



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE CIENCIAS

**ANÁLISIS Y MODELACIÓN DEL
PROCESO DE NITRIFICACIÓN EN
SISTEMAS EXPERIMENTALES QUE
SIMULAN HUMEDALES ARTIFICIALES**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

SERGIO ABURTO CASTAÑEDA

DIRECTOR DE TESIS: DR. VÍCTOR MANUEL LUNA PABELLO

México, D.F.

Noviembre, 2011



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE CIENCIAS

**ANÁLISIS Y MODELACIÓN DEL
PROCESO DE NITRIFICACIÓN EN
SISTEMAS EXPERIMENTALES QUE
SIMULAN HUMEDALES ARTIFICIALES**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

SERGIO ABURTO CASTAÑEDA

DIRECTOR DE TESIS: DR. VÍCTOR MANUEL LUNA PABELLO

México, D.F.

Noviembre, 2011



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/630/11

ASUNTO: Oficio de Jurado

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **28 de febrero de 2011** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del (la) alumno (a) **ABURTO CASTAÑEDA SERGIO** con número de cuenta **95336952** con la tesis titulada **"Análisis y modelación del proceso de nitrificación en sistemas experimentales que simulan humedales artificiales"**, realizada bajo la dirección del (la) **DR. VÍCTOR MANUEL LUNA PABELLO:**

Presidente: DR. JAVIER CARMONA JIMÉNEZ
Vocal: DR. IVÁN MORENO ANDRADE
Secretario: DR. PEDRO RAMÍREZ GARCÍA
Suplente: DR. ALFONSO LUGO VÁZQUEZ
Suplente: DR. EBERTO NOVELO MALDONADO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 15 de noviembre de 2011

María del Coro Arizmendi
Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga
Coordinadora del Programa



MCAA/MJFM/ASR/ ipp

AGRADECIMIENTOS ACADEMICOS

Agradezco al Posgrado de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la oportunidad de continuar mis estudios en una gran institución y contribuir al desarrollo del conocimiento que tanta falta le hace a México.

Se agradece el apoyo económico otorgado como becario por el Consejo Nacional de Ciencia y tecnología (CONACyT) durante la realización del presente trabajo con número de becario 234317 durante el periodo del 01 de Agosto del 2009 al 30 de enero del 2011.

Se hace presente el agradecimiento el apoyo recibido por parte de DGAPA PAPIIT IN-107209 "Desarrollo de un humedal artificial de alta eficiencia para la remoción de contaminantes orgánicos y microorganismos patógenos" así como del PAIP FQ-VMLP 6190-14 de 2009 y 2010.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Víctor Manuel Luna Pabello, por la oportunidad y la confianza incondicional depositada a lo largo del presente trabajo de investigación.

Agradezco al Dr. Eberto Novelo Maldonado y al Dr. Pedro Ramírez García por las recomendaciones y sugerencias que enriquecieron significativamente el presente trabajo de investigación.

Agradezco al Dr. Javier Carmona Jiménez, Dr. Iván Moreno Andrade y al Dr. Alfonso Lugo Vázquez por las oportunas y puntuales sugerencias vertidas para el enriquecimiento del presente trabajo de investigación.

Agradezco al M. en C. Luciano Hernández Gómez y a la M. en C. María Guadalupe Tsuzuki Reyes por el apoyo brindado durante la presente investigación

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi madre, a la que admiro, respeto y amo; gracias por apoyarme y dejarme siempre ser, gracias por todo.

A mi hermana Aideé gracias por todo...

A mis Abuelos Emigdio Castañeda Flores† e Isabel Mares Sandoval, por sus enseñanzas y cariño.

A la Familia Castañeda

Gracias a todos por permitirme crecer, aprender y compartir grandes momentos con ustedes, por sus invaluable consejos y su cariño, gracias por todo.

A mis amigos José de Jesús García y Carlos Eduardo Maldonado por brindarme su amistad y compartir grandes momentos de la vida conmigo.

A las Familias Cruz Soto, García Estrada, Maldonado Cruz, por la amistad y las atenciones.

A mis amigos Angel R., Claudia C., Elliot, Érica, Érikca, Elena, Eva, Gloria H. R., Guillermo, Juan T., Susana, a los BioLOCOS Aldo, Alejandra, Anidia, Hiram, Arturo, Edgardo, Eduardo, Jorge, Juan, Saúl, gracias por los momentos....

A todo el personal y banda del Laboratorio de Microbiología Experimental de la Facultad de Química: en especial a Anita, Alejandra Oka, Cuco, Jazmín, Mariana, Patricia Castro, Tenoch, gracias por hacer más amenas las jornadas de trabajo en el laboratorio.

A Laura Elena Rosado y Gabriela Hirata quienes contribuyeron con en la presente investigación, gracias chavas.

A Talía Sánchez quien contribuyo desinteresadamente en el trabajo experimental, gracias por los paros carnalita.

A Diana M. gracias por las lecciones de vida.

Al Benja y al Rafa por brindarme su amistad y permitirme aprender juntos, gracias carnales.

A Alma L. Cortés por brindarme siempre su amistad, apoyo y comprensión, por estar siempre ahí, por enseñarme tantas cosas, por dejarme ser y por su amor gracias☺.

Al M. en I. Héctor Faustino Ramírez Carrillo por las enseñanzas que muchas veces aclararon mis ideas, por la confianza, los consejos y la amistad, gracias mushasho, este trabajo no pudo tomar forma sin usted...

Dedico este trabajo al pueblo de México, por darme el privilegio de realizar mis estudios en la Universidad Nacional Autónoma de México, esperando retribuirle a la gente que más lo necesita en este maravilloso país.

“En lo que acción se refiere, el hombre no puede hacer otra cosa que aproximar o separar los cuerpos naturales; lo demás lo realiza la naturaleza”

Sir Francis Bacon

“Todas las teorías son legítimas y ninguna tiene importancia. Lo que importa es lo que se hace con ellas”

Jorge Luis Borges

“Quien volviendo a hacer el camino viejo aprende el nuevo, puede considerarse un maestro”

Confucio

“El individuo ha luchado siempre para no ser absorbido por la tribu. Si lo intentas, a menudo estarás solo, y a veces asustado. Pero ningún precio es demasiado alto por el privilegio de ser uno mismo”

Friedrich Nietzsche

“Las armas más poderosas han sido siempre las nuevas formas de conciencia... la Inquisición y el poder de la Iglesia en la Edad Media no fueron derribadas por una acción revolucionaria directa. Su fuerza desapareció porque la conciencia humana se desarrolló más allá de ellos”.

William S. Burroughs

ÍNDICE

GLOSARIO	12
RESUMEN	15
1 INTRODUCCIÓN	17
2 OBJETIVOS HIPÓTESIS Y ALCANCES.....	20
2.1 OBJETIVO GENERAL.....	20
2.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	20
2.3 HIPÓTESIS.....	20
2.4 ALCANCES.....	20
3 MARCO TEÓRICO	22
3.1 PROBLEMÁTICA ACTUAL DE MÉXICO RELACIONADA CON LA PRESENCIA DE NITRÓGENO EN SUS DIFERENTES ESTADOS DE OXIDACIÓN SOBRE CUERPOS DE AGUA	22
3.2 LOS HUMEDALES ARTIFICIALES.....	24
3.2.1 <i>El medio de soporte</i>	26
3.2.2 <i>La vegetación en los Humedales Artificiales</i>	29
3.2.3 <i>Los microorganismos en los Humedales Artificiales</i>	33
3.2.4 <i>Bacterias nitrificantes</i>	35
3.2.5 <i>El Proceso de Nitrificación en Humedales Artificiales</i>	37
3.3 MODELOS ESTADÍSTICOS	44
3.3.1 <i>Fundamentos estadísticos</i>	44
3.3.2 <i>Estructura del error</i>	44
3.3.3 <i>Predictor lineal</i>	45
3.3.4 <i>Función de enlace</i>	47
3.4 ANÁLISIS DE GLM.....	47
3.4.1 <i>Máxima verosimilitud</i>	48
3.5 MODELOS DE SIMULACIÓN	49
3.5.1 <i>Fundamentos de modelación</i>	49
4 MATERIALES Y MÉTODOS	57
4.1 ESTRATEGIA DE TRABAJO DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN	57
4.2 MATERIALES	58
4.2.1 <i>Sistemas experimentales a escala laboratorio que simulan a un humedal artificial</i>	58
4.2.2 <i>Componente abiótico</i>	59
4.2.3 <i>Componente Biótico</i>	60
4.3 EXPERIMENTACIÓN PREVIA.....	62
4.4 DISEÑO DE LOS SEHA.....	63
4.4.1 <i>Profundidad del medio filtrante</i>	64
4.4.2 <i>Selección y caracterización del material de empaque</i>	65
4.4.3 <i>Montaje de los SEHA</i>	66
4.4.4 <i>Selección y propagación del componente vegetal</i>	69
4.4.5 <i>Componente microbiano</i>	71
4.5 EXPERIMENTACIÓN EN LOS SEHA.....	82
4.5.1 <i>Diseño de experimento</i>	82
4.5.2 <i>Arranque de los SEHA</i>	83
4.5.3 <i>Muestreo</i>	86
4.6 MODELACIÓN ESTADÍSTICA	87
4.6.1 <i>Análisis estadístico exploratorio</i>	88
4.6.2 <i>Planteamiento del Modelo Lineal Generalizado</i>	91
4.7 MODELO DE SIMULACIÓN DEL PROCESO DE NITRIFICACIÓN	95

4.7.1	<i>Planteamiento del modelo de simulación</i>	96
4.7.2	<i>Modelo cuantitativo sobre la dinámica de la nitrificación en los SEHA</i>	98
4.7.3	<i>Evaluación y validación del modelo de simulación sobre la dinámica de la nitrificación en HA.</i>	103
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	105
5.1	RESULTADOS DE LA EXPERIMENTACIÓN PREVIA.....	105
5.1.1	<i>Resultados de la caracterización del material de empaque</i>	105
5.1.2	<i>Resultados del montaje de los sistemas</i>	105
5.1.3	<i>Resultados del componente vegetal</i>	106
5.1.4	<i>Resultados del componente microbiano</i>	107
5.1.5	<i>Resultados sobre las cinéticas poblacionales de bacterianas y degradación del NH_4^+</i>	112
5.2	RESULTADOS DE LOS SEHA.....	125
5.2.1	<i>Periodo de Arranque</i>	125
5.2.2	<i>Periodo de Estabilización</i>	135
5.2.3	<i>Comparación de la degradación de amonio por arreglo de sistema</i>	137
5.2.4	<i>Balance de masa de los SEHA</i>	143
5.3	RESULTADOS DE LA MODELACIÓN ESTADÍSTICA.....	149
5.3.1	<i>Resultados del análisis estadístico exploratorio</i>	149
5.3.2	<i>Análisis de correlación durante la fase de experimentación previa</i>	154
5.3.3	<i>Sinopsis del análisis estadístico exploratorio de la fase de experimentación previa</i>	158
5.3.4	<i>Resultados del análisis estadísticos exploratorios de los SEHA</i>	160
5.4	RESULTADOS DEL LOS GLMS	164
5.4.1	<i>Modelo Lineal Generalizado para la degradación del amonio</i>	164
5.4.2	<i>Modelo Lineal Generalizado para las dinámicas de los nitritos</i>	168
5.4.3	<i>Modelo Lineal Generalizado para las dinámicas de los nitratos</i>	172
5.5	RESULTADOS SOBRE EL MODELO DE SIMULACIÓN DEL PROCESO DE NITRIFICACIÓN	179
5.5.1	<i>Validación del modelo de simulación</i>	185
5.5.2	<i>Comparación entre el modelo para nitrificación propuesto y modelos existentes</i>	188
5.6	INTEGRACIÓN	190
6	CONCLUSIONES	194
6.1	PROYECCIONES Y RECOMENDACIONES	196
7	BIBLIOGRAFÍA	199

8	ANEXO I	208
8.1	EQUIPOS	208
8.2	SOFTWARE.....	210
9	ANEXO II	211
9.1	MEDIOS DE CULTIVO	211
9.2	DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS MICROBIOLÓGICAS	212
9.3	TÉCNICAS DE SIEMBRA MICROBIOLÓGICA.....	215
9.4	TÉCNICAS DE CONTEO DE MICROORGANISMOS	216
10	ANEXO III	218
10.1	DETERMINACIONES FISICOQUÍMICAS	218
10.2	CÁLCULOS ESTEQUIOMÉTRICOS PARA DETERMINAR LAS CONCENTRACIONES PROPUESTAS EN MEDIO ENRIQUECIDO CON AMONIO. 228	
11	ANEXOIV	229
11.1	CÁLCULOS.....	229
12	ANEXO V	233
12.1	ALGORITMOS DEL MODELO DE SIMULACIÓN	234

GLOSARIO

ANOVA.- Análisis de Varianza.

Arundo donax.- Planta vascular empleada en los SEHA.

Bacterias Nitrificantes.- Microorganismos capaces de degradar el Nitrógeno amoniacal hasta nitratos.

Componente vegetal.-Organismos vegetales compuestos por plantas vasculares que se emplean en sistemas de humedal artificial.

Consorcio Bacteriano.- Comunidad bacteriana que comparten un ambiente y pueden establecer interacciones ecológicas.

D.Q.O.- Demanda Química del Oxígeno Medición indirecta de la cantidad de materia orgánica e inorgánica en un cuerpo de agua susceptible de ser oxidada químicamente por un agente oxidante fuerte.

GLM.- Modelo Lineal Generalizado. Es una herramienta de análisis estadístico la cual provee una estimación de una variable de respuesta, **y**, condicionada sobre una función lineal de valores de **x**, para uno o varios predictores que pueden ser continuos o discretos.

GLMNH4.- Modelo Lineal Generalizado que describe los efectos directos e interacciones que modifican de manera estadísticamente significativa la respuesta de la cinética de degradación del amonio dentro de los SEHA.

GLMNO2.- Modelo Lineal Generalizado que describe los efectos directos e interacciones que modifican de manera estadísticamente significativa la respuesta de la cinética de transformación de los nitritos a nitratos dentro de los SEHA.

GLMNO3.- Modelo Lineal Generalizado que describe los efectos directos e interacciones que modifican de manera estadísticamente significativa la respuesta de la cinética de transformación de los nitratos a otros compuestos nitrogenados como los NO_x dentro de los SEHA.

