.

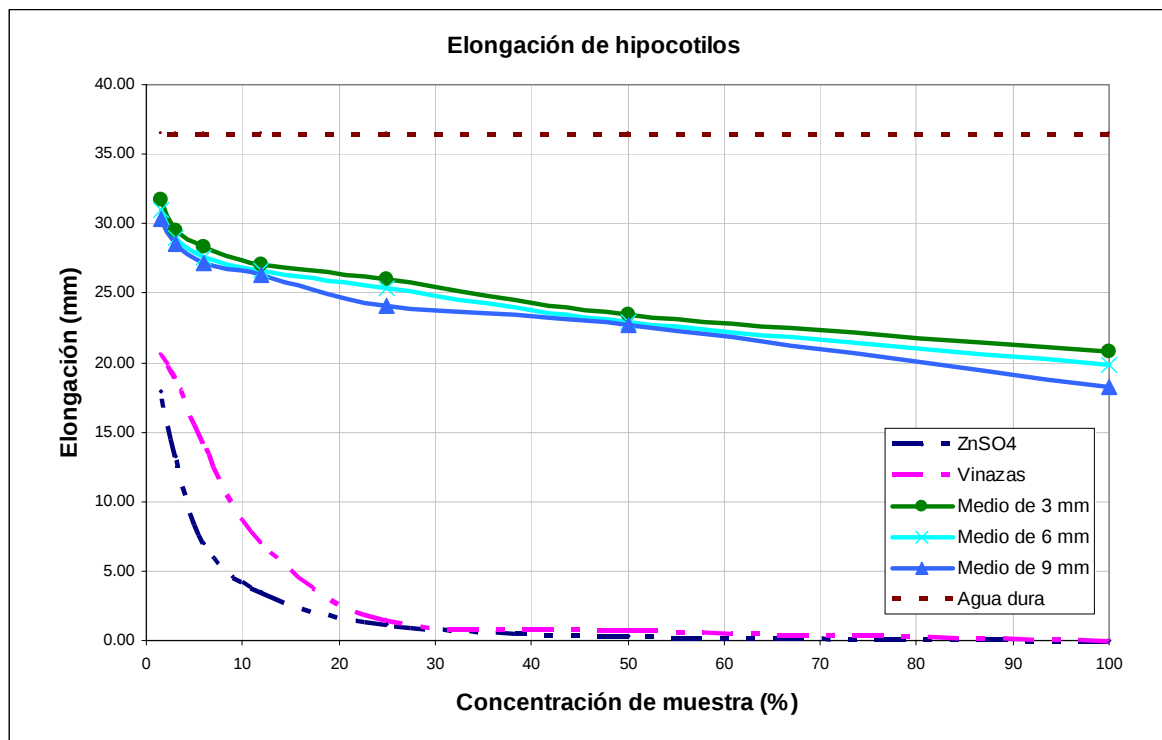


Figura 29. Dimensiones de elongación de hipocotilos.

Para evaluar la toxicidad de las vinazas tratadas, solo se consideraron los resultados de los puntos obtenidos con el 100% de concentración de las mismas, es decir, que las diluciones mayores (porcentajes de concentración menores) no se tomaron en cuenta debido a que las vinazas tratadas al ya estar diluidas al 10% podrían encubrir el efecto de toxicidad. El blanco positivo, con el tóxico de referencia, y las vinazas crudas, se consideraron con una toxicidad del 100%. De manera complementaria, para cada tamaño de partícula del medio de empaque, se observó que las vinazas tratadas tuvieron diferentes porcentajes de toxicidad sobre la elongación de radículas e hipocotilos, estos porcentajes de toxicidad se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Porcentajes de toxicidad de las vinazas tratadas

Tamaño de partícula del medio de empaque	% de Toxicidad	
	Radícula	Hipocotilo
3 mm	36.62	28.90
6 mm	41.15	35.62
9 mm	41.81	43.15

Se observó que la toxicidad disminuyó en mayor medida para las vinazas provenientes de las columnas empacadas con medio de granulometría de 3 mm, aumentando sucesivamente para las de mayor tamaño (6 y 9 mm de partícula).

Análisis estadístico de datos obtenidos

A partir de los datos obtenidos de estas pruebas y con objeto de verificar si existen diferencias estadísticamente significativas, en cuanto a la calidad de las vinazas tratadas, al emplear diferentes tamaños de partícula como medio de empaque, se realizó un ANOVA con una comparación múltiple de Tukey ($\alpha = 0.05$), utilizando el programa SPSS, versión 12.0.

Tabla 13. Diferencias significativas para las dimensiones obtenidas de radículas.

DIMENSIONES DE RADICULAS (mm)							
TRATAMIENTOS	100%	50%	25%	12%	6%	3%	1.5%
BLANCO -	0.00 _b	2.65 _b	4.60 _b	6.90 _c	11.25 _c	15.05 _c	19.55 _c
VINAZAS	0.00 _b	3.95 _b	8.70 _b	19.5 _b	22.80 _b	24.35 _b	26.85 _b
COL. 3 mm	26.30 _a	26.60 _a	28.65 _a	30.20 _a	35.35 _a	40.95 _a	42.75 _a
COL. 6 mm	23.40 _a	25.85 _a	27.50 _a	29.15 _a	34.60 _a	38.90 _a	39.45 _a
COL. 9 mm	22.75 _a	25.05 _a	25.40 _a	27.25 _a	30.95 _a	35.75 _a	38.55 _a

Nota: a, b y c representan bloques estadísticamente diferentes

Tabla 14. Diferencias significativas para las dimensiones obtenidas de hipocotilos.

DIMENSIONES DE HIPOCOTILOS (mm)							
TRATAMIENTOS	100%	50%	25%	12%	6%	3%	1.5%
BLANCO -	0.00 _b	0.35 _b	1.15 _b	3.5 _b	6.95 _c	13.30 _b	17.90 _b
VINAZAS	0.00 _b	0.75 _b	1.15 _b	6.95 _b	14.25 _b	18.90 _b	19.85 _b
COL. 3 mm	20.75 _a	23.50 _a	25.95 _a	27.05 _a	28.30 _a	29.50 _a	31.70 _a
COL. 6 mm	19.85 _a	22.90 _a	25.35 _a	26.65 _a	27.55 _a	28.95 _a	31.00 _a
COL. 9 mm	18.20 _a	22.75 _a	24.05 _a	26.35 _a	27.15 _a	28.50 _a	30.35 _a

Nota: a, b y c representan bloques estadísticamente diferentes

Los resultados obtenidos, en cuanto a la elongación tanto de radículas como de hipocotilos, indican que no existen diferencias estadísticamente significativas al emplear diferentes tamaños de partícula como medio de empaque (Tabla 13 y Tabla 14). Las mayores dimensiones de radículas e hipocotilos, se obtuvieron con las

vinazas tratadas en las columnas empacadas con el medio de empaque de 3 mm. Asimismo, se observó una mayor remoción de materia orgánica (medida como DQO) en dichas columnas. Lo anterior permite suponer que los compuestos que inhibían, tanto la germinación de semillas como la elongación de hipocotilos y radículas, fueron transformados o degradados disminuyendo así, la toxicidad aguda original de las vinazas. Se observó que el valor de toxicidad aguda presenta menor disminución, conforme el tamaño de partícula del medio de empaque de las columnas es mayor.

5.6. Conclusiones parciales

- El inóculo aclimatado llevó a cabo la degradación aerobia de las vinazas dentro de las columnas empacadas, presentándose un aumento del pH y desarrollo de biopelícula en todas las columnas empacadas.
- Independientemente del tamaño de partícula del medio de empaque, no se observó saturación del medio de empaque durante el tiempo de experimentación.
- La toxicidad aguda de las vinazas disminuyó hasta en un 50%, una vez que fueron tratadas en las columnas empacadas.
- El análisis estadístico de los datos indicó que no existen diferencias significativas entre los tres tamaños de partícula del medio de empaque en cuanto a degradación de las vinazas, variación de pH o concentración de OD alcanzado.
- Además, el análisis estadístico indicó que no existe diferencia significativa entre la toxicidad aguda de las vinazas al final del tratamiento, pero sí una diferencia muy significativa entre las vinazas crudas y las tratadas.

6. Tercera Etapa Experimental

6.1. Construcción de los arreglos de columnas empacadas en serie

Debido a que en la etapa anterior cada uno de los tamaños de partícula empleados permitió obtener una calidad de agua tratada diferente, se planteó la idea de verificar si dicha eficiencia de remoción se ve mejorada al utilizar una combinación de los mismos. Se acoplaron 6 arreglos de tres columnas empacadas en serie (Figura 30).

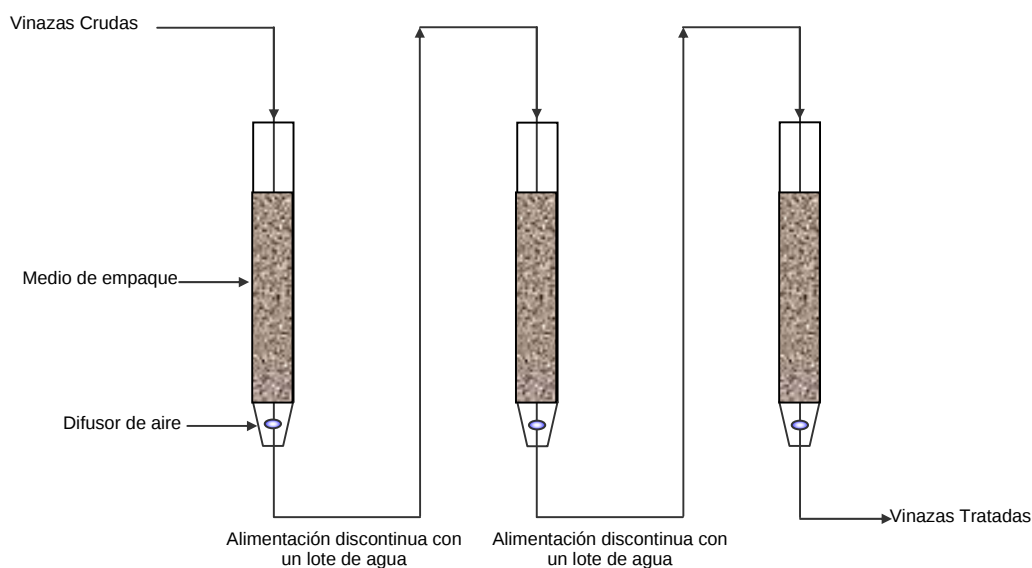


Figura 30. Diagrama de un arreglo en serie de las columnas empacadas.

Se construyeron 6 arreglos de tres columnas empacadas con las tres diferentes granulometrías, en diferentes secuencias en cuanto a tamaños de partícula del medio de empaque (Tabla 15), con el objetivo de analizar cuál es el que permite obtener la máxima remoción de DQO.

Tabla 15. Secuencias de los tamaños de medio de empaque.

ARREGLO	COLUMNA 1	COLUMNA 2	COLUMNA 3
1	3 mm	6 mm	9 mm
2	9 mm	3 mm	6 mm
3	6 mm	9 mm	3 mm
4	3 mm	9 mm	6 mm
5	6 mm	3 mm	9 mm
6	9 mm	6 mm	3 mm

6.2. Operación de los arreglos de columnas empacadas en serie

Los arreglos de columnas operaron bajo condiciones aerobias mediante un flujo constante de aire húmedo ($2,500 \text{ cm}^3$ de aire/minuto). Se les dio un tiempo de operación de 30 días. La operación de las columnas fue de manera discontinua, con una dilución de vinazas al 10% con el inóculo aclimatado como en la etapa anterior.

Se alimentaron las tres columnas de cada arreglo al mismo tiempo, a los 10 días de operación se extrajo el agua de la tercer columna, se pasó el agua de la segunda columna a la tercera y la de la primera columna a la segunda, alimentándose esta última con un nuevo lote de vinazas, igualmente diluidas al 10%, repitiéndose tres veces el cambio de agua cada 10 días.

Se evaluó la operación de los arreglos de columnas, midiendo los valores del pH y la DQO. También se evaluó la remoción de compuestos fenólicos de la tercera columna de cada arreglo con una técnica titulométrica en retroceso (Anexo III).

6.3. Pruebas de toxicidad aguda con vinazas tratadas.

Después del tiempo de experimentación, se vaciaron los arreglos de columnas empacadas y se analizaron las vinazas tratadas mediante una prueba de toxicidad aguda, siguiendo la misma metodología realizada con las vinazas crudas y las vinazas de la etapa anterior. Se manejaron muestras de vinazas tratadas, vinazas crudas como referencia, un control positivo a una concentración de 1 mg de ZnSO_4/mL y un control negativo que consistió en agua dura reconstituida (APHA, 1998).

6.4. Resultados de esta etapa y discusión

Construcción de arreglos de columnas empacadas

Se construyeron seis arreglos de tres columnas empacadas cada uno, siendo en total dieciocho columnas (Figura 31). Tal como se diseñó en la Tabla 15, se manejaron diferentes secuencias del tamaño de partícula del medio de empaque en cada una de las columnas.



Figura 31. Arreglos de columnas empacadas utilizados.

Variación de la DQO en los arreglos de columnas empacadas

Se midió nuevamente el parámetro de DQO para todos los arreglos de columnas y de manera individual cada cinco días y cada diez días se realizó el cambio de lote de vinazas en las columnas. Durante el tiempo de operación de los arreglos de columnas empacadas, se conservaron condiciones aerobias mediante el flujo constante de aire húmedo ($2,500 \text{ cm}^3$ de aire/minuto). Aunque la alimentación de las columnas fue de manera discontinua y cada 10 días se presentaron fluctuaciones considerables en la concentración de DQO, se observó de después del tiempo de operación de 30 días, las vinazas presentaron una gran disminución en la concentración de DQO debido a la biodegradación llevada a cabo por la biomasa. Todos los arreglos de columnas tuvieron comportamiento semejante. En las figuras 32 a la 37, se muestran las gráficas de las fluctuaciones en la concentración de DQO ocasionadas por el cambio de lote de vinazas en los días 10 y 20, donde la concentración de DQO correspondió al valor inicial ($>30,000 \text{ mg de O}_2/\text{L}$).

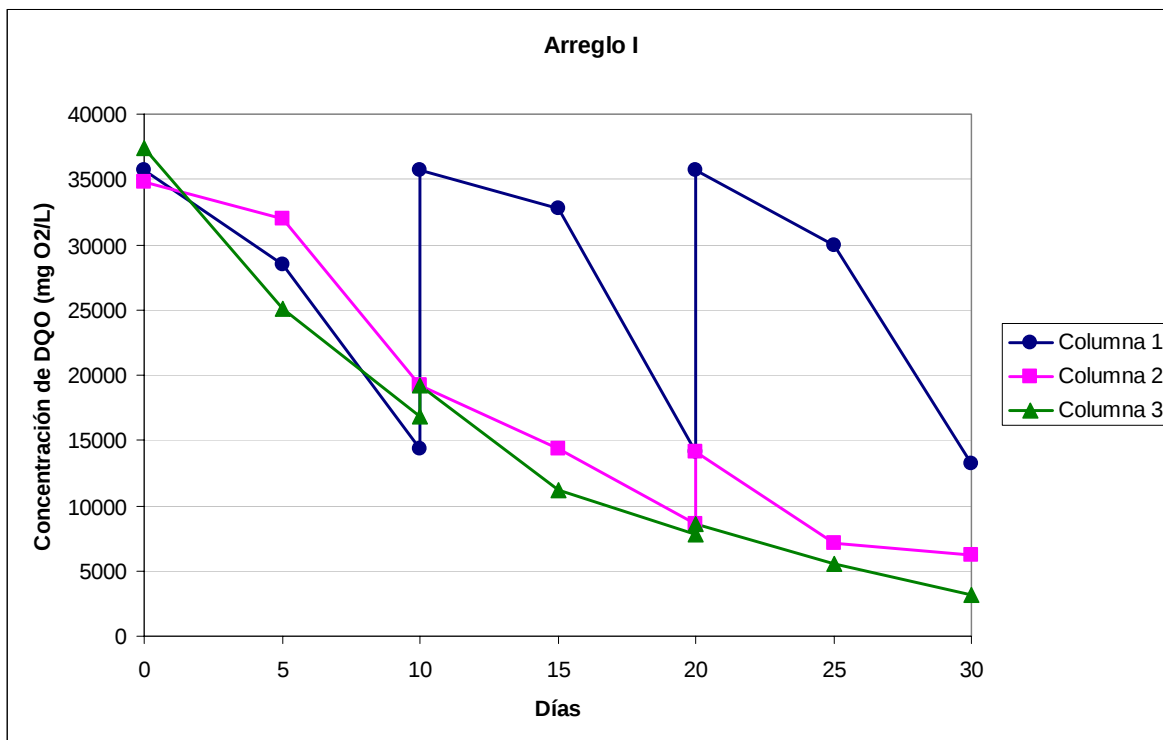


Figura 32. Variación en la concentración de DQO para el Arreglo I.

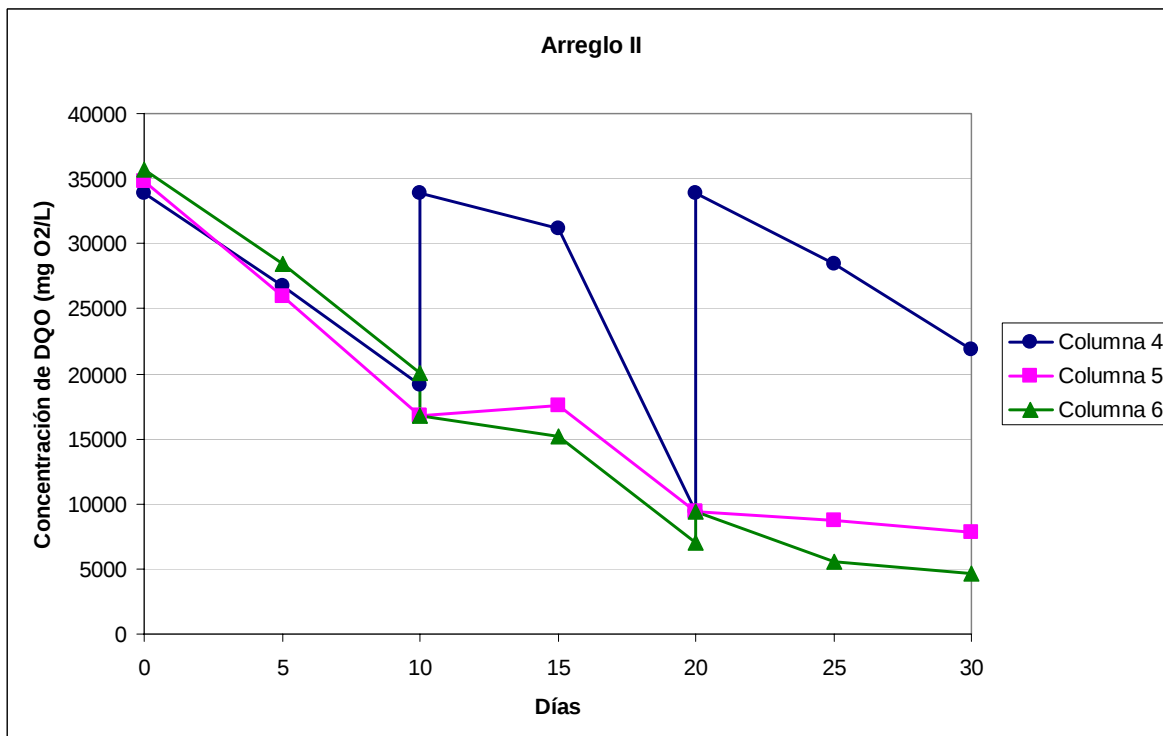


Figura 33. Variación en la concentración de DQO para el Arreglo II.