HA.- Humedal Artificial.

HAFH.- Humedal artificial de flujo horizontal.

HAFV.-Humedal artificial de flujo vertical.

Modelo de simulación.- Modelo que plantea las dinámicas de la nitrificación por medio de una interfase informática capaz de representar y predecir interacciones y efectos directos que se presentan en sistemas.

NH₃⁻.- Amoníaco.

NH₄⁺.- Ión amonio cuando se encuentra en dilución con acuosa.

NH4C.- Medio enriquecido con amonio más glucosa e inoculado con un consorcio bacteriano.

NH4G.- Medio enriquecido con amonio más glucosa e inoculado sólo con *Nitrosomonas europaea*.

NH4M.- Medio enriquecido con amonio e inoculado sólo con *Nitrosomonas europaea*.

Nitrobacter.- Grupo de Proteobacterias α capaces de oxidar los nitritos a nitratos.

Nitrosomonas.- Grupo de Proteobacterias γ capaces de oxidar el nitrógeno amoniacal a nitritos.

NO₂⁻.- Ión nitrito formado por la oxidación biológica de las aminas y del amoníaco.

NO₃⁻.- Anión nitrato formado por la oxidación biológica de nitritos a nitratos.

N_T.- Concentración del Nitrógeno total medido indirectamente por una fuerte oxidación.

O.D..- Concentración de Oxígeno disuelto medido en mg/L.

Potencial Redox.-Potencial de oxidación-reducción.

Prueba de Pearson.- El coeficiente de correlación de Pearson es un índice que mide la relación lineal entre dos variables aleatorias cuantitativas, esta correlación es independiente de la escala de medida de las variables.

Prueba de Spearman.- El coeficiente de correlación de Spearman, es una medida de la correlación entre dos variables aleatorias continuas.

RCH.- Razón de carga hidráulica. Volumen de agua por unidad de tiempo con la cual se alimenta un sistema.

SEHA.- Sistema experimental a escala de laboratorio que simula un humedal artificial. Es una unidad procesadora de agua contaminada, diseñada para que en su interior se lleven a cabo reacciones bioquímicas, dicha unidad está basada en columnas de PVC o acrílico, empacadas con material mineral de origen pétreo, simulando las condiciones de un humedal artificial.

SEHAM.-SEHA con tratamiento sólo con inóculo de microorganismos.

SEHAP.- SEHA con tratamiento con plantas e inóculo de microorganismos.

SEHAPT.- SEHA con tratamiento sólo con plantas.

SEHAT.- SEHA con tratamiento sin plantas ni microorganismos.

STBAC.-Sistemas de tratamiento biológico aerobio convencional.

TRH.- Tiempo de residencia hidráulico. Tiempo que permanece el agua dentro de un reactor y está en función de la velocidad de degradación del componente a remover.

UFC.-Unidades Formadoras de Colonias.

RESUMEN

La presente investigación aborda el comportamiento dinámico sobre el proceso de nitrificación en sistemas experimentales que simulan humedales artificiales a escala laboratorio (SEHA). Los parámetros considerados fueron los iones NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- , pH, Potencial Redox, Temperatura, materia orgánica disuelta medida como D.Q.O., Oxígeno Disuelto (OD), biomasa vegetal generada y concentración de bacterias oxidadoras de amonio. Esta información fue analizada por medio de modelos lineales generalizados (GLM), los cuales permitieron establecer que para la oxidación del amonio los factores que inciden significativamente sobre este proceso son el pH y la concentración de NO_2^- , mientras que para nitratación la interacción entre las concentraciones de NH_4^+ y NO_2^- , NO_3^- , O.D. y bacterias oxidadoras de amonio, son las que modifican de forma estadísticamente significativa este proceso. La transformación del NO_3^- a otros compuestos como los NO_x y el N_2 está en función del valor del pH, la concentración del O.D. y la interacción entre pH y la materia orgánica disuelta. Con base a estos resultados el modelo de simulación fue planteado y probado con datos observados. Para la validación del modelo se realizaron pruebas de ANOVA entre los valores obtenidos experimentalmente y los predichos por el modelo de simulación a un intervalo de confianza del 95 %, mostrando que no existen diferencias significativas entre dichos valores (observados y esperados). Los SEHA mostraron altos porcentajes de degradación de hasta un 90% en la concentración de NH_4^+ . En cuanto a la concentración de O.D. no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos que contenían componente vegetal y los que no presentaron dicho componente. El modelo permitió simular las dinámicas de la nitrificación en los SEHA en función de los parámetros analizados, así como estimar la densidad poblacional relativa en función del sustrato transformado con una posible aplicación al estudio de sistemas tanto naturales como artificiales.

Abstract

This study was focused on the dynamic of nitrification process in constructed wetlands using experimental systems laboratory scale (SEHA). In these systems were evaluated and monitored the concentrations of ammonium, nitrite, nitrate, pH, temperature, organic matter measured as cod, redox potential, dissolved oxygen (DO), biomass generated by plants and concentration of ammonium oxidizing bacteria. This information was analyzed using generalized linear models (GLM). The model allowed establishing the factors that significantly affect the oxidation processes of the ammonia. One important finding is the pH and the concentration of nitrite, are factors that significantly affect the nitrification process. Whereas, the interactions between the concentrations of ammonium, nitrite, nitrate, DO and concentration of ammonium oxidizing bacteria are highly important for nitrification processes. The transformation of nitrate to other compounds such as nitrogen oxides and molecular nitrogen depended on pH, DO and the interaction between pH and dissolved organic matter. Based on these results the simulation model was proposed and tested with observed data. To validate the model ANOVA tests were performed between the values obtained experimentally and those predicted by the simulation model to a confidence interval of 95%, showing that no significant differences between these values (observed and expected). The SEHA showed high degradation rates up to 90% of ammonium. There wasn't significant difference in do between treatments with and without plants. The model allowed simulated dynamic of nitrification for SEHA in function of parameters analyzed, also it could estimate the relative population density as a function of transformed substrate. This is important because of their possible application on the study of natural and artificial systems

Capítulo 1

Introducción

1 INTRODUCCIÓN

En México, el 80% de las aguas residuales generadas por actividades antropogénicas se vierten a cuerpos de agua naturales y artificiales sin ningún tratamiento previo, provocando con ello un gran deterioro en los ecosistemas (CONAGUA, 2011). Los sistemas de tratamiento biológico aerobio convencional (STBAC) comúnmente usados en México, tales como los lodos activados o las lagunas de oxidación, generalmente no son diseñados para mitigar la concentración del contaminante a niveles que permitan la protección de los cuerpos de agua y de la vida silvestre que en ellos se desarrolla (Bayley *et al.*, 2003). Los porcentajes de remoción en el caso del Nitrógeno total (N_T) no superan el 50% en este tipo de sistemas, por lo que en realidad se descargan aguas residuales parcialmente tratadas con elevadas concentraciones de N_T (cuyos valores promedio, en los STBAC, para N_T y nitratos (NO_3^-) son de 22 mg/L y 17 mg/L, respectivamente) que aún impactan en forma negativa el equilibrio ecológico de los cuerpos acuáticos receptores (Byström *et al.*, 2000). El nitrógeno, cuando se encuentra presente en forma de NH_4^+ y como NO_3^- en concentraciones mayores a 0.3 mg/L y relacionados con los ortofosfatos en concentraciones superiores a 0.01 mg/L, propicia el fenómeno de eutrofización, el cual consiste en el enriquecimiento de nutrientes (principalmente P y N) que desencadenan el desarrollo de biomasa algal en un principio; limitando con ello, las condiciones para el desempeño del ecosistema y propiciando un decremento en la diversidad biótica del ecosistema y en general de la calidad del cuerpo de agua (Arheimer y Wittgren, 2002). En este sentido, una alternativa para la degradación de compuestos nitrogenados presentes en solución, es el uso de humedales artificiales (HA). Un HA está constituido por tres componentes principales: a) plantas vasculares b) microorganismos y (c) un medio filtrante. El principio funcional y estructural consiste en la alimentación de los sistemas con agua residual por alguno de los costados (HA de flujo horizontal, HAFH) o por la parte superficial del sistema (HA de flujo vertical, HAFV) de tal manera que el agua se filtre a través del medio de soporte, conocido también como lecho o empaque, el cual está conformado por horizontes o capas de distintos espesores (Gerke y Ho, 2001). Este medio, usualmente constituido por gravilla y/o arena, además de servir como soporte

para el desarrollo para plantas facilita la formación de una biopelícula, en la cual los microorganismos que están asociados en ella hacen posible la degradación de los distintos contaminantes que se encuentran en el agua residual. La interacción de estos componentes permite la transformación microbiana de los distintos compuestos nitrogenados. Algunos de estos compuestos, tales como NO_3^- y N_2 , son incorporados por el componente vegetal por medio de asociaciones con microorganismos (Lin, 2001), mientras que compuestos como el NH_4^+ , NH_3^- , NO_2^- son transformados a través de los procesos físicos, químicos y biológicos, tales como la sedimentación, filtración, absorción, adsorción, volatilización, difusión, convección, fijación vegetativa, mineralización y reacciones de óxido-reducción. En este sentido, es de suma importancia conocer la naturaleza de estos mecanismos para comprender la dinámica de los HA (Gottschall *et al.*, 2007; McBride y Tanner, 2000). Los HA, como sistemas de tratamiento biológico, remueven compuestos de carbono y sólidos suspendidos con eficiencias comúnmente superiores al 80% (Kadlec, 2009). Las condiciones que presentan son principalmente de tipo aerobia en las áreas próximas a las raíces y en la superficie del lecho y de tipo anóxico-anaerobio en las zonas más alejadas (Luna-Pabello *et al.*, 1997). La existencia de ambientes con diferentes concentraciones de oxígeno permite que se desarrolle una gran variedad de microorganismos capaces de transformar los materiales orgánicos hasta biodegradarlos a compuestos más simples (Pauwels y Talbo, 2004; Tanner *et al.*, 2002).

Es importante señalar que los HA se construyen sobre bases empíricas y que no existe suficiente información cuantitativa sobre el flujo de nitrógeno en este tipo de sistemas de tratamiento (Colleen *et al.*, 2005). Por lo tanto, es importante analizar los fenómenos que ocurren dentro de los humedales artificiales para efectos de una adecuada ponderación de las bondades reales que presentan este tipo de sistemas, en particular la degradación de compuestos nitrogenados, debido a que la mitigación de los nutrimentos previenen el proceso de eutrofización en cuerpos de agua naturales y artificiales

Capítulo 2

Objetivos, hipótesis y alcances

2 OBJETIVOS HIPÓTESIS Y ALCANCES

2.1 Objetivo general

Analizar y modelar el proceso de nitrificación en sistemas experimentales a escala laboratorio que simulan a un humedal artificial.

2.2 Objetivos Particulares

- ✓ Evaluar el proceso de nitrificación bajo diferentes condiciones de arreglo en los sistemas experimentales a escala de laboratorio que simulan a un humedal artificial (SEHA).
- ✓ Realizar el balance de masa en el proceso de nitrificación en los diferentes tipos de SEHA evaluados.
- ✓ Desarrollar un modelo general de nitrificación en los SEHA

2.3 HIPÓTESIS

Es posible elaborar un modelo de simulación representativo del proceso de nitrificación, a partir de la determinación y procesamiento adecuado de los valores de parámetros físicos, químicos y biológicos obtenidos de un SEHA, facilitando la comprensión y prospección del proceso.

2.4 ALCANCES

El propósito del presente trabajo, es realizar un seguimiento y modelación del proceso de nitrificación en sistemas experimentales que simulan Humedales artificiales (SEHA), de forma tal que contribuya a mejorar la comprensión de la dinámica del proceso de nitrificación.

Capítulo 3

Marco Teórico

3 MARCO TEÓRICO

3.1 Problemática actual de México relacionada con la presencia de nitrógeno en sus diferentes estados de oxidación sobre cuerpos de agua

Las fuentes de contaminación por nitrógeno en suelos y en cuerpos de agua tanto superficial como subterránea se asocian mayoritariamente a actividades antropogénicas. En México, las descargas de aguas residuales se derivan principalmente del uso doméstico, las cantidades generadas alcanzan 7.63 km³/año, de las cuales sólo el 20 % son tratadas por métodos convencionales (CONAGUA, 2011). La composición porcentual para este tipo de agua es de 60 % carbohidratos, 30 % proteína y 10 % lípidos (Crites, 2005). Otra fuente de contaminación para los cuerpos de agua son las elevadas dosis de fertilizantes nitrogenados empleados en el sector agrícola, las cuales son muy superiores a las necesidades de los cultivos, ya que es sabido que las plantas aprovechan únicamente un 50% del nitrógeno aportado durante el proceso de abonado (Drizo *et al.*, 2000). Esto supone que el exceso de nitrógeno se pierde generalmente por el lavado del suelo, esta agua con altas concentraciones de nitrógeno se filtra al subsuelo y es a su vez arrastrada hacia los acuíferos ríos y embalses, provocando problemas de contaminación en los diferentes cuerpos de agua, tanto naturales como artificiales (Drizo *et al.*, 2000). Los principales problemas que se presentan en los ecosistemas acuáticos asociados a la contaminación por nitrógeno son: (a) acidificación o alcalinización en ríos y lagos; (2) eutrofización de los cuerpo de agua continentales y marinos, (3) toxicidad directa de los compuestos nitrogenados (NH_3^+ , NH_4 , NO_2^+ , NO_2^- , NO_3^-) para los organismos en que habitan los sistemas acuáticos (Byström *et al.*, 2000). Debido a esta problemática y como consecuencia, las concentraciones de N_T en aguas superficiales superan en muchos casos el límite de 40 mg/L (uso en riego agrícola.- NOM-001-SEMARNAT-1996) , mientras que para la protección de vida silvestre y contacto humano el límite marcado por la legislación vigente es aún menor con un valor permisible de 15 mg/L. Por lo tanto, es necesario recurrir a sistemas capaces de depurar los compuestos nitrogenados presentes en solución de forma eficiente. Una alternativa para este fin es el uso de los HA, los cuales resultan altamente competitivos frente a tecnologías

convencionales tales como lodos activados, filtros percoladores y lagunas de oxidación (Tabla 1).