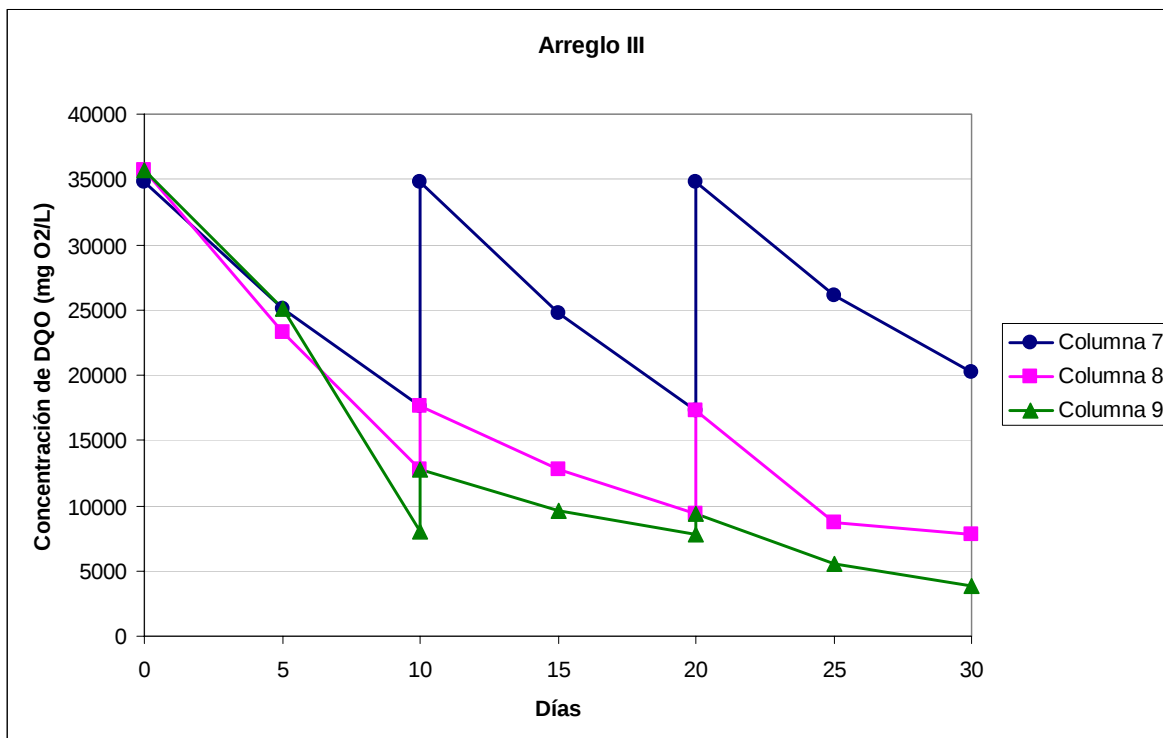


Figura 34. Variación en la concentración de DQO para el Arreglo III.

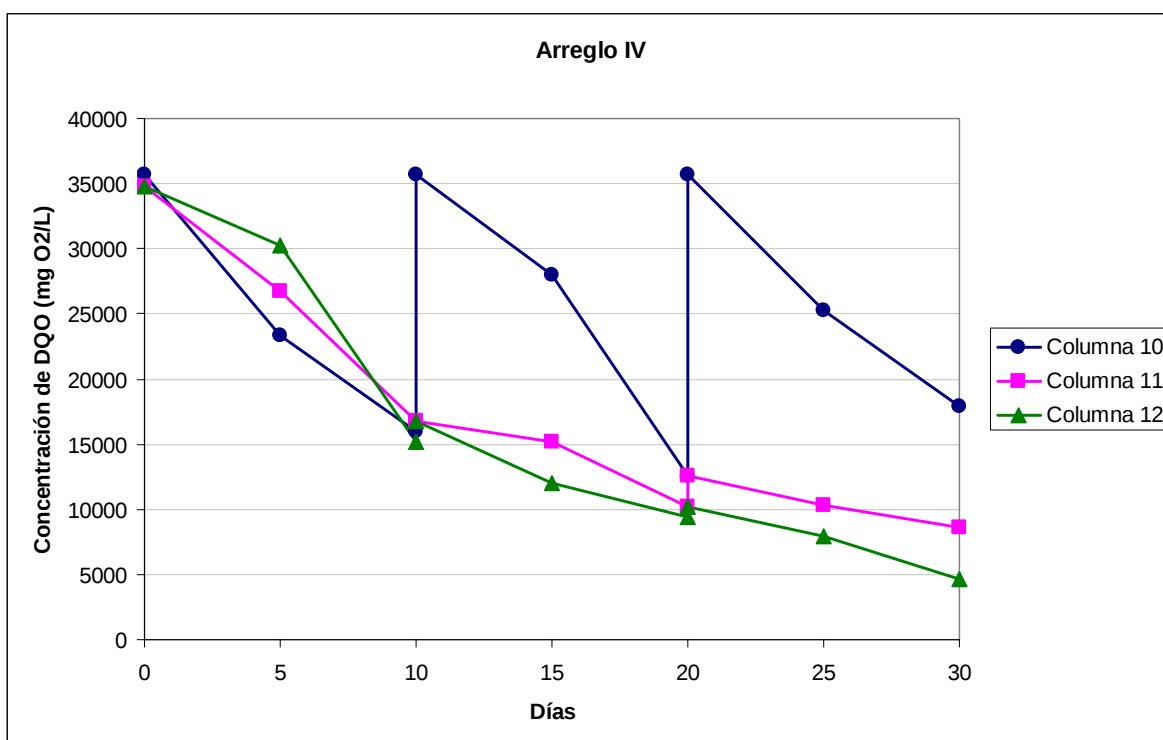


Figura 35. Variación en la concentración de DQO para el Arreglo IV.

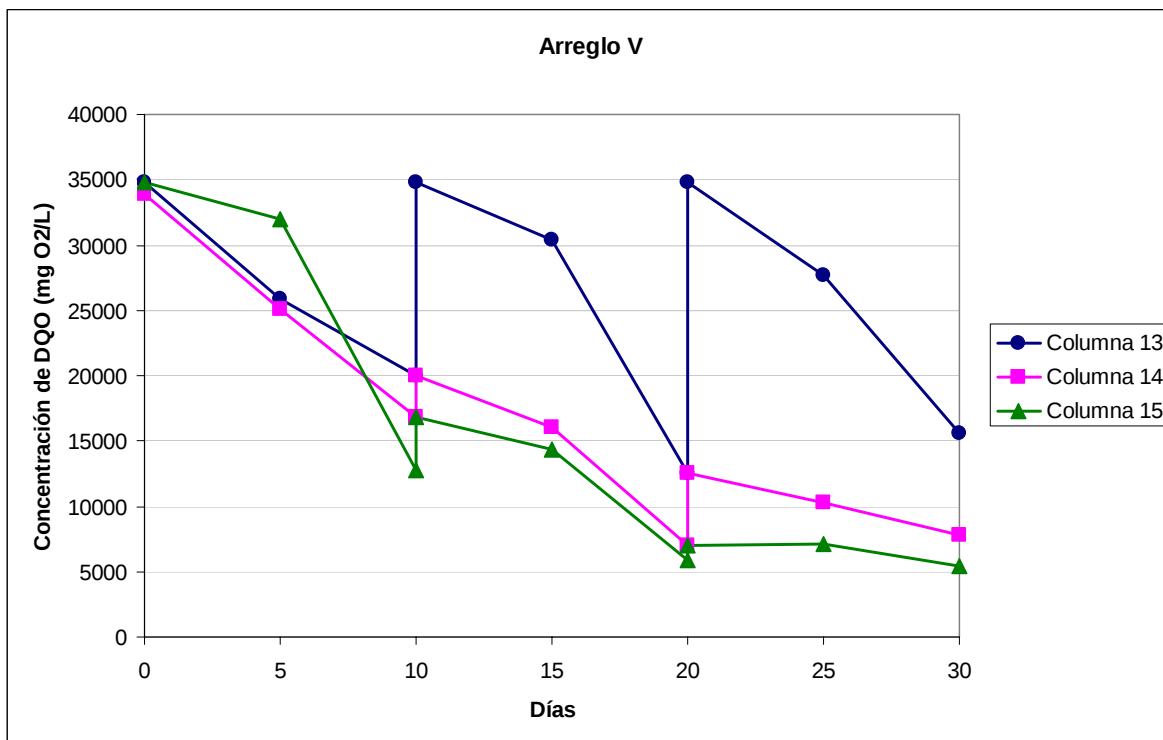


Figura 36. Variación en la concentración de DQO para el Arreglo V.