Tabla 1. Comparación de tecnologías empleadas comúnmente en los STBAC

	Humedal Artificial	Biodiscos	Laguna de oxidación	Lodos activados
Requerimiento de reactivos químicos	No	Si	Si	Si
Costo de construcción	Bajo	Medio	Bajo	Medio
Costo de mantenimiento	Bajo	Alto	Bajo	Medio
Estabilidad del sistema	Alta	Baja	Media	Media
Área promedio requerida para la instalación [m²/hab]	2,5	5	4	4
Mantenimiento requerido	Bajo	Medio	Medio	Alto
Tiempo de vida útil	Alto	Medio	Medio	Medio
Estética	Alta	Baja	Media	Baja
Viabilidad ambiental	Alto	Medio	Bajo	Medio
Remoción de DQO %	60-98	70-85	50-98	70-98
Remoción de N %	30-95	30-80	10-70	20-60
Remoción de P %	20-98	20-30	10-40	70-90
Remoción de coliformes totales %	90-99	50-60	30-40	40-60
Inactivación de huevos de helmintos %	60-95	0	0	0

Los HA son sistemas que basan el proceso de degradación de contaminantes de las aguas residuales mediante la interacción de sus constituyentes principales, los cuales son el lecho o medio de soporte, las plantas acuáticas y los microorganismos depuradores. Estos constituyentes permiten que se lleven a cabo distintos mecanismos de degradación de los contaminantes, entre los que destacan la filtración, adsorción, fijación, asimilación bioquímica y sedimentación, entre otros. La eficiencia de estos sistemas capaces de remover compuestos de carbono y sólidos suspendidos son superiores al 80% (Kadlec, 2003). Con lo cual es factible obtener una calidad de agua para distintos tipos de reuso, tales como descarga en embalses, ríos y lagos, protección de vida acuática silvestre, o uso en riego agrícola; cumpliendo comúnmente, siempre y cuando sean adecuadamente diseñados y operados, con la normatividad nacional o internacional vigente (Brix y Arias, 2008; EEA, 2000).

No obstante de las bondades de los HA, su construcción en México aún es limitada, ya que en la actualidad sólo se cuenta con un porcentaje menor al 7% de sistemas instalados de este tipo del total de plantas de tratamiento de aguas residuales que operan en el país. Lo anterior a pesar de que se tienen datos históricos que hacen referencia a su uso por culturas prehispánicas, siendo empleados principalmente en países de Europa y Norteamérica desde hace más de 40 años (Brix y Arias, 2008; Langergraber *et al.*, 2008). El empleo de los HA fundamentalmente se ha enfocado al tratamiento de aguas residuales domésticas de pequeñas poblaciones, rurales y semiurbanas. No obstante, en la actualidad se están llevando a cabo distintos estudios con el fin de hacer de los HA, tecnologías que permitan tratar aguas contaminadas con hidrocarburos, metales pesados o plaguicidas, entre otras (Vimazal, 2009).

3.2 Los Humedales Artificiales

Los HA son sistemas empleados para la depuración de aguas residuales domésticas, así como para cierto tipo de aguas de origen industrial, su aplicación se ha enfocado en brindar tratamiento a las aguas contaminadas, vertidas por comunidades pequeñas y medianas (menores a 5 mil habitantes), que no cuentan con obras de conexión a

colectores principales o no poseen suficientes recursos para desarrollar tecnologías costosas. El uso de los HA resulta una opción altamente viable debido, entre otros aspectos, a su bajo costo relativo en su implementación y a la facilidad de construcción y operación que como alternativa ofrecen (Luna-Pabello *et al.*, 1997b).

Un HA está constituido por tres componentes principales: a) plantas vasculares, b) microorganismos y (c) un medio filtrante (Figura 1). El principio funcional y estructural consiste en la alimentación de los sistemas con agua residual, la clasificación de estos sistemas varía según el autor, sin embargo para efectos descriptivos se tomará la propuesta de Kadlec (2008).

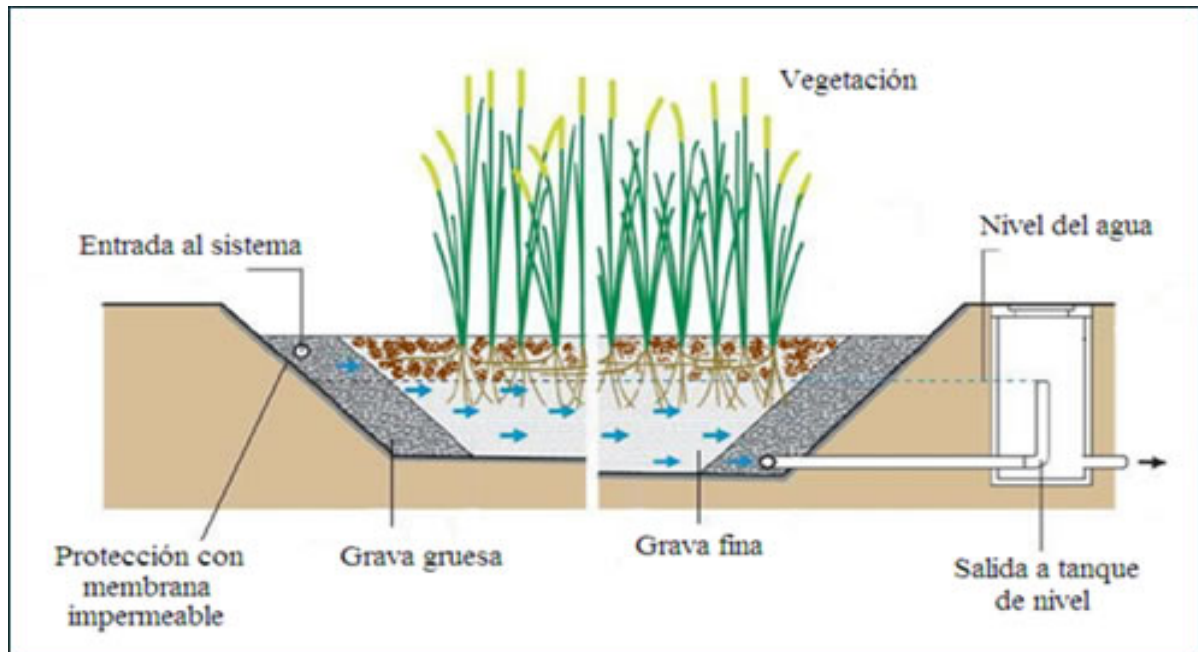


Figura 1. Esquema de un Humedal Artificial subsuperficial de flujo horizontal (Ramírez, 2003)

Los HA se clasifican por el tipo de flujo que presentan: flujo superficial y subsuperficial (Figura 2). La alimentación del sistema se lleva a cabo por alguno de los costados (HA de flujo horizontal, HAFH, Fig.1) o por la parte superficial del sistema (HA de flujo vertical, HAFV) de tal manera que el agua se filtre a través del medio de soporte, conocido también como lecho o empaque, el cual está conformado por horizontes o capas de distinto espesor.

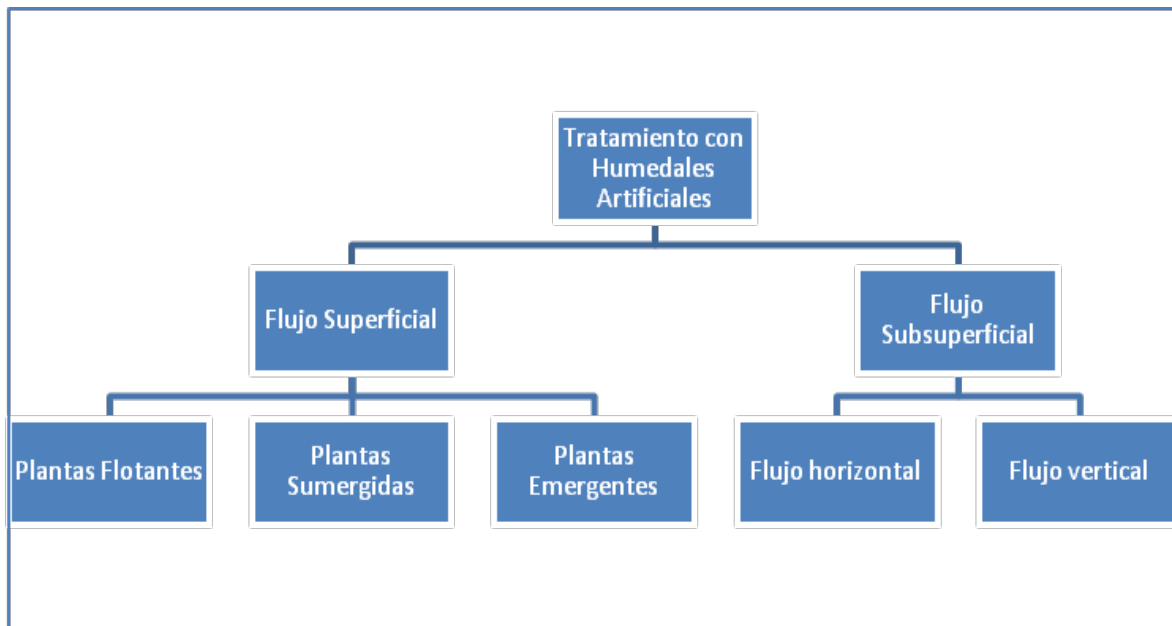


Figura 2. Clasificación de humedales artificiales (Kadlec y Wallace, 2009)

Las condiciones en cuanto a la disposición de oxígeno que presentan los sistemas de tipo HA, son principalmente aerobias en las zonas próximas a las raíces, así como en la superficie del lecho filtrante. Las condiciones de tipo anóxico-anaerobio se presentan en las zonas más alejadas o profundas del lecho filtrante (Kadlec y Wallace, 2009; Vymazal y Kröpfelová, 2009).

3.2.1 El medio de soporte

El medio de soporte o material de empaque usualmente está constituido por gravilla y/o arena, el cual sirve como soporte para el desarrollo de las plantas y el establecimiento de la biopelícula (Vymazal, 2007). La biopelícula está formada por microorganismos que están asociados a la degradación de los distintos contaminantes que se encuentran en el agua residual (Vymazal, 2007). La interacción de estos componentes permite la transformación microbiana del nitrógeno amoniacal a nitratos, los cuales a su vez son incorporados, para su desarrollo, por las plantas vasculares (Lin, 2002). Los procesos físicos, químicos y biológicos, tales como la sedimentación, filtración, absorción, adsorción, volatilización, difusión, convección, fijación vegetativa, mineralización, reacciones de óxido-reducción y descomposición microbiana, son de

gran importancia para comprender la dinámica de estos sistemas de depuración biológica (Gottschall *et al.*, 2007; Mcbride y Tanner, 2000; Vymazal, 2009). De manera particular estos procesos, permiten la retención de partículas sólidas suspendidas no removidas en los tratamientos previos, mediante los fenómenos de adsorción y precipitación. En el caso de los microorganismos patógenos la remoción ocurre por sedimentación y filtración principalmente (Vymazal, 2007). Con respecto a los compuestos que contienen fósforo, su remoción se efectúa vía adsorción del lecho, aunque por este medio el porcentaje de remoción es comparativamente menor con respecto al que realizan los microorganismos y las plantas (Butin *et al.*, 1996; Magmedov, 1986). Las características del material de empaque (tipo y tamaño de partícula), en conjunto con la disposición y forma del rizoma de las plantas, afectan la hidráulica del sistema, influyendo de forma determinante en el régimen del flujo dentro del sistema (Vymazal, 2009). Los materiales de empaque que se emplean, así como la su arreglo o disposición, proporcionan condiciones óptimas para la conductividad hidráulica y la velocidad de infiltración, los cuales contribuyen a la determinación del tiempo de residencia hidráulico requerido por el sistema para la remoción de los contaminantes del agua residual (Tanner y Sukias, 1995).

En los HA se pueden presentar zonas muertas dentro del material de empaque, las cuales implican obstrucciones a las que se enfrenta el agua para poder fluir libremente por los espacios que existen entre las partículas del material de empaque.

Dichas zonas muertas se pueden clasificar, según el contexto, en dos formas:

- 1) Zonas hidráulicas muertas: Son aquellas ocasionadas por canalizaciones o estancamientos de agua, también conocidos como cortos circuitos hidráulicos.
- 2) Zonas biológicas muertas: Cuando el agua se encuentra estancada en el interior del HA y se ve afectado el desarrollo de la biopelícula sobre el medio de soporte; en ese sentido, también se les denomina como “zonas muertas estancadas”.

Un corto circuito hidráulico implica la generación de zonas “muertas”. Algunas de ellas pueden ser identificadas en un experimento de trazado con colorante (zonas con fluido estancado). Las zonas “muertas” se pueden encontrar entre los poros del material de empaque, en las esquinas del lecho y/o en intersticios de la biopelícula donde las corrientes no pueden penetrar (Levenspiel, 1991; Morgan *et al.*, 1997).

La acumulación de sólidos asociados a un mal diseño o a una ineficiente operación en los HA, pueden provocar azolvamientos en las zonas superficiales o en el fondo del sistema, reduciendo la porosidad del medio y el área efectiva de tratamiento. De este modo, se propicia el incremento de la conductividad hidráulica en zonas no preferenciales y el decaimiento en aquéllas que se encuentren con acumulación de sólidos. Este problema provoca que el tiempo de residencia hidráulico se reduzca y con ello disminuya la eficiencia del sistema (Kadlec, 2009).

En las primeras etapas de operación del humedal, la acumulación de sólidos sólo depende de la concentración del influente y de la capacidad de infiltración y sedimentación del medio. Posteriormente, previa aclimatación y establecimiento de las plantas y microorganismos, la depuración de la materia orgánica y de los compuestos asociados al nitrógeno se realiza mediante transformaciones no sólo físicas, sino también químicas y biológicas.

En cuanto a la composición del medio de soporte, la bibliografía recomienda evitar arreglos a base de arena fina y/o arcilla (con diámetros menores a 0.5 mm), debido a que son materiales fácilmente compactables e inestables, limitando así la infiltración y la conductividad hidráulica del sistema. En la Tabla 2 se presentan los tipos de materiales más usados en los HA para la conformación de su lecho, así como su respectivos valores de conductividad hidráulica

Tabla 2. Tipos de materiales comúnmente usados en los HA (Netter, 1990)

Tipo de material	Permeabilidad	Intervalo de Conductividad hidráulica (m^3/m^2s)
Gravilla granular fina	Alta	10^{-3} -1.0
Arena granular fina	Baja	10^{-7} - 10^{-2}
Caliza	Buena	10^{-4} - 10^{-2}
Arenilla	Baja	10^{-8} - 10^{-4}
Cieno	Baja	10^{-9} - 10^{-5}
Arcilla	Baja	10^{-12} - 10^{-9}
Esquisto	Baja	10^{-13} - 10^{-9}

Nota: La permeabilidad de los materiales al igual que la conductividad hidráulica, están en función del tamaño de la partícula.