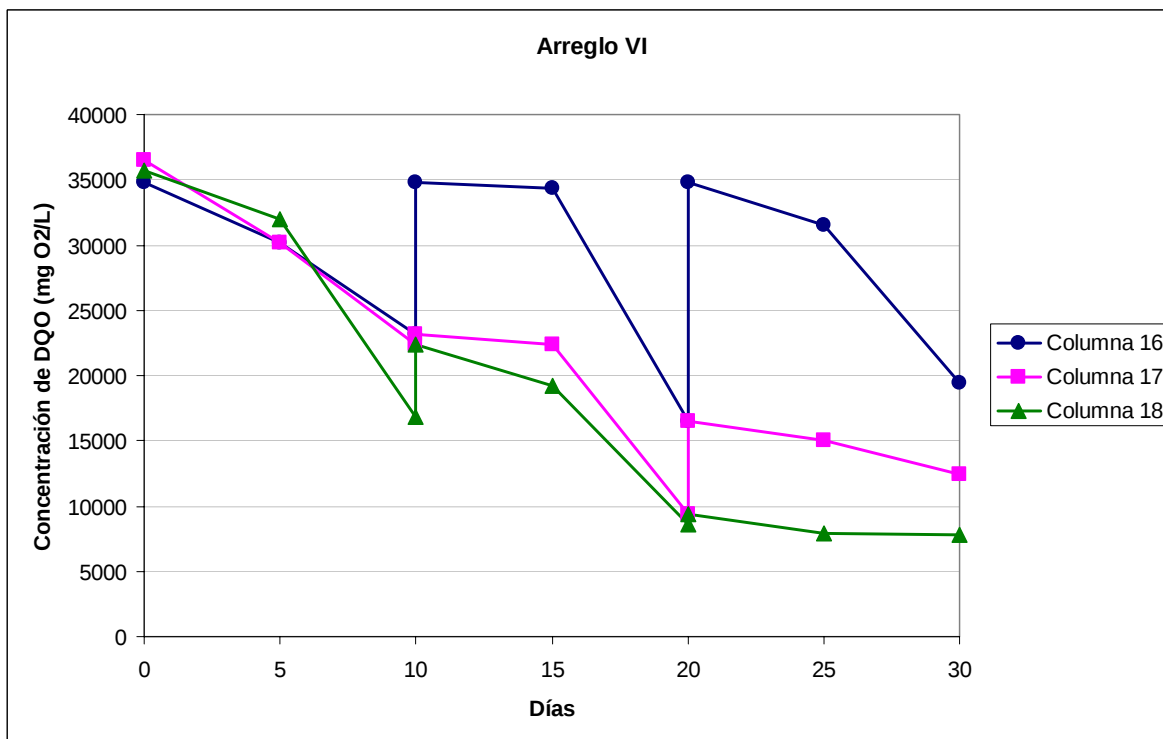


Figura 37. Variación en la concentración de DQO para el Arreglo VI.

Se realizó la comparación de las concentraciones finales de DQO para todas las columnas y todos los arreglos, los cuales se muestran en la Tabla 16. Se obtuvieron las menores concentraciones de DQO en las columnas del Arreglo 1, ante lo cual se concluyó que la secuencia de medios de empaque empleada en dicho arreglo permite obtener la máxima remoción de materia orgánica medida como DQO.

Tabla 16. Valores finales de DQO para las columnas empacadas.

Arreglo	Columna	DQO final	Arreglo	Columna	DQO final
1	1	13,200	4	10	18,000
	2	6,200		11	8,600
	3	3,100		12	4,700
	4	21,800		13	15,600
2	5	7,800	5	14	7,800
	6	4,600		15	5,400
	7	20,200		16	19,500
3	8	7,800	6	17	12,500
	9	3,900		18	7,800

Degradación de compuestos fenólicos totales

Los compuestos fenólicos son contaminantes altamente tóxicos contenidos en las vinazas. Con objetivo de verificar la remoción de dichos compuestos, se midió su concentración cada cinco días de las terceras columnas de cada arreglo (Figura 38).

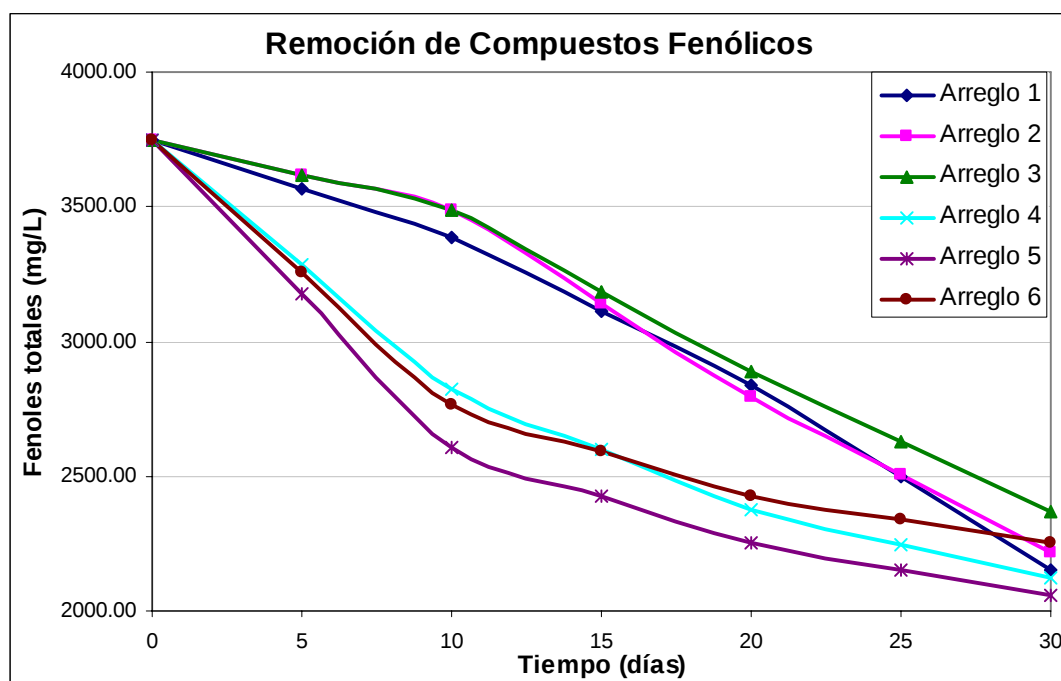


Figura 38. Variación en la concentración de compuestos fenólicos

Iniciando con un valor medio de 3,700 mg/L de compuestos fenólicos. Se obtuvieron diferentes eficiencias de remoción de dichos compuestos en cada uno de los arreglos de columnas, donde la máxima remoción se llevó a cabo en el Arreglo 5, ocupando el quinto lugar en cuanto a remoción de DQO; mientras que el Arreglo 1, que mostró la máxima remoción de DQO se ubicó en el tercer lugar de remoción de compuestos fenólicos (Tabla 17).

Tabla 17. Concentración final de compuestos fenólicos en vinazas

Arreglo	Compuestos fenólicos (mg/L)	Eficiencia de remoción (%)	Arreglo	Compuestos fenólicos (mg/L)	Eficiencia de remoción (%)
1	2,150	42.53	4	2,120	43.47
2	2,210	40.96	5	2,060	45.14
3	2,370	36.78	6	2,250	39.92

Concentración inicial de compuestos fenólicos = 3,700 mg/L

Variación del pH

Este parámetro se midió solamente en las terceras columnas de cada arreglo, y tal como se observó en la etapa anterior, el pH de las vinazas mostró un aumento muy significativo, ya que se partió de un valor inicial de 3.5 unidades y alcanzándose valores superiores a las 9.0 unidades (Figura 39).

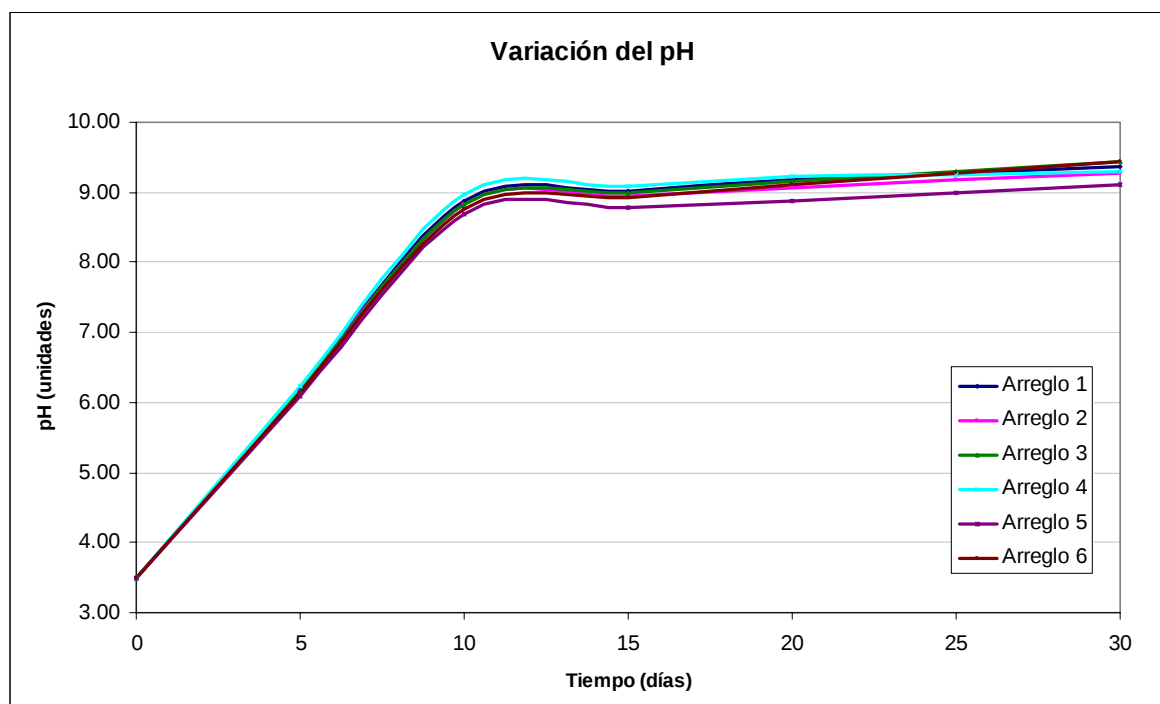


Figura 39. Variación del pH para los arreglos de columnas empacadas

El pH mostró el mismo comportamiento que en la etapa anterior, de un valor de 3.5 unidades subió hasta valores superiores a las 9.0 unidades. Esta variación ocurrió durante los primeros diez días de operación y de manera independiente al arreglo del que se tratase, el pH llegó a valores muy similares, siendo el Arreglo 5 el que mostró el menor pH y los Arreglos 3 y 6 el máximo valor de pH (Tabla 18). Se asumió que el aumento del pH, se debió principalmente a la degradación de compuesto fenólicos, más que a la disminución de la acidez, ya que al sufrir degradación dichos compuestos, se forman intermediarios de carácter alcalino.

Tabla 18. Valores de pH de los arreglos de columnas.

Arreglo	pH	Arreglo	pH
1	9.36	4	9.29
2	9.28	5	9.10
3	9.43	6	9.43

Valor inicial de pH = 3.5 unidades

Prueba de toxicidad aguda de vinazas tratadas

Tal como se hizo en la etapa anterior, se realizaron pruebas de toxicidad aguda a las vinazas tratadas. Con el objetivo de evaluar la variación de la toxicidad aguda de las vinazas, sobre la elongación tanto de radículas como de hipocotilos conforme el tiempo de operación transcurrió, se realizaron estas pruebas cada 10 días tomando muestras de la tercera columna de cada arreglo. En la Tabla 19, se muestran los valores del porcentaje de toxicidad aguda obtenidos en cada uno de los arreglos de columnas, observándose la variación de la misma según el tiempo de operación transcurrido.

Tabla 19. Variación del porcentaje de toxicidad de vinazas tratadas

Arreglo	% de Toxicidad					
	Radículas			Hipocotilos		
	10 días	20 días	30 días	10 días	20 días	30 días
1	48.76	46.97	36.46	50.47	44.12	27.98
2	50.18	39.68	33.35	47.66	40.49	30.22
3	51.67	39.66	39.59	52.29	36.23	32.87
4	43.99	39.07	36.50	51.38	31.69	26.80
5	44.59	41.17	34.05	48.48	35.05	20.72
6	47.39	37.80	37.41	49.38	34.96	24.89

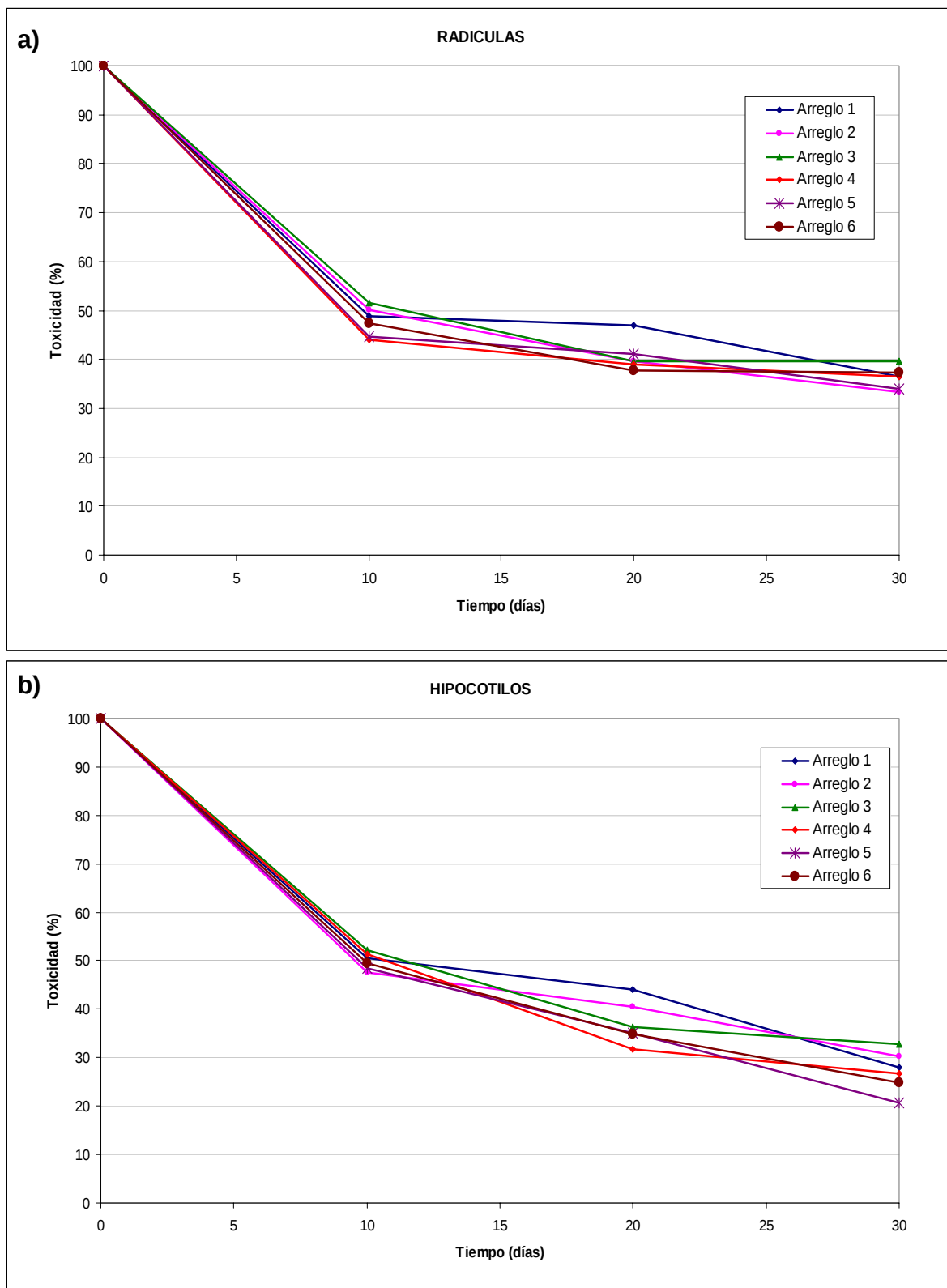


Figura 40. Toxicidad aguda de vinazas tratadas sobre a) radículas y b) hipocotilos.

La Figura 40, muestra las gráficas de la variación del porcentaje de toxicidad aguda conforme el tiempo de operación fue transcurriendo. Se puede observar que independientemente del arreglo de columnas del que se tratase, la toxicidad aguda disminuyó conforme el tiempo de experimentación pasaba, permitiendo así que las radículas e hipocótilos alcanzaran mayores dimensiones. El porcentaje de toxicidad se consideró en comparación con el valor máximo obtenido con el blanco negativo, el cual representó un 0% de toxicidad y con el valor mínimo obtenido correspondiente al blanco positivo con un 100% de toxicidad.

6.5. Conclusiones parciales

- Se observaron remociones de materia orgánica superiores al 80% del valor inicial de DQO presente en las vinazas, por lo que se concluye que el consorcio bacteriano obtenido en el inóculo microbiológico puede llevar a cabo un tratamiento adecuado de las mismas.
- La concentración de compuestos fenólicos disminuyó conforme el tiempo de operación transcurrió, hasta alcanzar valores muy por debajo del inicial (3,700 mg/L) con eficiencias de remoción superiores al 35%. Sin embargo, también se observó que esta biodegradación de compuestos fenólicos provocó el aumento del pH en todas las columnas de todos los arreglos, independientemente del tamaño del medio de empaque empleado, debido a la formación de intermediarios de carácter alcalino.
- Con base en el comportamiento observado en la remoción de compuestos fenólicos, se concluyó que estos últimos, confieren la toxicidad aguda a las vinazas y que después de ser transformados o degradados, la misma disminuye considerablemente hasta valores cercanos al 20% de toxicidad del valor inicial del 100%.

7. CONCLUSIONES GENERALES

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, se concluye lo siguiente:

- Durante el tiempo de operación tanto de columnas como de arreglos, no se presentó taponamiento del medio de empaque, a pesar de haber tenido un abundante crecimiento de biopelícula en todas las columnas empacadas.
- Las condiciones mantenidas dentro de las columnas empacadas fueron aerobias, ya que se registraron concentraciones de OD superiores a 2 mg O₂/L. El pH se ve afectado de manera directa conforme se lleva a cabo la degradación de las vinazas ya que varía de un valor de 3.5 a valores superiores 9.0 unidades.
- El tratamiento biológico de las vinazas, llevado a cabo tanto en columnas empacadas con cuarcita como en arreglos de las mismas, alimentadas por lotes y bajo condiciones aerobias, permitió obtener remociones del 77 al 85% de la DQO inicial, con lo cual se comprobó que ésta puede ser una alternativa adecuada para llevar a cabo el tratamiento de las vinazas diluidas.
- Se observó una remoción de compuestos fenólicos, ya que la concentración de los mismos varió desde una concentración inicial superior a los 3,700 mg/L hasta concentraciones finales cercanas a los 2,000 mg/L, con eficiencias de remoción del 36 al 45%.
- La toxicidad aguda de las vinazas disminuyó considerablemente hasta valores menores al 45% de su toxicidad aguda inicial para todos los casos. Esta toxicidad se interpretó como la inhibición de la germinación de semillas y la elongación de radícula e hipocotilo de las plántulas de lechuga (*Lactuca sativa L.*).

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- American Public Health (APHA) (1998). Standard Methods for Examination of Water and Wastewater. Water Pollution Control Federation (WPCF), American Water Works Association (AWWA)
- Ahn Y. T., Kang S. T., Chae S. R., Lee C. Y. y Shin H. S. (2005). Simultaneous high-strength organic and nitrogen removal with combined anaerobic upflow bed filter and aerobic membrane bioreactor (UBF-MBR). Advanced Institute of Science and Technology, Departament of Civil and Environmental Engineering, Korea.
- Bautista F. (1998). Análisis del beneficio y riesgo potenciales de la aplicación al suelo de vinazas crudas y tratadas biológicamente. Revista Internacional de Contaminación Ambiental.
- Bautista F. (2000). Cambios químicos en el suelo por aplicación de materia orgánica soluble tipo vinaza. Facultad de Química, UNAM.
- Bermúdez R. C. (1994). Una variante alternativa para la alimentación animal: vinaza de destilería. Revista Cubana de Veterinaria 4.
- Bermúdez R. C. (2000). Evaluación de la disminución de la carga contaminante de la vinaza de destilería por tratamiento anaerobio. Centro de Estudios de Biotecnología Industrial, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba.
- Bishop P. L. (2005). The role of biofilms in water reclamation and reuse. Departament of Civil and Environmental Engineering, University of Cincinnati, USA.
- Bramucci M. G. y Nagarajan V. (2003). Industrial wastewater bioreactors: sources of novel microorganisms for biotechnology. DuPont Central Research and Development, Wilmington, DE. USA.
- Brix H., Shierup H. H. (1985). Wastewater treatment on constructed reed beds in Denmark –State of the art in Constructed Wetlands in Water Pollution Control. Pergamon Press, Oxford. 495
- Cámara Nacional de las Industrias Azucarera y Alcoholera, CNIAA (2005) <http://www.camaraazucarera.org.mx>
- Cedeño C. M. (1995). Tequila production. Revista de Biotecnología, México.
- Cereceda M., Serrano S. y Guinea L. E. (2000). Biofilm communities and operational monitoring of a rotating biological contactor system. Departamento de