3.2.2 La vegetación en los Humedales Artificiales

La vegetación en los HA se encuentra representada por diversos grupos de vegetación, tales como, briofitas, pteridofitas, gimnospermas y angiospermas, además de algas y hongos, los cuales cumplen diversas funciones dentro del humedal. Las plantas empleadas en los humedales comúnmente son hidrófitas. Estas plantas proveen de energía a los organismos heterótrofos, como son los animales, las bacterias y los hongos; en especial, estos últimos son los que desarrollan la mayor actividad degradadora de materia orgánica (Brix, 1996).

En los HA la clasificación de la vegetación se realiza base en sus hábito de crecimiento con respecto al agua y no con base en su clasificación taxonómica, para ello se emplea el termino hidrófitas, las cuales comprenden las plantas macrofitas vasculares que presentan tejidos fácilmente visibles (Kadlec, 2009), principalmente angiospermas de vida acuática, o bien que crecen en las zonas marginales de los cuerpos de agua (Fig. 3), bajo estos términos las macrófitas se agrupa por su hábito de crecimiento con respecto al agua dentro de los humedales y pueden separarse en los siguientes tipos:

- Hidrófitas emergentes: habitan en suelos anegados permanentes o temporalmente; en general son plantas perennes, con órganos reproductores aéreos.
- Hidrófitas enraizadas de hojas flotantes: son principalmente angiospermas; se ubican sobre suelos anegados; los órganos reproductores son flotantes o aéreos.
- Hidrófitas sumergidas: comprenden algunos helechos, numerosos musgos, carofitas y numerosas angiospermas: Se encuentran en toda la zona fótica; los órganos reproductores son aéreos, flotantes o sumergidos.
- Hidrófitas de flotación libre: presentan formas muy diversas desde plantas de gran tamaño con roseta de hojas aéreas y/o flotantes; cuentan con raíces sumergidas bien desarrolladas. Son pequeñas plantas que flotan en la superficie, con muy pocas raíces o ninguna. Los órganos reproductores son flotantes o aéreos, raramente sumergidos.

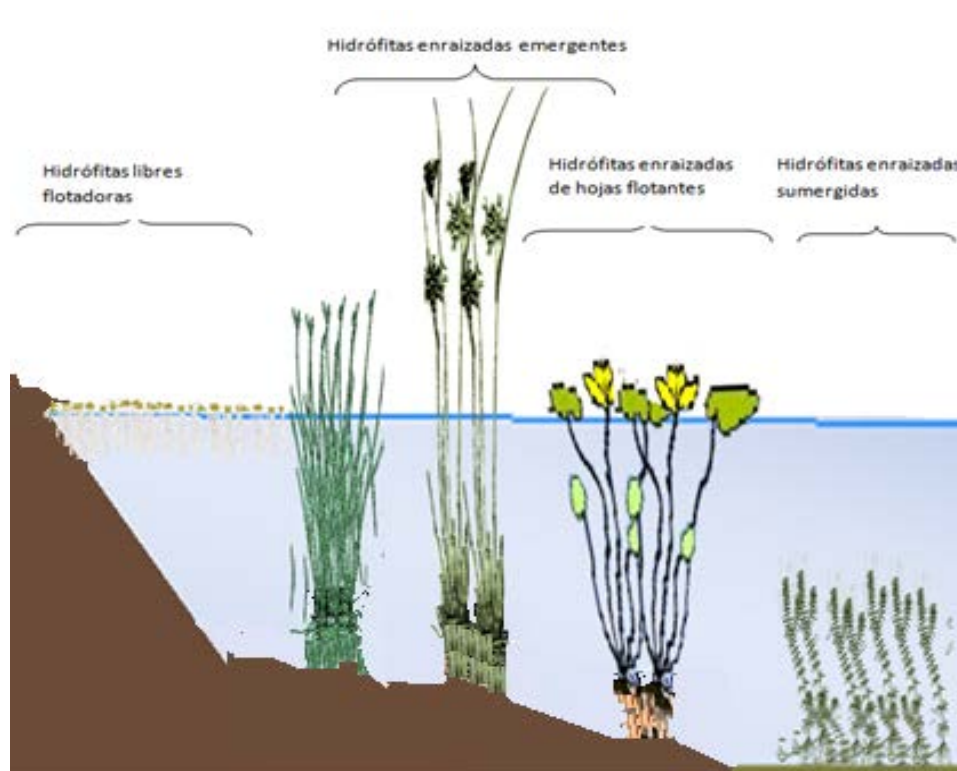


Figura 3. Tipos de vegetación de acuerdo a su forma de vida

La vegetación desempeña un papel muy importante en los sistemas de HA, ya que es capaz de absorber sustancias nutritivas disueltas en el agua, fijar compuestos nitrogenados y fosforados para integrarlos en su biomasa, contribuir con los procesos evotranspiración, resistir el flujo y retener partículas, aportar oxígeno en el agua en inclusive proveer hábitat para diversos organismos (Kadlec, 2009, Hsu, 2011). Dentro de las especies empleadas existe una gran variedad macrofitas, sin embargo el tipo de plantas que se emplea en los HA está en función de diversos factores tales como: tolerancia a los ambientes acuáticos (inundados), tolerancia a concentraciones altas de sedimentos y partículas de compuestos nitrogenados y fosforados y resistencia a la desecación. Las principales plantas que se utilizan en los HA de flujo subsuperficial son *Arundo donax* "Caña de castilla", *Typha dominguensis* "Espadaña", *Thypha Latifolia* "Tule", *Schoenoplectus californicus* "Junco", *Juncus effusus* "Junquillo" (Vymazal, 2009). Las adaptaciones de los organismos vegetales al HA son diversas, tales como un tallo largo y de tipo hipertrófico, el cual propicia que el oxígeno se difunda a hacia la zona radicular y se permita tener zonas bajo condiciones aerobias cerca de las raíces. La difusión del oxígeno por parte de las raíces de las plantas hacia los alrededores en el lecho filtrante se ubica entre 0.30 m hasta 0.60 m (Adcock y Gaaf, 1994). En términos generales, las raíces y los tallos presentan tejido con aerénquima, mientras que las raíces son de tipo suculentas y pueden cambiar la dirección de crecimiento (Tanner, 2002). En la Tabla 3, se presentan las principales adaptaciones que hacen posible la presencia de este tipo de plantas en los sistemas de HA.

Tabla 3. Principales adaptaciones de las macrófitas a los ambientes acuáticos

Respuesta	Referencia
Abscisión floral, frutal y de follaje	Hook (1968), Hook <i>et al.</i> (1971)
Epinastia de las hojas y del peciolo	Kramer (1951), Jackson (1955); Wample y Reid(1975), Kawase (1981)
Reorientación del peciolo	Kramer (1951)
Cierre de estomas	Pereira y Kozlowski (1977); Tang y Kozlowski (1982)
Regulación de la transpiración	Regehr <i>et al.</i> (1975)
Reducción de la Fotosíntesis	Regehr <i>et al.</i> (1975)
Hojas engrosadas	Heinicke (1932); Lindsey <i>et al.</i> (1961); Hejný y Hroudová (1987); Wilting Bergman (1920); Kramer y Jackson (1954),
Reducción en el tamaño de las hojas en épocas de estiaje o poco agua	Heinicke (1932), Lindsey <i>et al.</i> (1961), Hejný y Hroudová (1987); Wilting Bergman 1920); Kramer y Jackson (1954)
Aumento en el tamaño de las hojas en época de lluvias	Hejný y Hroudová (1987)
Segmentación laminar de las hojas	Hejný y Hroudová (1987)
Frutos pequeños	Heinicke <i>et al.</i> (1940)
Regulación del crecimiento apical	Begman (1920); McDermot (1954); Hosner (1960)
Raíces adventicias	Wenkert <i>et al.</i> (1980)
Incremento en diámetro del rizoma	Wenkert, (1981)
Acumulación de productos finales de la reparación anaerobia	Hook <i>et al.</i> (1983)
Baja producción de etanol	Crawford (1978); Barclay y Crawford (1982)
Incremento en la permeabilidad de la membrana plasmática y pérdida discriminatoria y absorción de nutrientes	Crawford (1978); Barclay y Crawford (1982)
Decremento en el desarrollo de ectomicorrizas	Malajczuk y Lamont (1981)
Dominancia de anabiosis en las partes subterráneas de las plantas	Hejný y Hroudová (1987)
Transporte de oxígeno	Raalte (1940); Armstron (1979)
desarrollo de aerénquima	McPherson (1939); Sifton (1945); deWit (1978),

Modificada de Vimazal (2008)

3.2.3 Los microorganismos en los Humedales Artificiales

Los microorganismos tienen un papel fundamental en la transformación de los contaminantes. En los HA se pueden encontrar bacterias, levaduras, hongos, protozoos y algas. La actividad de todos ellos es la principal responsable en la transformación de una gran cantidad de C y N orgánico, así como de sustancias inorgánicas (Truu, 2009, Wetzel, 1993). La comunidad microbiana en los humedales artificiales está constituida principalmente por poblaciones de microorganismos, autóctonos o propios del sistema y los alóctonos provenientes del influente al sistema (Faulter, 2009). De manera particular, los microorganismos autóctonos están adaptados metabólicamente a las condiciones que imperan en el HA, regulando su actividad de tal forma, que hace posible la supervivencia y desarrollo estos organismos dando como resultado los procesos de depuración. Por otra parte, los microorganismos alóctonos, los cuales incluyen organismos patógenos contenidos en aguas residuales, por lo general, no logran sobrevivir debido a las condiciones que prevalecen en el sistema (Vymazal, 2005). En los HA son muy marcadas las distintas zonas de actividad microbiana, ya que se pueden encontrar desde condiciones aerobias en zonas cercanas a la superficie y próximas a las raíces de las plantas, mientras que en el fondo se mantienen condiciones netamente anaerobias (Krasnits, 2009). No obstante, es factible encontrar bacterias anaerobias facultativas, las cuales son capaces de actuar bajo ambas condiciones en respuesta a posibles cambios operativos y ambientales en el sistema. En este sentido, las poblaciones microbianas se adecuan relativamente rápido a los cambios dentro del agua con la cual se alimenta al sistema. En general, las poblaciones de microorganismos pueden ajustarse rápidamente cuando están presentes los sustratos y la energía necesaria para su desarrollo. Cuando las condiciones ambientales no son favorables, muchos microorganismos llegan a inactivarse y continúan así por largo tiempo (Milton, 1993). Por ello, la biomasa microbiana en su fracción heterótrofa o autótrofa, es una buena indicadora para evaluar el proceso de degradación en los HA, ya que puede ser limitada o estimulada por la disponibilidad de sustrato. Si las fuentes son ricas en sustancias orgánicas biodegradables, se favorecerá la presencia de microorganismos heterótrofos; por el contrario, si existen fuentes de material inorgánico (C, N y P) se

alentará la presencia de organismos autótrofos en el HA (Kozub y Liehr, 1999; Paredes *et al.*, 2007; Sirivedhin y Gris, 2006; Bialowieck, 2011). Ciertos procesos microbianos son extremadamente sensibles al pH de las aguas residuales. Un pH óptimo para la nitrificación se ubica entre 7 y 8 (Paredes *et al.*, 2007). La temperatura desempeña también un papel regulador en la activación y desactivación de diversos procesos microbianos en los HA tal como suceda con la nitrificación que se inhibe generalmente a los 5°C (Sirivedhin, 2006). Cabe resaltar que los organismos encargados de oxidar el amonio, crecen con mayor rapidez a una temperatura de 15°C; mientras que a temperaturas de 25°C se favorecen los organismos oxidadores de nitritos (Sirivedhin, 2006). En este sentido, los factores ambientales determinan en gran medida la dinámica de las poblaciones bacterianas, otro ejemplo de esto es la diversidad microbiana a lo largo del lecho filtrante (Tabla 4), la cual decrece en forma proporcional a la profundidad del lecho filtrante (Truu, 2009).

Tabla 4. Biomasa microbiana, abundancia y actividad en diferentes tipos de HA.

Parámetro	*HA horizontal flujo subsuperficial	**HA vertical flujo subsuperficial	***HA flujo superficial	Referencia
Biomasa C	0.11-3.70 mg C g ⁻¹ d ⁻¹	0.022-1.69 mg C g ⁻¹ d ⁻¹	0.019-0.04 mg C g ⁻¹ d ⁻¹	*Nguyen (2000),*Nguyen (2001),*Nurk <i>et al.</i> (2005), **Tietz <i>et al.</i> (2007), ***Tao <i>et al</i> (2007 ^a), **Sleytr <i>et al</i> (2007)
Biomasa N	0.012-0.34 mg N g ⁻¹ d ⁻¹	0.018-0.3 mg N g ⁻¹ d ⁻¹		*Decamp and Warren (2001), ** Sleytr <i>et al.</i> (2007),
Biomasa C:N	6.4-9.2	5.5-6.6		Nguyen (2000),*Nguyen (2001),*Nurk <i>et al.</i> (2005), **Tietz <i>et al.</i> (2007), ***Tao <i>et al</i> (2007 ^a), **Sleytr <i>et al</i> (2007)
Conteos totales	2.5 x10 ⁶ -11 x 10 ⁶ células/mL	1.7 x10 ⁶ -1.2 x 10 ⁸ células/mL	1.0 x10 ⁵ -5.2 x 10 ⁷ células/mL	Tao <i>et al.</i> (2007 ^b) *Kern (2003),** Bahgat <i>et al</i> (1999)
Amonificadoras	3.2 x 10 ⁷ -1.2 x 10 ⁹ NMP g ⁻¹	10 x 10 ⁵ - NMP g ⁻¹		*Kern (2003),** Bahgat <i>et al</i> (1999)
Nitrificadoras	5.6 x10 ³ -2.4 x10 ⁵ NMP g ⁻¹	10 ⁴ -10 ⁹ NMP g ⁻¹		*Kern (2003),** Bahgat <i>et al</i> (1999)

Cont. de la Tabla 4. Biomasa microbiana, abundancia y actividad en diferentes tipos de HA.