-
- Microbiología III, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.
- Chavarría J. C. (2001). Humedales artificiales de flujo vertical. Estado del arte y propuestas experimentales para la obtención de parámetros de diseño. Tesis profesional. UNAM, México.
- Comisión Nacional del Agua, CNA (2005). Estadísticas del Agua. <http://www.cna.gob.mx>
- Cooper P. F. y Wheeldon H. V. (1980). Fluidized and expanded bed reactors for wastewater treatment, *Journal of Water Pollution Control*, 79, 286-306.
- Cortés A. B. y Pérez E. B. (1997). Experiences on Vinasse Disposal. Part III: Combustion of Vinasses #6 Fuel Oil Emulsions. Brazil, *Journal of Chemical Engineering* 14(1).
- Da Cámara L., Hernández M. y Paz L. (2002). Manual de diseño para plantas de tratamiento de aguas residuales alimenticias. Proyecto de Ingeniería Química Departamento de Fenómenos de Transporte.
- De la Cruz S. R. (2002). Aplicaciones del Análisis Complejo de procesos en el estudio de alternativas de integración de un Complejo Agroindustrial Azucarero con una planta de alcohol. Tesis presentada para la opción del Grado Científico de Doctor en Ciencias Técnicas. UCLV.
- Dafonte D. J., Valcárcel A. M., Seijo A. N. y Paz, G. A. (1999). Análisis de los métodos de cálculo de la conductividad hidráulica saturada de campo medida con permeámetro Guelph. Escola Politécnica Superior, Universidad de Santiago de Compostela.
- Decloux M., Bories A., Lewandowski R., Fargues C., Mersad A., Lameloise M. L., Bonnet F., Dherbecourt B. y Osuna L. N. (2002). Interest of Electrodialysis to Reduce Potassium Level in Vinasses. Preliminary Experiments. *Desalination*, 146, 393-398.
- Delgenes J. P., Rustrian E., Bernet N., Moletta R. (1997). Combined biodegradation of carbon, nitrogen and phosphorus from wastewaters. Institut National de la Recherche Agronomique. Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, Aénue des Etangs. 11100 Narbonne, France.

-
- Durán C., Zámano A. y Zedillo L. (1991a). Tratamiento biológico de aguas residuales de la industria alcohólica. Informe técnico, Facultad de Química, UNAM, D. F., México.
- Durán C., Noyola A., Poggi H. y Zedillo L. (1991b). Biodegradation of process industry wastewater. Case problem: sugarcane industry. *Journal of Biological Process of Wastes*, Elsevier, Londres.
- Emanuelsson E. A. C. y Livingston A. G. (2003). Overcoming oxygen limitations in membrane-attached biofilms investigation of flux and diffusivity in an anoxic biofilm. Department of Chemical Engineering, Imperial College of Science Technology and Medicine, Prince Consort Road, London SW7 2BY, UK.
- Enríquez M. (2005). Producción de etanol anhidro en ingenios azucareros. *Revista Mexicana de Biotecnología*, D. F. México,
- Fenoglio F. E. (2001). Bases de diseño para la construcción de un reactor biológico experimental basado en los sistemas de humedales artificiales de flujo vertical. Tesis profesional. Facultad de Química, UNAM. México. D. F.
- Ferreira S. E. y Montenegro O. A. (1987). Efeitos da aplicação da vinhaça nas propriedades químicas, físicas e biológicas do solo". *Boletín técnico COPERSUCAR*, Brasil.
- Garc J., Vivar J., Aromir M. y Mujeriego R. (2003). Role of hydraulic retention time and granular medium in microbial removal in tertiary treatment reed beds. Environmental Engineering Division, Hydraulics, Coastal and Environmental Engineering Department, Technical University of Catalonia, Barcelona, España.
- Gloria N. A. y Orlando F. (1983). Aplicação da vinhaça como fertilizante. *Boletín técnico PLANALSUCAR*, Brasil.
- Gómez R. y Santiesteban C. M. (2000). Vinaza. Manual de los derivados de la caña de azúcar. L. Gálvez, Editor general. ICIDCA, Ciudad de la Habana, Cuba.
- Ha J. H.; Ong S. K. (2005). Nitrification and denitrification in partially aerated biological aerated filter (BAF) with dual size sand media. Department of Civil, Construction and Environmental Engineering, Iowa State University, USA.
- Hakuv O.A. (1990). Conservação de Energia na indústria do Açúcar e do álcool. *Manual de Recomendaciones (IPT) Apêndice G*. pp. 471-487.

-
- Hibiya K., Nagai, J., Tsuneda S. e Hirata A. (2003). Simple prediction of oxygen penetration depth in biofilms for wastewater treatment. Departament of Chemical Engineering, Waseda University, Japan.
- Hong S. K., In, S. S., Youn, K. K., Ji, Y. K., Hyo, W. A. e In, S. K. (2005). Full scale study on dynamic state membrane bioreactor (MBR) with modified intermittent aeration (MIA). International Water and Wastewater Research Center, Korea.
- Huang W. (1993). Impact of interactions among soil minerals, organics and microbes on agroecosystems. International Water and Wastewater Research Center, Korea.
- Huang W. (1994). Role of organics and microbes in mineral transformations. Symposium VII. Weathering and the formation of soils minerals. D. F., México.
- Instituto Nacional de Estadísticas, Geografía e Información, INEGI (2005).
- Jiménez A. M., Borja R. y Martín A. (2003). Aerobic-Anaerobic Biodegradation of Beet Molasses Alcoholic Fermentation Wastewater. Biochemistry of Industrial Process, 38, 1275- 1284.
- Jiménez R. M. y Martínez M. A. (1995). Instalación y Arranque de un Reactor Anaerobio en un Tren Anaerobio-Aerobio de una Planta Piloto de Tratamiento de Vinazas. Tesis profesional, Facultad de Química, UNAM, México, D. F.
- Kyung J. M., Young, S. L. y Gee-Bong, H. (2005). Biofilm process to remove nitrogen in the advanced wastewater treatment system at different metabolic regimes. Departament of Environmental Engineering, Hanseo University.
- Lara B. J. A. (1999). Depuración de aguas residuales municipales con humedales artificiales. Universidad Politécnica de Cataluña.
- Mahimairaja S. y Bolan S. (2004). Problems and Prospects of Agricultural Use of Distillery Spentwash in India. Super Soil. 3rd Australian New Zealand Soils Conference, University of Sydney, Australia, 1-6.
- Martínez A. (2002). Sistema integrado de degradación alternativa. Universidad Internacional de Barcelona, Departamento de biología.
- MAPAS (2001). Manual de Agua Potable, Alcantarillado y Saneamiento, versión 3.0. Comisión Nacional del Agua, CNA

-
- Metcalf y Eddy, Inc. (2003). Wastewater Engineering: Treatment and Reuse. 4th edition. McGraw Hill Companies. New York.
- Mijaylova N. P., Medina C., Tomasini C., Hornelas Y. (2005). Treatment of distillery vinasse using anaerobic expanded bed GAC reactor. VIII Latin American Workshop and Symposium on Anaerobic Digestion, 25 October 2005, Punta del Este, Uruguay, p. 280 - 285.
- Miranda Ríos M. y Luna Pabello V. M. (2001). Estado del arte y perspectivas de aplicación de los humedales artificiales de flujo horizontal en México. Serie: Tratamiento Biológico de Aguas Residuales Departamento de Ingeniería Química, UNAM.
- Montalvo S. (1983). Utilización de los residuales líquidos como biofertilizantes. Conferencias impartidas en el CNIC, Ciudad Habana, Cuba.
- Montgomery D. C. (1991). Diseño y análisis de experimentos. Grupo Editorial Iberoamérica.
- Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996. Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. Diario Oficial de la Federación, México.
- Norma Oficial Mexicana NOM-002-SEMARNAT-1996. Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a los sistemas de alcantarillado urbano o municipal. Diario Oficial de la Federación, México.
- Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000. Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis. Diario Oficial de la Federación, México.
- Nuissier G., Bourgeois P., Grignon-Dobois M. G., Pardon P. y Lescure M. H. (2002). Composition of Sugarcane Waxes in Rum Factory Wastes. Journal of Phytochemistry, 61: 721-726.
- Organisation for Economic Cooperation and Development, OECD (1993). Guidelines for the testing of chemicals. Vol. I. Physical-Chemical Properties.
- Orlando F. (1991). Manejo de suelos y uso de fertilizantes para la caña de azúcar en Brasil. Boletín GEPLACEA, Brasil.

-
- Perdigón S. M. (2005). Impacto sobre el medio ambiente de las vinazas de jugos de caña energética más miel final en la destilería Paraíso. Tesis presentada en opción del grado de Master en Gestión Ambiental y Protección de los Recursos Naturales, Universidad de Matanzas.
- Ramírez C. H. F. (1997). Desarrollo de la ingeniería básica para el diseño de una planta de tratamiento de aguas residuales a base de un humedal artificial de flujo horizontal. Tesis profesional. UNAM. México.
- Ramírez C. H. F. (2003). Evaluación de la remoción biótica y abiótica de fosfatos en reactores empacados con diferentes materiales de uso potencial en humedales artificiales. Tesis de Maestría en Ingeniería Ambiental. UNAM, México, D. F.
- Ramos C. (1999). El uso de aguas residuales en riegos localizados y en cultivos hidropónicos. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Moncada.
- Reyes A. E. C. (2006). Estudio de la actividad enzimática del proceso de biodegradación aerobia de vinazas. Tesis profesional, UNAM.
- Rivas L. A. B., Nevárez M.G.V., Bautista M.R.G., Pérez H. A. y Saucedo T.R. (2003). Tratamiento de aguas residuales de uso agrícola en un biorreactor de lecho fijo. Publicado como artículo en *Agrociencia* 37:157-166. 2003.
- Rivera A., González J., Castro R., Guerrero B. y Nieves G. (2002). Tratamiento de efluentes de destilería en un filtro anaerobio de flujo ascendente. Instituto de Investigaciones para la Industria Alimentaria, La Habana, Cuba.
- Rivera F., Warren A., Curds C., Robles E., Gallegos E. y Calderon A. (1996). The application of the root zone method for the treatment and reuse of high-strength abattoir waste in Mexico. En 5th International Conference on Wetland Systems for Water Pollution Control. Viena, Austria.
- Romero J. A. (1999). Potabilización del Agua. Ed. Alfaomega. 3^a. Edición.
- Rousseau P. L., Vanrolleghem P. A. y De Pauw N. (2003). Model-based design of horizontal subsurface flow constructed treatment wetlands: a review. Department of Applied Ecology and Environmental Biology, Ghent University, J. Plateaustaat 22, 9000 Gent, Belgium.

-
- Sangave P.C. y Pandit A. B. (2005). Enhancement in biodegradability of Distillery Wastewater Using Enzymatic Pretreatment. Journal of Environmental Management, XX, 1-9.
- Sheehan G. y Greenfield P. (1980). Utilization, treatment and disposal of distillery wastewater. Journal of Water Research 14: 257-277.
- Tchobanoglous G. y Crites R. (2000). Tratamiento de aguas residuales en pequeñas poblaciones. Ed. McGraw Hill.
- TorOve L. y Hallvard, O. (2005). The development of biofilm membrane bioreactor. Norwegian University of Science and Technology, Department of Hydraulic and Environmental Engineering, Norway.
- Unión Nacional de Cañeros, A. C.-CNPR (2007). Estadísticas de la producción de caña de azúcar en la zafra 2004/2005. México.
- Wastewater Technology Fact Sheet, US-EPA (1988). Design Manual: Constructed Wetlands and Aquatic Plant Systems for Municipal Wastewater Treatment. 625-1-88-022
- Wastewater Technology Fact Sheet, US-EPA (1999). Fine Bubble Aeration. 832-F-99-065.
- Wastewater Technology Fact Sheet, US-EPA (2000). Trickling Filters. 832-F-00-014.
- Wastewater Technology Fact Sheet, US-EPA (2000). Trickling Filters Nitrification. 832-F-00-015.
- Wastewater Technology Fact Sheet, US-EPA (2000). Subsurface Flow Wetland. 832-F-00-023
- Wastewater Technology Fact Sheet, US-EPA (2000). Free Water Surface Wetland. 832-F-00-024
- Zamudio A. C. (1993). Evaluación de una planta prototipo para tratamiento aerobio de aguas residuales industriales empleando un sistema de biodiscos. Caso tipo: vinazas de ingenio azucarero alcoholero. Tesis profesional presentada para obtención del grado de Maestría en Ingeniería Ambiental, Facultad de Ingeniería, UNAM.

8. ANEXOS

Anexo I. Prueba de toxicidad aguda con semillas de lechuga

Método 208 de la guía de la OECD para el análisis de sustancias químicas.

La prueba de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) es una prueba estática en la que se pueden evaluar los efectos fitotóxicos de compuestos puros o de mezclas complejas en el proceso de germinación de las semillas y en el desarrollo de las plántulas durante los primeros días de crecimiento. Como puntos para la evaluación de los efectos fitotóxicos, se determina la inhibición en la germinación y la inhibición en la elongación de la radícula y del hipocotilo. La medida de elongación del hipocotilo se considera desde el nudo hasta el sitio de inserción de los dos cotiledones (Figura 41).

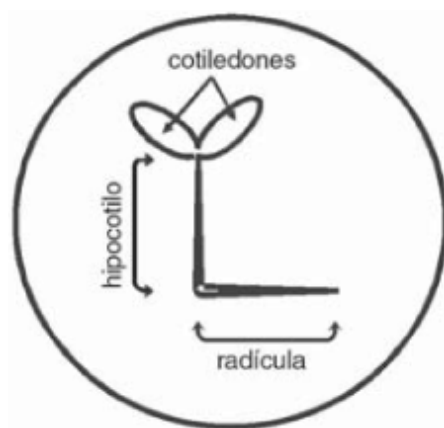


Figura 41. Esquema de plántula de lechuga (*Lactuca sativa* L.)

Este ensayo puede ser aplicado para la evaluación de la toxicidad de compuestos puros o mezclas de aguas superficiales, aguas subterráneas, aguas para consumo humano, aguas residuales domésticas e industriales, además de lixiviados de suelos, sedimentos, lodos u otras matrices sólidas. Esta prueba permite evaluar la fitotoxicidad de muestras coloreadas o con elevada turbiedad de manera directa y sin necesidad de filtración previa, reduciéndose así las interferencias debidas al pretratamiento, además de simplificar el procedimiento de prueba. A pesar de que la lechuga (*Lactuca sativa* L.) no es una especie representativa de ecosistemas acuáticos, la información generada a partir de esta prueba de toxicidad proporciona

datos acerca del posible efecto de los contaminantes en las comunidades vegetales cercanas a las márgenes de cuerpos de agua contaminados, siendo también una especie interesante de considerar por su importancia desde el punto de vista hortícola. Por otra parte, es de fácil y rápida germinación, por lo que es posible desarrollar la prueba en pocos días.

Materiales y Reactivos

- Semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L var. mantecosa). Deben ser semillas certificadas sin fungicidas o plaguicidas, con buen poder germinativo y baja variabilidad en la elongación de la radícula e hipocotilo. Las semillas se almacenan a 4 °C, en oscuridad y en ambiente seco.
- Cajas Petri de 100 mm de diámetro.
- Papel de filtro Whatman núm. 3 (o equivalente), 90 mm de diámetro.
- Matraces aforados de 50 mL.
- Pipetas volumétricas de 1, 2, 5 y 10 mL.
- Regla u otro elemento de medición.
- Pinzas.
- Toallas de papel.
- Bolsas plásticas.
- Cámara oscura termostatzada (22 ± 2 °C).
- Agua dura reconstituida para las diluciones (APHA, 1998).

Preparación de las diluciones

Para realizar una curva dosis-respuesta se recomienda preparar un mínimo de cinco o seis diluciones de la muestra o compuesto a estudiar, de manera que se obtengan valores de toxicidad intermedios entre el 100 y 0%. Para las muestras ambientales se recomienda el uso de un factor de dilución de 0.3 o 0.5 para la preparación de la serie de diferentes concentraciones. El uso de un factor de 0.3 permite evaluar la toxicidad considerando el intervalo entre el 100 y 1% de la muestra realizando cinco diluciones (100, 30, 10, 3 y 1%). Al aplicar un factor de dilución de 0.5, es necesario utilizar mayor número de diluciones para abarcar el mismo intervalo de concentraciones (100, 50, 25, 12, 6, 3 y 1,5%), pero se obtiene mayor precisión en

los resultados. Para la preparación de cada dilución se utiliza agua dura reconstituida, realizando el control negativo con el agua de dilución empleada.

Protocolo de realización

1. Colocar en una caja de Petri un disco de papel filtro.
2. Marcar correctamente cada caja con la dilución correspondiente, así como la fecha, hora de inicio y término de la prueba.
3. Saturar el papel filtro con 4 o 5 mL de la dilución evitando que se formen bolsas de aire.
4. Con la ayuda de una pinza, colocar cuidadosamente veinte semillas, dejando espacio suficiente entre ellas para permitir la elongación de las raíces.
5. Tapar las cápsulas y colocarlas en bolsas plásticas para evitar la pérdida de humedad. Dado que algunas variedades de semillas de lechuga requieren oscuridad para que se produzca la germinación, las cajas de Petri deben mantenerse en oscuridad durante el periodo de incubación, que será de 120 h a una temperatura de 22 ± 2 °C. Realizar repeticiones para cada dilución ensayada.
6. Terminado el periodo de exposición, se procede a cuantificar el efecto en la germinación y en la elongación de la radícula y del hipocotilo.

Tabla 20. Condiciones de la prueba de toxicidad aguda.

Tipo de ensayo	Estático
Temperatura	22 ± 2 °C
Calidad de luz	Oscuridad
Volumen de solución de prueba	4 mL
Agua de dilución	Agua dura reconstituida
Número de semillas por réplica	Veinte
Número de réplicas	Tres
Duración de la prueba	120 h
Efecto medido	Inhibición en elongación de la radícula e hipocotilo. Inhibición en la germinación
Resultado final	CE ₅₀ , CI ₅₀ o % inhibición Germinación > 90%
Aceptabilidad de los resultados	Control positivo y negativo de acuerdo con los valores: admitidos en las cartas control
Control positivo	Cualquier sal de Zn (II)

Medida de los puntos finales de evaluación de la fitotoxicidad

Cada punto final se evalúa comparando el efecto generado en los organismos expuestos a la muestra con respecto a la respuesta en los organismos del control negativo.

➤ Efecto en la germinación

Registrar el número de semillas que germinaron normalmente, considerando como criterio de germinación la aparición visible de la radícula.

➤ Efecto en la elongación de la radícula e hipocotilo

Utilizando una regla o papel milimetrado, medir cuidadosamente la longitud de la radícula y del hipocotilo de cada una de las plántulas correspondientes a cada concentración de tóxico o dilución de muestra y a los controles. La Figura 42 muestra los distintos estadios de la semilla durante la prueba de germinación y elongación.