Parámetro	*HA horizontal flujo subsuperficial	**HA vertical flujo subsuperficial	***HA horizontal flujo superficial	Referencia
Denitrificadoras	$1.2 \times 10^1 - 2.5 \times 10^5$ NMP g ⁻¹			*Kern (2003),**
Respiración del crecimiento de heterótrofas	$0.8 - 62.5$ µg CO ₂ g ⁻¹ d ⁻¹	0	$0.037 - 0.099$ µg C mL ⁻¹ h ⁻¹	**Tietz <i>et al.</i> (2007), ***Tao <i>et al.</i> (2007 ^a),
Potencial de nitrificación	0.6013 ± 0.4828 µ N dm ⁻¹ día ⁻¹			Nguyen (2000),*Nguyen (2001),*Nurk <i>et al.</i> (2005),

3.2.4 Bacterias nitrificantes

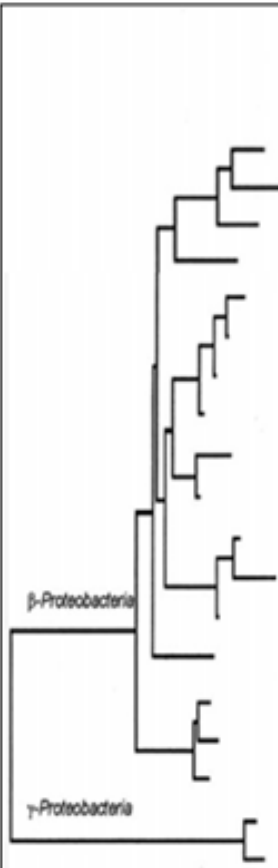
Tradicionalmente las bacterias nitrificantes se han clasificado como quimiolitótrofos y se encontraban agrupadas dentro de una misma familia llamada *Nitrobacteraceae*. Sin embargo, las investigaciones filogenéticas ponen en evidencia que existe una gran cantidad de grupos (Figura 4) como los oxidadores de amonio y los oxidadores de nitritos (Koops, 2001).

Oxidadores quimiolitótrofos de amonio

En la actualidad existen dos grupos filogenéticamente distintos, un grupo se encuentra dentro de las Proteobacterias de la subclase γ. El único género de este grupo es *Nitrosococcus*, el cual está representado por dos especies descritas, *Nitrosococcus oceani* y *Nitrosococcus halophilus* (Koops, 2001). El segundo grupo pertenece a Proteobacterias de la subclase β, dentro de este conjunto existen dos géneros, *Nitrosomonas* y *Nitrospira* (Koops, 2001). El género *Nitrospira* cuenta con 3 especies: *Nitrospira briensis*, *Nitrosovibrio tenuis*, *Nitrosolobus multiformis*. Mientras que *Nitrosomonas* cuenta con 11 especies: *Nitrosomonas europaea*, *Nitrosomonas eutropha*, *Nitrosomonas halophila*, *Nitrosomonas ureae*, *Nitrosomonas oligotropha*, *Nitrosomonas marina*, *Nitrosomonas aestuarii*, *Nitrosomonas communis*, *Nitrosomonas nitosa*, *Nitrosomonas cryotolerans* y *Nitrosococcus mobilis*.

Las especies del género de *Nitrospira* están estrechamente relacionadas entre sí, mientras que el género *Nitrosomonas* revela que por lo menos existen 5 linajes distintos con un total de 14 especies descritas para ambos géneros.

Todas las especies son capaces de utilizar amoníaco como fuente de energía, sin embargo algunas especies de la subclase Proteobacteria β (Koops, 1991) pueden emplear la urea como fuente de amonio (Figura 4). La afinidad al sustrato (K_s) difiere significativamente entre las especies reflejando las diferencias entre los grupos, (Pommerening y Koops, 1996). La oxidación del amoniaco (NH_3^+) a hidroxilamina (NH_2OH) es catalizada por la enzima amonio monooxigenasa (AMO) y los genes que codifican para esta enzima son *amoA*, *amoB* y *amoC*. La hidroxilamina (NH_2OH) a Nitrito (NO_2^-) es llevada a cabo por la enzima Hidroxilamina óxidoreductasa (HAO), la cual es sintetizada por el gen *hao* (Bellucci, 2011).



Especie	Parámetros ecofisiológicos		
	Requerimientos de sales	Actividad ureasa	Tamaño
<i>Nitrosomonas europaea</i> <i>Nitrosomonas eutropha</i> <i>Nitrosomonas halophila</i> <i>Nitrosomonas mobilis</i>	Halotolerantes o moderadamente halofílicas	-	30-61 μm
<i>Nitrosomonas communis</i> <i>Nitrosomonas sp I</i> <i>Nitrosomonas sp II</i>	No requieren sales	-	14-43 μm
<i>Nitrosomonas nitrosa</i>	No requieren sales	+	19-46 μm
<i>Nitrosomonas ureae</i> <i>Nitrosomonas oligotropha</i>	Halofílicas obligadas	+	1.9-4.2 μm
<i>Nitrosomonas marina</i> <i>Nitrosomonas sp III</i> <i>Nitrosomonas aestuarii</i>	No requieren sales	+	50-52 μm
<i>Nitrosomonas cryotolerans</i>	Halofílicas obligadas	+	42-59 μm
<i>Nitrosolobus multiformis</i> <i>Nitrosovibrio tenuis</i> <i>Nitrospira sp I</i>	No requieren sales	+/-	
<i>Nitrosococcus oceanii</i> <i>Nitrosococcus halophilus</i>	Halofílicas obligadas	+	

Figura 4. Clasificación de bacterias nitrificantes (Koops, 1991)

Oxidadores quimiolitótrofos de nitritos

Se conocen cuatro grupos filogenéticamente distintos de bacterias oxidadoras de nitrito. El grupo principal, que pertenece a las Proteobacterias de la subclase α , el cual está representado por un sólo género, *Nitrobacter*. El cual consta de tres especies, *Nitrobacter winogradskyi*, *Nitrobacter hamburgensis*, *Nitrobacter vulgris*. Los miembros del genero *Nitrobacter* son capaces de utilizar fuentes orgánicas de energía junto al nitrito como principal fuente. Las bacterias nitrito-oxidantes se consideran litótrofos obligados, los valores de K_s del sistema de nitrito oxidantes apuntan a ser distintos entre los grupos según lo indicado por los estudios fisiológicos (Koops, 1991). Otro género conocido de bacterias oxidadoras de nitritos es *Nitrospira*, el cual consta de 2 especies: *Nitrococcus mobilis* y *Nitrospira marina*, los cuales son los únicos representantes marinos de bacterias oxidadoras de nitritos y son halófilas obligadas. La fase de la reacción de oxidación de nitrito (NO_2^-) a nitrato (NO_3^-) es catalizada por la nitrito óxido reductasa (NXR), la cual es codificada por los genes *nxA* y *nxB* (Starkenbug *et al.*, 2006). Esta última fase es llevada a cabo por bacterias oxidantes de nitritos denominadas NOB (nitrite-oxidizing bacteria) (Arp y Bottomley, 2006).

3.2.5 El Proceso de Nitrificación en Humedales Artificiales

La remoción de compuestos nitrogenados constituye un problema que no ha sido suficientemente abordado en los HA. Los porcentajes de remoción obtenidos en los sistemas actualmente construidos no superan el 50% (Bayley *et al.*, 2003; Hibiya *et al.*, 2003; Kuschik *et al.*, 2003; Pauwels y Talbo, 2004; Ramírez, 1998). Los principales mecanismos de transformación de compuestos nitrogenados en los HA, en orden de importancia, son la nitrificación, seguida de la desnitrificación microbológica, la adsorción-fijación por parte de las plantas y la volatilización del nitrógeno amoniacal hacia la atmósfera (Figura 5) (Gerke *et al.*, 2001; Mayo y Bigambo, 2005). El efecto en las plantas ocurre preferentemente en la zona radicular y en menor medida, en el tallo (Braskerud, 2002; Sasikala *et al.*, 2009, Stein *et al.*, 2003) pueden retener hasta un 30 % del Nitrógeno total (N_T) en HA donde se han empleado las plantas *Phragmites australis*, *Typha latifolia* y *Typha orientalis* (Browning y Greenway, 2003; Headley *et al.*, 2001; Sasikala *et al.*, 2009).

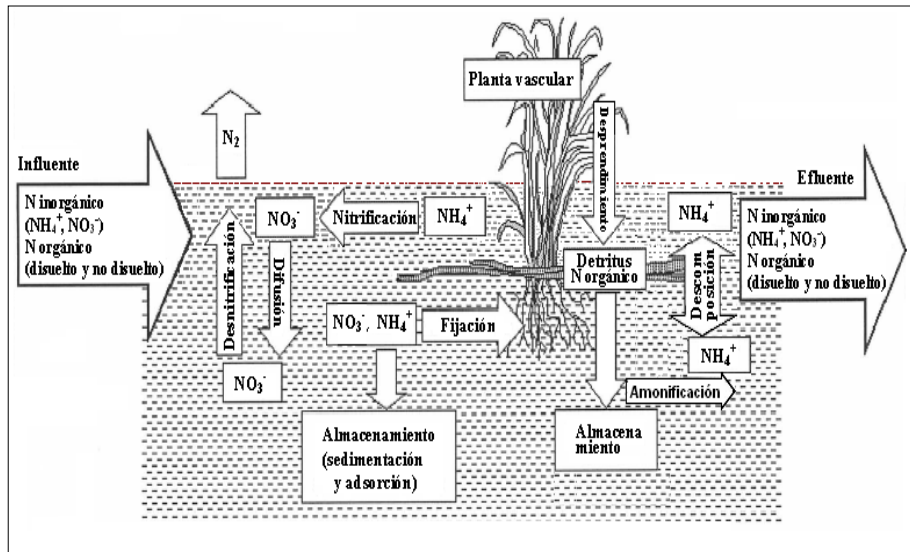


Figura 5. Ciclo del N en un humedal artificial (HA)

Es importante destacar que el principal factor para que se lleve a cabo la nitrificación es que exista la suficiente disponibilidad de oxígeno en el medio para que los microorganismos metabolicen (Fig. 6). Kadlec (2009), Tanner y Kadlec (2003) y Stein *et al.* (2003) señalan que el ambiente que prevalece en los HAFH es el de tipo anaerobio, debido a que los sistemas, por lo general se encuentran inundados y a que el influente por su grado de contaminación, contiene bajas disponibilidades de oxígeno. De los distintos tipos de HA, se considera que los de flujo vertical facilitan una mayor oxigenación del medio; como resultado de que, al momento de la irrigación al lecho, el influente se encuentra en contacto con el aire atmosférico; además de que esta clase de HA normalmente no se encuentra inundado (Gervin y Brix, 2001; Mander *et al.*, 2003). Beavers y Tully (2005) y Arheimer y Wittgren (2002) mencionan que los tres principales fenómenos que permiten el transporte de oxígeno al medio de soporte son la convección, la difusión y el aporte por medio de las raíces y rizomas de las plantas, mismos que también es considerada como otra forma combinada de convección-difusión. Particularmente, la convección es producida cuando el sistema es alimentado de manera intermitente. Si el agua que originalmente se encontraba dentro del HA abandona rápidamente al lecho por la parte inferior, entonces se provoca un gradiente de presión entre la zona interna y la atmósfera circundante superficial del

sistema. Este hecho genera un fenómeno de succión de aire fresco hacia el interior del medio de soporte. Varios autores señalan que la razón de carga hidráulica (RCH) es la variable de mayor relevancia en el fenómeno de convección, y que existe entre aquella y el volumen de oxígeno que se puede transferir al medio una relación directamente proporcional (Rousseau *et al.*, 2004; Tanner y Kadlec, 2003). Lo anterior supone que mientras mayor sea la RCH, mayor será la tasa de oxigenación al sistema y que, por lo tanto, el volumen de aire que ingrese será igual al volumen de efluente líquido que se desaloje. Tal afirmación es cierta siempre y cuando la columna de agua se encuentre libre de barreras físicas. No obstante, dentro del HA, el medio de soporte y la densidad de la zona radicular imponen una barrera para que el aire se transporte desde la superficie hasta la base del lecho. Asimismo, dicho volumen o espacio poroso del HA no será constante, ya que sufrirá una reducción gradual a lo largo del tiempo, por efecto del azolvamiento de los contaminantes no transformables que ingresen a él.

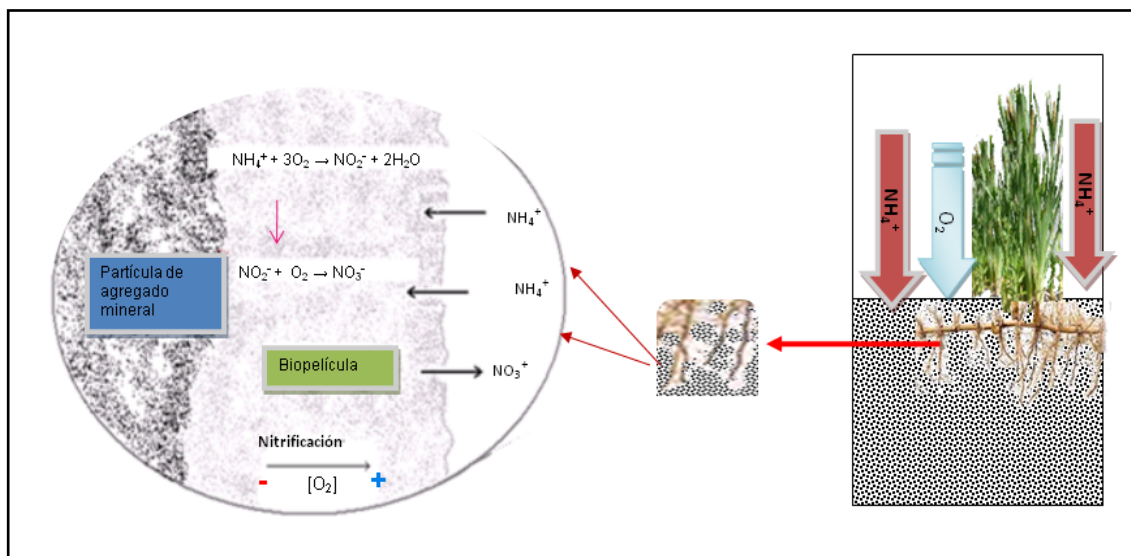


Figura 6. Proceso de nitrificación en un humedal artificial (HA).

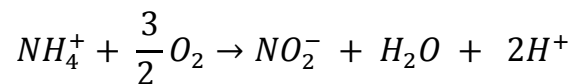
Específicamente, los diferentes compuestos nitrogenados en el agua residual, son oxidados microbiológicamente tanto en condiciones aerobias como anóxicas, convirtiéndose en nitrógeno amoniacal. A este proceso se le denomina mineralización:



Posteriormente, el NH_4^+ es eliminado por diferentes medios: fijación como biomasa en las plantas, absorción física del suelo y volatilización atmosférica. En relación con la conversión del amonio a gas amoníaco (NH_3) y su posterior volatilización, esta sólo es posible si existen condiciones estables de pH (7.5-8.6 unidades) (Drizo y Frost, 1996).

Con respecto a la nitrificación, dos grupos de bacterias son las encargadas de realizar esta actividad (las *Nitrosomonas* y las *Nitrobacter*) mediante dos etapas. En la primera, el NH_4^+ es oxidado a NO_2^- por efecto de las *Nitrosomonas*, según la siguiente reacción:

Ecuación 1. Reacción de la nitritación



Tipo de reacción	ΔG° (kcal/mol)	ΔH° (kcal/mol)	ΔS° (kcal/mol)
Nitrosificación	-65	-22	0.14

Donde:

NH_4^+ Nitrógeno amoniacal

O_2 Oxígeno

NO_2^- nitritos

H_2O Agua

H^+ Ión Hidrógeno

ΔG° ...Energía libre de Gibbs

ΔH° Etalpía de la reacción

ΔS° Entropía de la reacción

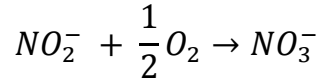
Los valores de ΔS° se obtienen a partir de la ecuación unificada de la primera y segunda ley de la termodinámica $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$

El superíndice "0", significa que los valores son calculados a condiciones estándar de temperatura y presión (CSTP): 298 °k y 1 atm

Significado de ΔG° . La condición de equilibrio es $\Delta G^\circ = 0$, la condición de espontaneidad es $\Delta G^\circ < 0$, el proceso no es espontáneo cuando: $\Delta G^\circ > 0$

En la segunda etapa el NO_2^- es convertido a NO_3^- por la oxidación de las *Nitrobacter* mediante la reacción siguiente:

Ecuación 2. Reacción de la nitratación



Tipo de reacción	ΔG° (kcal/mol)	ΔH° (kcal/mol)	ΔS° (kcal/mol)
Nitratación	-19	-13	0.02

Donde:

NO_2^- nitritos

O_2 Oxígeno

NO_3^- nitratos

ΔG° ...Energía libre de Gibbs

ΔH° Etalpía de la reacción

ΔS° Entropía de la reacción

Los valores de ΔS° se obtienen a partir de la ecuación unificada de la primera y segunda ley de la termodinámica $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$

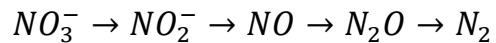
El superíndice "0", significa que los valores son calculados a condiciones estándar de temperatura y presión (CSTP): 298 °k y 1 atm

Significado de ΔG° . La condición de equilibrio es $\Delta G^\circ = 0$, la condición de espontaneidad es $\Delta G^\circ < 0$, el proceso no es espontáneo cuando: $\Delta G^\circ > 0$

El factor fundamental que provoca la nitrificación es la cantidad de oxígeno disuelto (O.D.) en el lecho. En los humedales horizontales la concentración de O.D. es normalmente baja, en comparación con los de tipo vertical; por lo tanto la actividad nitrificante disminuye y se hace más lenta. Para alcanzar un nivel aceptable en la remoción de compuestos nitrogenados, la práctica común es la de incrementar el tiempo de residencia hidráulico en todo el sistema (Morris y Hebert, 1996). En cuanto al efecto de la temperatura, la nitrificación se ve altamente limitada cuando existen valores menores a los 10°C.

Con respecto a la desnitrificación, en la que el NO_3^- es convertido a óxido y gas nitrógeno, ésta normalmente se realiza bajo condiciones anóxicas en presencia de bacterias heterótrofas (*Achromobacter*, *Aereobacter*, *Alcaligenes* y *Pseudomonas*, entre otras). Este proceso se efectúa en varias etapas, en un intervalo de pH de 7-8 unidades y a temperatura superior a los 5°C , según la siguiente secuencia de reacciones:

Ecuación 3. Reacción de la desnitrificación



Donde

NO_3^- nitratos

NO_2^- nitritos

NO óxido nítrico

N_2O óxido nitroso

N_2 Nitrógeno molecular

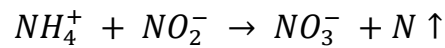
ANAMMOX

El proceso de oxidación en condiciones anóxicas del NH_4^+ es denominado ANAMMOX (anaerobic ammonium oxidation), el cual se lleva a cabo por un grupo de bacterias las cuales convierten el amonio a nitrógeno gaseoso, con el NO_2^- como aceptor de electrones en condiciones anóxicas. El grupo de bacterias que realizan este proceso se encuentran dentro del orden Planctomycetes. Los géneros descritos son *Candidatus*, *Brocadia*, *Kuenenia*, *Scalindua*, *Anammoxoglobus*, *Jettenia* y sólo el género *Candidatus* en ecosistemas marinos.

Se ha reportado que el proceso de Anammox es un proceso irreversible y puede ser inhibido por concentraciones mayores a 14 mg/L de NO_2^- (Egli, 2001). Sin embargo, no es afectado por altas concentraciones de NH_4^+ (Abma *et al.*, 2007).

La ecuación que describe el proceso de Anammox es la siguiente:

Ecuación 4. Reacción del proceso de Anammox



Donde:

NH_4^+ Nitrógeno amoniacal

NO_3^- nitratos

NO_2^- nitritos

$N \uparrow$ Nitrógeno molecular

A través de las interacciones biogeoquímicas antes mencionadas, las cuales se presentan en diferentes ambientes dentro del lecho filtrantes en los HA (Figura 7), es posible la transformación de compuestos nitrogenados presentes en el agua residual, contribuyendo a mitigar las concentraciones vertidas a cuerpos de agua naturales y artificiales que impactan de forma negativa en el ecosistema, permitiendo así mejorar la calidad de agua para su posible uso en actividades de conservación, uso agrícola y servicios recreativos.

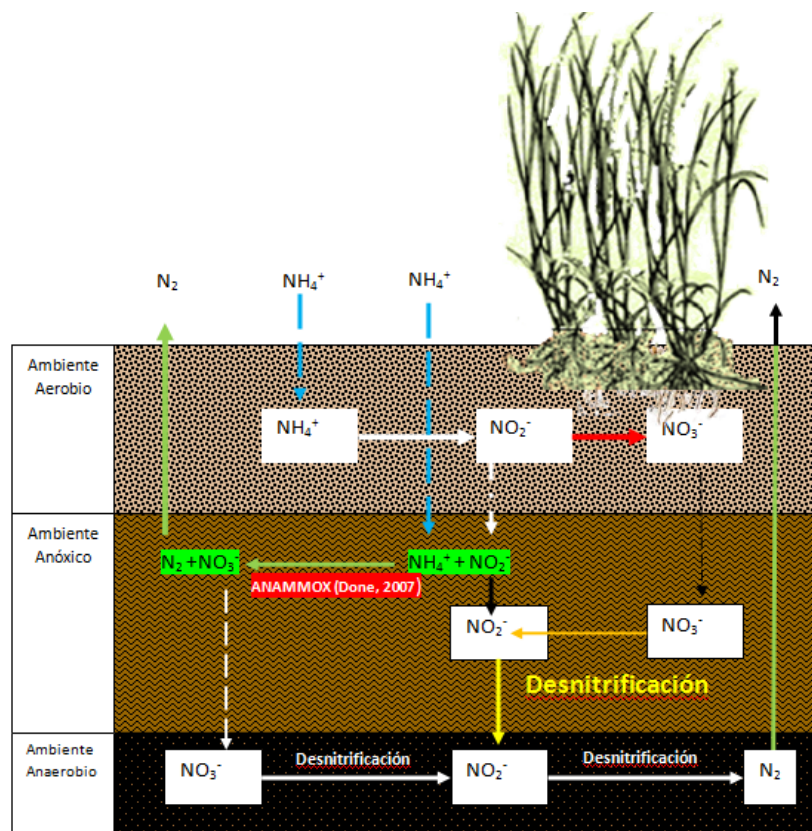


Figura 7. Ciclo del nitrógeno en un humedal artificial (HA).

3.3 Modelos Estadísticos

3.3.1 Fundamentos estadísticos

Existen diversas herramientas estadísticas para el tratamiento y comprensión de los datos experimentales, el empleo de estas, tales como los Modelos Lineales Generalizados o GLM (por sus siglas en inglés), permite comprender de forma integral los efectos directos así como las interacciones sobre un fenómeno a estudiar.

Los GLM, son un concepto introducido formalmente por Nelder y Wedderburn (1972) y McCullagh y Nelder (1989). Son en esencia una extensión de la regresión lineal simple, es decir, el GLM provee una estimación de una variable de respuesta, y , condicionada sobre una función lineal de valores de x , para uno o varios predictores que pueden ser continuos o discretos, teniendo tres importantes propiedades:

- Estructura del error
- El predictor lineal
- La función de enlace

3.3.2 Estructura del error

Existen diversos tipos de distribuciones de error que puede manejar el GLM (Tabla 5). Para determinar el ajuste que toma un modelo GLM (predicción), se evalúa el predictor lineal para cada valor de las variables explicatorias y se aplica el recíproco de la función de enlace, con el objetivo de regresar a la escala original de las mediciones de la variable de respuesta.

Tabla 5. Tipos de distribución de error que maneja el GLM

Tipos de distribución de los errores	Uso
Normal	Análisis de datos paramétricos
Poisson	Conteo de datos
Binomial	Datos sobre proporciones
Gama	En datos positivos que muestran un coeficiente de variación constante
Exponencial	Análisis de supervivencia
Inversa normal	Análisis de datos donde existe mayor número de valores grandes
Cuasi	Datos con correlaciones probabilísticas

3.3.3 Predictor lineal

La estructura del modelo relaciona cada valor observado y , con un valor predicho, el valor predicho es obtenido por la transformación del valor emergido del predictor lineal. El predictor lineal, η (eta), es una suma lineal de los efectos de una o más variables explicatorias x_j

Ecuación 5 Predictor lineal del GLM

$$\eta_i = \beta_0 + \sum_{j=1}^P \beta_j x_{ij} + \varepsilon_i$$

Donde la x toma i valores de diferentes variables explicatorias o predictores P , β_0 β_J son usualmente parámetros a estimar por el modelo y ε representa el término de error aleatorio. El lado derecho de la ecuación es llamada la estructura lineal donde cada sumando representa un término.

Existen tres tipos de términos fundamentales en el GLM:

- El Intercepto.- Denotado en el modelo por β_0
- Efectos Directos.-Son los términos de los predictores individuales relacionados con diferencia de intercepto. En el ejemplo de la Figura 8, la línea de cada predictor puede tener diferente intercepto manteniendo una pendiente idéntica.
- Interacciones.-Son condicionamientos sobre la variable de respuesta entre dos o más variables individuales. Los términos de interacción se asocian con diferencias de pendiente (coeficiente), como se ilustra en el ejemplo de la Figura 9.

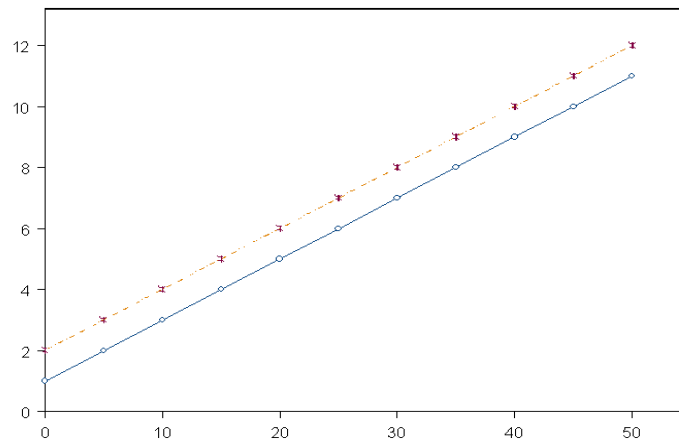


Figura 8. Ejemplo de efectos directos sin interacción

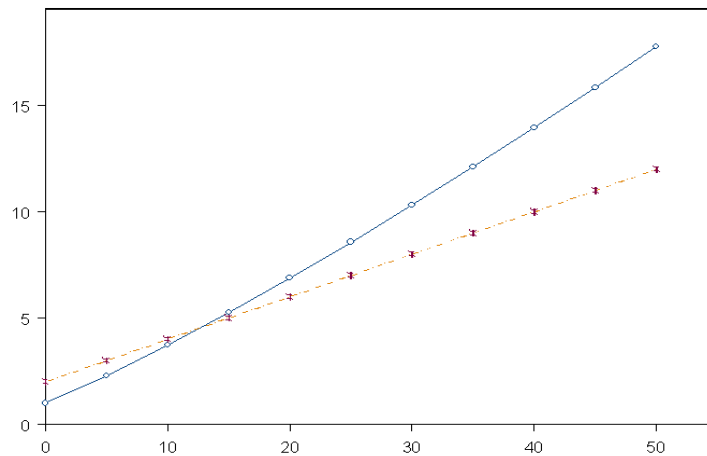


Figura 9. Ejemplo de efectos directos con interacción.

3.3.4 Función de enlace

La función de enlace o link es una función que relaciona los valores de la media de y con el predictor lineal, es decir, articula componentes estocásticos del modelo. Dependiendo del tipo de error de la variable de respuesta, se ocupa una función de enlace distinta, en la siguiente tabla se muestra el tipo de link dependiendo el tipo de familia a la que pertenezca la distribución de error.

Tabla 6. Tipos de función de enlace (link) ocupados según la naturaleza de la distribución.