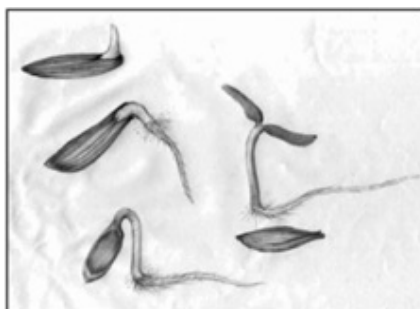


Figura 42. Estadios de la semilla de lechuga durante la prueba.

Antes de retirar las plántulas de las cápsulas de Petri, es importante realizar una observación detallada del estado general de las mismas y del crecimiento de la radícula sobre el papel de filtro. Informar cualquier indicador de fitotoxicidad o de crecimiento anormal en las plántulas tratadas y en los controles (ápices radiculares con necrosis, pelos absorbentes poco desarrollados, radículas con crecimiento ensortijado, necrosis en los cotiledones, etcétera). La necrosis (presencia de tejido muerto) se evidencia como manchas localizadas de coloración parda, blanca o marrón. Al evaluar el efecto en la germinación, consignar además aquellas semillas con germinación anormal (emergencia de cotiledones o cotiledones e hipocotilo solamente, pero sin emergencia de la radícula) o con desarrollo de hongos.

Posibles Interferencias

- Toxicidad del papel filtro empleado
- Suciedad o contaminación de las cajas Petri.
- Exceso de agua o de muestra utilizada para empapar el papel.
- Déficit hídrico durante el periodo de exposición.
- Exposición a la luz durante el proceso de incubación.
- Temperatura inadecuada.

Interpretación de los resultados

Los efectos cuantificados sobre la elongación de la radícula o del hipocotilo son efectos subletales. La inhibición en la germinación podría considerarse como un efecto letal, siempre y cuando se pueda corroborar que finalizada la exposición a una muestra las semillas no germinaron por muerte del embrión, y que no existe simplemente un retraso en el proceso de germinación, manteniéndose la viabilidad de la semilla. La inhibición en la germinación registrada al finalizar la prueba, se considera fitotoxicidad aunque el efecto en la germinación sea reversible.

Otro aspecto a considerar es el mayor desarrollo en la elongación de la radícula o el hipocotilo en algunas muestras con respecto al control, no debe ser interpretado como un efecto favorable o estimulante. Si bien es posible que muchos compuestos como iones de Cu o Zn, a bajas concentraciones produzcan elongación extrema por ser micronutrientes vegetales, esta respuesta debe ser evaluada de manera conjunta con los efectos registrados en otras pruebas.

Anexo II. Análisis de la actividad enzimática

Metodología de determinación proporcionada por el fabricante.

El sistema API-Zym es un micrométodo semicuantitativo de investigación de actividades enzimáticas aplicable a diferentes tipos de muestra como microorganismos, suspensiones celulares, tejidos, líquidos biológicos, etc. Permite detectar actividades enzimáticas de un extracto complejo no purificado. Este método no sustituye a las técnicas de separación electroforética. La galería API-Zym se compone de una cámara de humidificación y una tira con 20 cúpulas: una de las cuales se emplea como control negativo y las restantes contienen los reactivos para identificar la actividad de las enzimas que se encuentran listadas en la Tabla 21.

Tabla 21. Enzimas analizadas con el sistema API-Zym.

Grupo	Enzima Identificada	Coloración positiva
Fosfatasas	Fosfatasa alcalina	Violeta
	Fosfatasa ácida	Violeta
	Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa	Azul
Lipasas	Estearasa (C4)	Violeta
	Estearasa lipasa (C8)	Violeta
	Lipasa (C14)	Violeta
Proteasas	Leucina arilamidasa	Anaranjada
	Valina arilamidasa	Anaranjada
	Cistina arilamidasa	Anaranjada
	Tripsina	Anaranjada
	α -quimiotripsina	Anaranjada
Carbohidrasas	α -galactosidasa	Violeta
	β -galactosidasa	Violeta
	β -glucoronidasa	Azul
	α -glucosidasa	Violeta
	β -glucosidasa	Violeta
	N-acetil- β -glucosaminidasa	Marrón
	α -manosidasa	Violeta
	α -fucosidasa	Violeta

El fondo de la galería esta constituido por una trama de fibras inertes donde están repartidos los sustratos semisintéticos. Este soporte favorece las reacciones enzimáticas al mismo tiempo que los sustratos son insolubles en la muestra. Las reacciones producidas durante el tiempo de incubación se traducen en cambios de color que se revelan mediante la adición de la tabla de lectura (Figura 43).

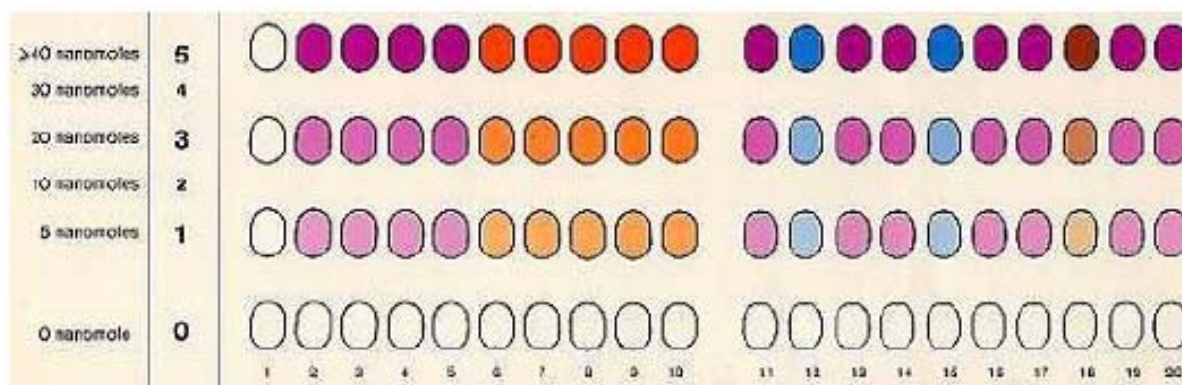


Figura 43. Escala de color del sistema API-Zym.

En esta tabla, el valor 0 corresponde a una reacción negativa, el valor 5 a la intensidad más alta de color, las reacciones intermedias se anotan como 1, 2, 3 ó 4 según su intensidad, siendo 3, 4 y 5 consideradas como positivas. Las coloraciones son estables varias horas en solución. Después de 24 horas pueden aparecer coloraciones parásitas.

Procedimiento

1. Diluir la muestra en un volumen de 2 mL de agua destilada o medio acuoso no tamponado.
2. Tomar una cámara de incubación (fondo y tapa) y colocar 5 mL de agua destilada en los alvéolos para crear una atmósfera húmeda.
3. Marcar la lengüeta lateral de la cámara, no escribir la referencia sobre la tapa.
4. Sacar la galería en la cámara de incubación.
5. Colocar la galería en la cámara de incubación.
6. Colocar con una pipeta la muestra preparada a razón de 65 µL por cúpula.
7. Colocar la tapa en la placa e incubar durante 4 horas a 37 °C.
8. Después de la incubación, añadir 1 gota de reactivo Zym A y una gota de reactivo Zym B en cada cúpula.
9. Dejar que se desarrolle el color durante 5 minutos como mínimo.
10. Si es posible, después colocar la galería durante 10 segundos a la radiación de una lámpara de 1,000 W a una distancia aproximada de 10 cm encima de las cúpulas. Esta operación tiene por objetivo eliminar el fondo amarillo debido al

exceso de reactivo Fast Blue BB y da reacciones negativas e incoloras. Una exposición prolongada a la luz solar produce el mismo efecto.

11. Efectuar la lectura y anotar todas las reacciones en la hoja de resultados, proporcionada por el fabricante.

Anexo III. Determinación de fenoles totales

Principio

Después de concentrar y extraer los fenoles con éter y una solución de hidróxido de sodio, se someten a una bromación y después se hace una titulación por retroceso de los mismos. Este es un método volumétrico establecido para detectar concentraciones mayores a 1 mg de fenoles/L.

Reactivos

Solución de hidróxido de sodio 1N

Solución de bromuro de potasio al 25% (25g de KBr/100 mL de agua destilada)

Solución de yoduro de potasio al 20% (20g de KI/100 mL de agua destilada)

Solución de ácido clorhídrico 1N y 0.5N

Solución de tiosulfato de sodio 1N para titular las muestras

Solución de bromato de potasio al 0.3% (0.3g de KBrO_3 /100 mL de agua destilada).

Éter etílico o dietil éter

Procedimiento

1. Concentrar un volumen de 100 mL muestra por calentamiento, hasta obtener 50 mL de volumen final. Adicionalmente, colocar un blanco de referencia.
2. Introducir en un embudo de separación el volumen de muestra final, agregar 10 mL de éter, agitar vigorosamente.
3. Conservar la fase acuosa (inferior) y repetir el paso anterior. Finalmente desechar la fase acuosa y conservar la fase orgánica (superior).
4. Agregar a la fase orgánica 50 mL de NaOH al 1N, agitar y decantar la fase acuosa que es la que contiene los fenoles en forma de fenolatos.
5. Neutralizar esta solución con HCl al 1N, ajustar a un volumen de 150 mL con agua destilada. Añadir 23 mL de bromuro de potasio al 25%, 10 mL de HCl al 0.5N.
6. Calentar en baño María a una temperatura de 30°C, agitar y añadir 25 mL de bromato de potasio al 0.3% (la solución adquiere una coloración amarillenta).

-
7. Dejar a temperatura constante ($>25^{\circ}\text{C}$) durante una hora.
 8. Agregar 25 mL de yoduro de potasio y dejar reposar a temperatura ambiente durante 30 min.
 9. Titular el yodo liberado con la solución de tiosulfato, la solución pasa de rojo a transparente.

Cálculos

El cálculo de la concentración de fenoles totales se realiza con la siguiente ecuación:

$$(n_2 - n_1) \times 1.567 \times 1000/V$$

Donde:

n_2 mL de tiosulfato utilizados para el blanco

n_1 mL de tiosulfato gastados en la muestra

V volumen de mL de la muestra inicial.