Distribución	Familia	Link	Varianza
Normal/Gausiana	<i>Gausiana</i>	μ	1
Binomial	<i>Binomial</i>	$\ln\left(\frac{\mu}{1-\mu}\right)$	$\frac{\mu(1-\mu)}{n}$
Poisson	<i>Poisson</i>	$\ln(\mu)$	μ
Gama	<i>Gama</i>	$1/\mu$	μ^2
Normal	<i>Inversa</i>	$1/\mu^2$	μ^3
Inversa/Gausiana			
Cuasi	<i>Cuasi</i>	$G(\mu)$	$V(\mu)$

Para determinar el ajuste que toma un modelo GLM (predicción), se evalúa el predictor lineal para cada valor de las variables explicatorias y se aplica el recíproco de la función de enlace, con el objetivo de regresar a la escala original de las mediciones de la variable de respuesta.

3.4 Análisis de GLM

El método que se ha empleado tradicionalmente para la regresión lineal es el de mínimos cuadrados, el cual produce estimaciones de máxima verosimilitud de los parámetros, pero solamente en el caso de respuestas que tienen un tipo de error normal, asumiendo como link la identidad. Sin embargo, para otros tipos de estructura de error y diferente tipo de link, la regresión de mínimos cuadrados resulta inadecuada,

por lo que la estimación por máxima verosimilitud se toma como mejor procedimiento para los Modelos Lineales Generalizados.

3.4.1 Máxima verosimilitud

El concepto de máxima verosimilitud se utiliza como un procedimiento para estimar los coeficientes de un modelo de regresión, o bien, para estimar los parámetros de una distribución de probabilidad. El método de máxima verosimilitud permite elegir como valor estimado del parámetro, aquél que tiene mayor “probabilidad” de ocurrir según los datos observados, siempre suponiendo que es correcto el modelo matemático postulado (Hastié, 1990). El análisis y simplificación de los GLM es una extensión de estos métodos, es decir, a través de un Análisis de Devianza (la devianza está definida por el negativo del doble del logaritmo de la función de verosimilitud y es equivalente a la suma de cuadrados del error en regresión (Crawley, 2003)). De esta forma es como se compara un modelo saturado, en el cual hay tantos parámetros como observaciones, contra un modelo teórico. El tamaño de la discrepancia entre el modelo y los datos, es una medida de inadecuación del modelo. Una pequeña discrepancia puede ser tolerable pero una grande no lo es, porque el modelo saturado no es dependiente de los parámetros del modelo teórico. En ese sentido, la medida de su discrepancia es estimada por una χ^2 con grados de libertad igual a la diferencia de parámetros entre modelos, con el propósito de entender cómo es la respuesta en función de los efectos principales y sus interacciones. La decisión de discriminar o aceptar algún término está en función del nivel de significancia de la hipótesis nula; es decir, un valor de probabilidad mayor a 0.05, dará como válida la hipótesis nula, y uno menor o igual a 0.05 aceptará la hipótesis alterna. Esta prueba se estará estimando para un estudio al 95% ($\alpha=0.05$) de confianza.

3.5 Modelos de Simulación

3.5.1 Fundamentos de modelación

Un modelo es una abstracción de la realidad, es una descripción formal de los elementos más esenciales un problema, por lo tanto un modelo es una descripción formal del sistema de interés, el uso de modelos matemáticos permite fragmentar complejos sistemas en sus diferentes componentes, haciendo más accesible su comprensión (Wainwright, 2004). Existen diferentes tipos de modelos por su naturaleza explicativa pueden ser físicos o abstractos, los físicos son representaciones a pequeña escala de un problema, mientras que los abstractos se dirigen hacia aspectos verbales. Los modelos pueden ser estáticos o dinámicos, es decir el modelo estático sólo refleja un instante del problema a estudiar, mientras que el modelo dinámico cambia y se adecua en función de los cambios que sufren sus variables de respuesta, existen también los modelos empíricos y los explicativos. El objetivo de los modelos empíricos es predecir y no explicar, como ejemplo es la medición de la respuesta de un parámetro en función de una sola variable, mientras que la medición de una respuesta en función de muchas variables llevará hacia un modelo con correlaciones e interacciones así como efectos directos, los cuales modifican la variable de respuesta, por lo tanto nos permite tener una mejor perspectiva de cómo interactúan los componentes del sistema y el por qué se ve afectada la variable de respuesta (Grant, 2001). El planteamiento de un modelo está en virtud del entendimiento e integración del sistema a estudiar. La Fig. 10 (Pág. 46), proporciona metodologías para resolver el planteamiento de los modelos.

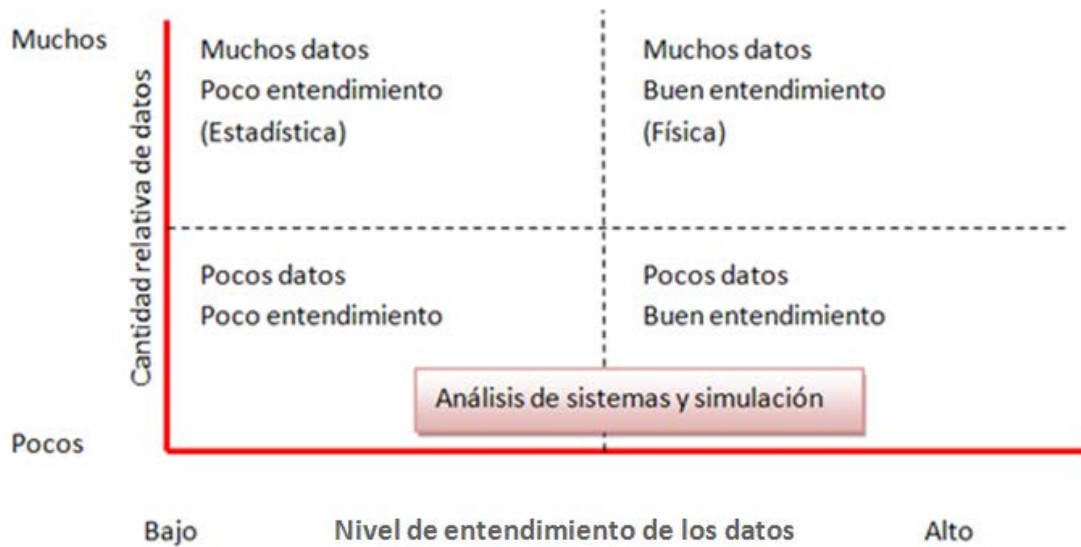


Figura 10. Diferentes métodos para resolver problemas según el nivel relativo de entendimiento (Grant, 2001).

Por lo tanto el nivel de entendimiento delimitará el proceso de conceptualización de modelos para explicar o plantear un modelo que satisfaga el sistema a estudiar

Etapas teóricas en el análisis de sistemas

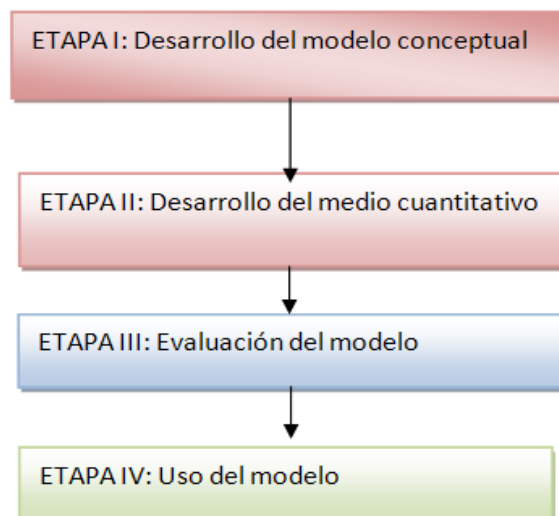


Figura 11. Etapas del análisis de sistemas (Grant, 2001)

ETAPA I: Desarrollo del modelo conceptual

La finalidad de esta etapa se desarrolla un modelo cualitativo del sistema de interés con base al objetivo del proyecto, se debe decidir cuáles son y cómo se relacionan entre ellos, los componentes del mundo real que se incluirán en el sistema de interés.

ETAPA II: Desarrollo del medio cuantitativo

Durante esta etapa se trata de traducir el modelo conceptual a una serie de ecuaciones matemáticas, que en conjunto, forman el modelo cuantitativo, se resuelven las ecuaciones del modelo para cada periodo de tiempo durante el periodo completo de modelación.

ETAPA III: Evaluación del modelo

Durante esta etapa se determina si el modelo es apropiado o no para cumplir el objetivo es decir se lleva a cabo la validación.

ETAPA IV: Uso del modelo

Durante esta etapa se emplea el modelo para responder preguntas planteadas al inicio de la investigación o bien analizar los datos generados para compararlos por métodos estadísticos. Si bien los modelos nos ayudan a conseguir una mayor comprensión de los fenómenos a estudiar, están sujetos al buen planteamiento y entendimiento general de los sistemas para un buen aprovechamiento de este tipo de herramientas.

Los modelos matemáticos utilizados para representar el funcionamiento de los HA, han evolucionado de los modelos empíricos más simples (abordados como “cajas negras”) a modelos con mayor detalle que incluyen dinámicas e interacciones involucradas en la remoción y transformación de contaminantes dentro de los sistemas (Langergraber, 2009). En el desarrollo de modelos matemáticos que simulan el funcionamiento de los HA, destacan tres propósitos principales:

- Profundizar la comprensión de los procesos físicos, químicos y biológicos que tienen lugar dentro de estos sistemas y que están involucrados en la transformación y degradación de contaminantes de las aguas residuales.
- Predecir la calidad de los efluentes a partir de las características del HA, la calidad del agua a tratar y los criterios de operación con los que se desea operar el sistema.
- Generar ecuaciones de diseño que permitan adecuar las características del humedal al sitio geográfico donde será construido, a la calidad del agua que deba tratar, y al porcentaje de remoción requerido.

La mayoría de los modelos matemáticos desarrollados en los últimos años son modelos de transporte simplificados con reacciones de primer orden para explicar la transformación de los contaminantes (Langergraber, 2009). El desarrollo de modelos más complejos implica la consideración de distintos procesos de transformación físicos, químicos y biológicos simultáneamente, así como la hidráulica del sistema. Lo anterior obliga a realizar un balance entre lo detallado de los modelos y lo práctico de su operación, de acuerdo con los objetivos para los cuales fueron diseñados (Sklarz, 2010). La mayoría de los modelos se consideran empíricos, ya que requieren estimar de forma experimental parámetros de ajuste y no necesariamente reflejan los mecanismos que realmente ocurren dentro del HA (Langergraber, 2009). Los modelos matemáticos que forman parte de esta primer clasificación son los llamados Modelos de “Reglas de dedo” (Rousseau, 2004) los cuales están basados en los resultados obtenidos de diferentes sistemas de HA a lo largo del tiempo cuya construcción y operación fue generando experiencia, posteriormente traducida en recomendaciones sobre el diseño y operación de los sistemas de tipo HA. Por otra parte los modelos de regresión multivariable se basan en datos experimentales de entrada y salida del los HA, donde la eficiencia o remoción de contaminantes se asocia a pocos parámetros. Algunas veces, estos parámetros son asignados a partir de un análisis de sensibilidad, y otras a partir de información encontrada en la literatura (Rousseau, 2004).

Debido a que la capacidad de degradación de los diferentes contaminantes en los sistemas de tipo HA varía en relación con la calidad de influente a tratar, estos modelos resultan útiles y prácticos para predecir la calidad del efluente que se desea tratar en este tipo de sistemas. Con ayuda de los modelos es posible establecer criterios de operación que promuevan la eficiencia del sistema (Kincanon y McAnally, 2005). Sin embargo, el carácter individual de estos modelos limita, tanto la posibilidad de utilizarlos para humedales diferentes como la comprensión de los mecanismos que intervienen en la remoción y transformación de contaminantes en los HA (Hafner y Jewel, 2006). Los modelos complejos buscan profundizar en el conocimiento de las rutas de transformación y remoción de contaminantes que se llevan a cabo dentro del sistema. Según Howell (2005) estos modelos dinámicos permiten simular con mayor detalle la variabilidad en el funcionamiento de los humedales artificiales, ya que incluyen funciones matemáticas y parámetros que representan las condiciones ambientales tales como la temperatura, humedad relativa, evotranspiración, precipitación, así como parámetros monitoreados en los influentes y afluentes de los sistemas tales como concentraciones de contaminantes, así como cambios en la actividad microbiana, vegetal y animal entre otros, lo anterior dependiendo de la localización donde se encuentren los sistemas o bien de la disponibilidad de datos con los que se cuente. Para plantear este tipo de modelos matemáticos es necesario contar con un marco conceptual sólido de los distintos ciclos biogeoquímicos dentro de los HA, lo que exige la comprensión de las variables que afectan a cada uno de los mecanismos que intervienen en el ciclo. Los modelos complejos son los menos comunes en materia de HA (Langergraber *et al.*, 2009) y al mismo tiempo resultan los más útiles para comprender los fenómenos que ocurren dentro de ellos. Sin embargo, el número de parámetros asociados a este tipo de modelos suele ser elevado y difíciles de estimar, reduciendo la posibilidad de aplicar el modelo para el diseño de HA (Hafner y Jewel, 2006). En la Tabla 7 se mencionan algunos modelos desarrollados para sistemas de HA, mientras que en la Tabla 8 se ilustra los parámetros estudiados para el caso del estudio sobre el Nitrógeno. Por ende, los modelos en su mayoría no contemplan las dinámicas de la degradación en función de las poblaciones bacterianas

y sólo se enfocan como se menciona anteriormente a balances de materia y porcentajes de remoción.

Tabla 7. Mecanismos de transformación de Nitrógeno utilizados en las investigaciones sobre modelación en HA.

Autor	Mayo y Bigambo, 2005	Howell et al., 2005	McGehan et al., 2005	Howell et al., 2005	Liu et al., 2005	Hafner y Jewel, 2006	Tunçsiper et al., 2006	Chan et al., 2008	Akratos et al., 2009	Wang et al., 2009	Sklarz et al., 2010
Amonificación											
Nitrificación											
Desnitrificación											
Fijación											
ANAMMOX											
Volatilización											
Adsorción											
Sedimentación											
Asimilación											
Descomposición											
Regeneración											

Lo anterior refleja que las diferentes rutas de transformación y remoción de nitrógeno son comprendidas de forma aislada. No existe un entendimiento integral del ciclo del nitrógeno dentro de humedales artificiales; se desconocen los mecanismos que se realizan en forma simultánea, así como las diferentes especies de microorganismos que coexisten e interaccionan. Los marcos conceptuales en los que basa el desarrollo de los modelos, no son expuestos en todos los casos, mientras que las mayores similitudes se encuentran en la explicación de las reacciones de amonificación y nitrificación. Por otra parte menos de la mitad de los trabajos presentados en Tabla 7 se toma en cuenta el componente microbiológico como un factor importante en el desarrollo de estos modelos.

Autor	Mayo y Bigambo, 2005	Liu et al., 2005	McGehan et al., 2005	Howell et al., 2005	Tunçsiper et al., 2006	Chan et al., 2008	Akratos et al., 2009	Wang et al., 2009	Sklarz et al., 2010
Tipo de influente	Agua residual doméstica	Agua residual pre tratada	Agua residual pre tratada	Agua residual pre tratada	Agua residual doméstica pre tratada	Agua residual doméstica	Agua residual artificial	Agua residual artificial	Agua residual doméstica
Tipo de humedal	HAFH	HAFH	Híbrido HAFH y HAFV	HAFSH	HAFH y HAFS	HAFH	HAFH	HAFV	HAFV
Número de HA	4	4	1 HAFH y 3 HAFV	1	14 HAFH y 5 HAFS	3	5	2	2
Control	si	no	No	no	si	si	si	si	Si
Material de empaque	grava	NE	NE	sustrato	grava	Restos de carbón	grava media y grava fina	grava, arena	canicas plásticas
	06-25	NE	NE	NE	10-25	50-100	4-25; 0.25-16 y 30-180	1.5-4	10
	44	NE	30	NE	40	50	NE	NE	80
Especies vegetales	<i>Typha domingensis</i> <i>Phragmites mauritanus</i>	<i>Typha latifolia</i> , <i>Typha domingensis</i> <i>Scirpus acutus</i> <i>Phragmites communis</i>	NE	<i>Schenoplectus californicus</i>	<i>Canna</i> , <i>Cyperus</i> , <i>Typha</i> , <i>Juncus</i> , <i>Poaceae</i> , <i>Paspalum e Iris</i>	<i>Cyperus alternifolius</i>	<i>Typha latifolia</i>	<i>Phragmites australis</i>	<i>Juncus albigenus</i> <i>Cyperus hasperis</i>

Tabla 8. Características de los humedales artificiales utilizados para plantear los diferentes modelos

Capítulo 4

Materiales y métodos

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Estrategia de trabajo del proyecto de investigación

El proyecto de investigación está dividido en cinco etapas (Figura 12). En cada etapa se analizaron diferentes tópicos. Cada etapa proporcionó resultados, los cuales fueron enriqueciendo progresivamente la investigación para posteriormente derivar en el planteamiento, desarrollo y conformación de un modelo de simulación que fuera representativo del proceso de nitrificación en HA.

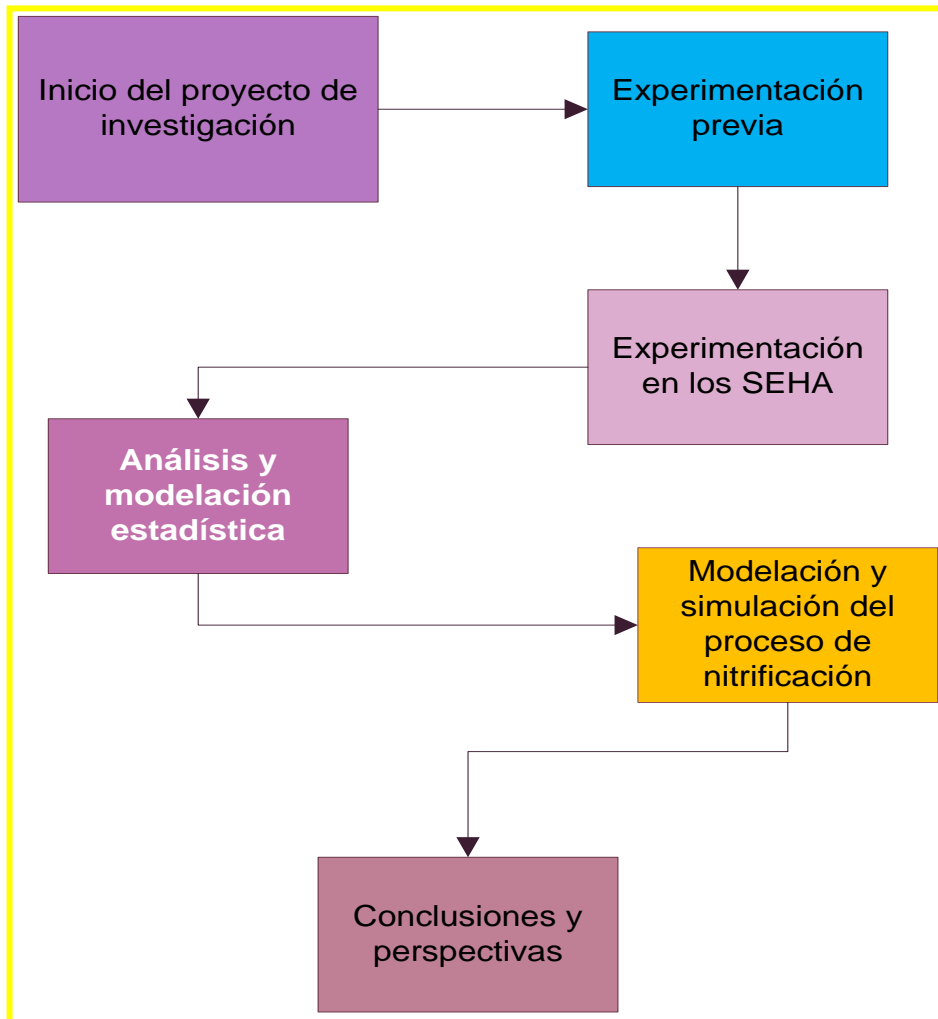


Figura 12. Esquema de la estrategia seguida en la presente investigación.

4.2 Materiales

4.2.1 Sistemas experimentales a escala laboratorio que simulan a un humedal artificial

En la presente investigación se emplearon 3 sistemas a escala laboratorio tipo SEHA, que simulan a un humedal artificial, los cuales están constituidos por columnas de acrílico de 6 mm de espesor, empacados con grava de óxido de sílice con un diámetro de partícula de entre 1 y 2 mm. Las dimensiones de los sistemas experimentales son de 70 cm de alto x 50 cm de diámetro, (Figura 13), cuentan puntos de muestreo horizontal y vertical, los verticales están distribuidos en 3 puntos a lo largo del reactor, 10, 30 y 50 cm, con referencia al borde de la tapa del reactor.

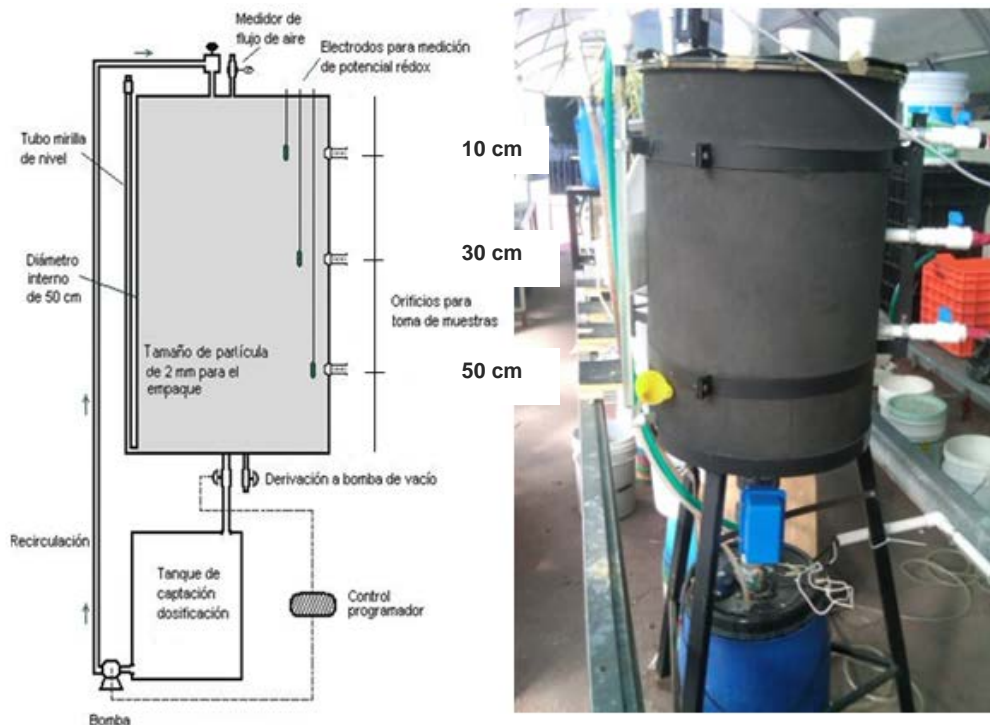


Figura 13. Sistema Experimental que simula un humedal artificial.

Los SEHA cuentan con varios puntos de muestreo vertical colocados en la tapa superior (Figura 14), así como conductos que permiten la instalación de electrodos de monitoreo. En esta tapa se encuentran conductos que permiten el crecimiento de componente vegetal.



Figura 14. Orificio de entradas de muestra y espacios para el componente vegetal.

Los SEHA están cubiertos por una capa de etileno acetato de vinil para evitar el contacto de la luz con el material de empaque, están equipados con un sistema de automatización en base a un Controlador Lógico programable (PLC por sus siglas en ingles) el cual controla las electroválvulas así como las bombas de aire y agua que operan dentro de los SEHA.

4.2.2 Componente abiótico

4.2.2.1 Material de empaque

El medio de soporte o material de empaque como se mencionó anteriormente consiste en capas de gravilla, las cuales además de funcionar como lecho filtrante, tienen la función principal de servir como soporte para el desarrollo de las plantas y el establecimiento de la microorganismos en los sistemas de HA. El material de empaque empleado en la presente investigación fue arena de SiO_2 con un diámetro de partícula de 1 a 2 mm, la cual fue caracterizada y tratada para el empleo en los SEHA.

4.2.3 Componente Biótico

4.2.3.1 Componente vegetal

Para la presente investigación se empleó la planta vascular *Arundo donax*, debido a que tiene amplia distribución en diversos ecosistemas y por tanto tolera distintas condiciones ambientales, es resistente a periodos de desecación, a altas temperaturas y a concentraciones elevadas de compuestos nitrogenados; mantiene un rápido crecimiento y una abundante generación de biomasa que puede emplearse como producto secundario (DEPA, 2003). Sin embargo y pese a sus bondades, es una planta no nativa de México y tiene la limitante de ser invasora en algunos cuerpos de agua. No obstante su crecimiento al margen de los cuerpos de agua, este tiende a ser terrestre (partes húmedas o menos inundadas), mientras que las plantas como las tifas o tulares comúnmente empleadas en HA tienden a invadir los cuerpos de agua, provocando fuertes azolvamientos en sus lechos. Otra característica importante sobre el empleo de este organismos es el tipo de rizoma que desarrolla, ya que permite una mejor hidráulica en el sistema y por lo tanto un número menor de zonas hidráulicas muertas dentro del sistema (DEPA, 2003).

Se empleo un ejemplar de la planta *Arundo donax* del cual se obtuvieron los organismos que se emplearon para introducirlos en los SEHA (Fig.15).



Figura 15. Componente vegetal empleado en los SEHA.

4.2.3.2 Microorganismos

Se empleó un cultivo de bacterias nitrificantes obtenidas a partir de una muestra ambiental proveniente del agua del sedimentador secundario de la planta de tratamiento de aguas residuales de tipo lodos activados de ciudad universitaria de la U.N.A.M (Fig. 16).

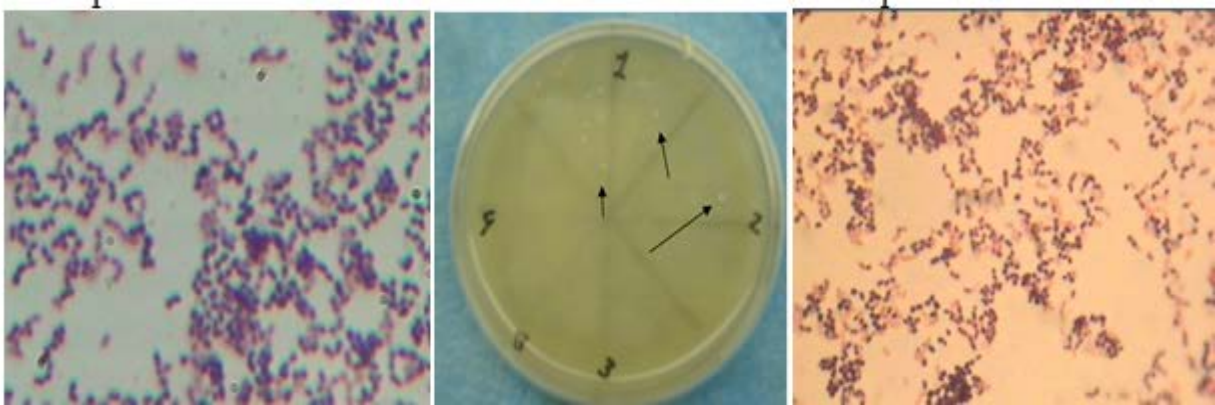


Figura 16. Cultivos de microorganismos nitrificantes con las diferentes disoluciones a 14 días
 A) Tinción con azul de metileno bacterias nitrificantes, B) Cultivos por microgoteo,
 C) Tinción Gram de bacterias nitrificantes.

Posteriormente, se empleó un cultivo de microorganismos heterótrofos obtenidos de la muestra ambiental (Fig. 17) mencionada anteriormente, los cuales fueron aclimatados en un medio mineral rico en NH_4^+ (detalles ver Anexo I) durante 24 semas.



Figura 17. Cultivos de bacterias heterótrofas en medio HIB.

4.3 Experimentación previa

Esta fase constó de cuatro etapas a partir dentro de las cuales se generó información para el desarrollo, caracterización, puesta en marcha y operación de los SEHA con sus distintitos componentes (Figura 18).

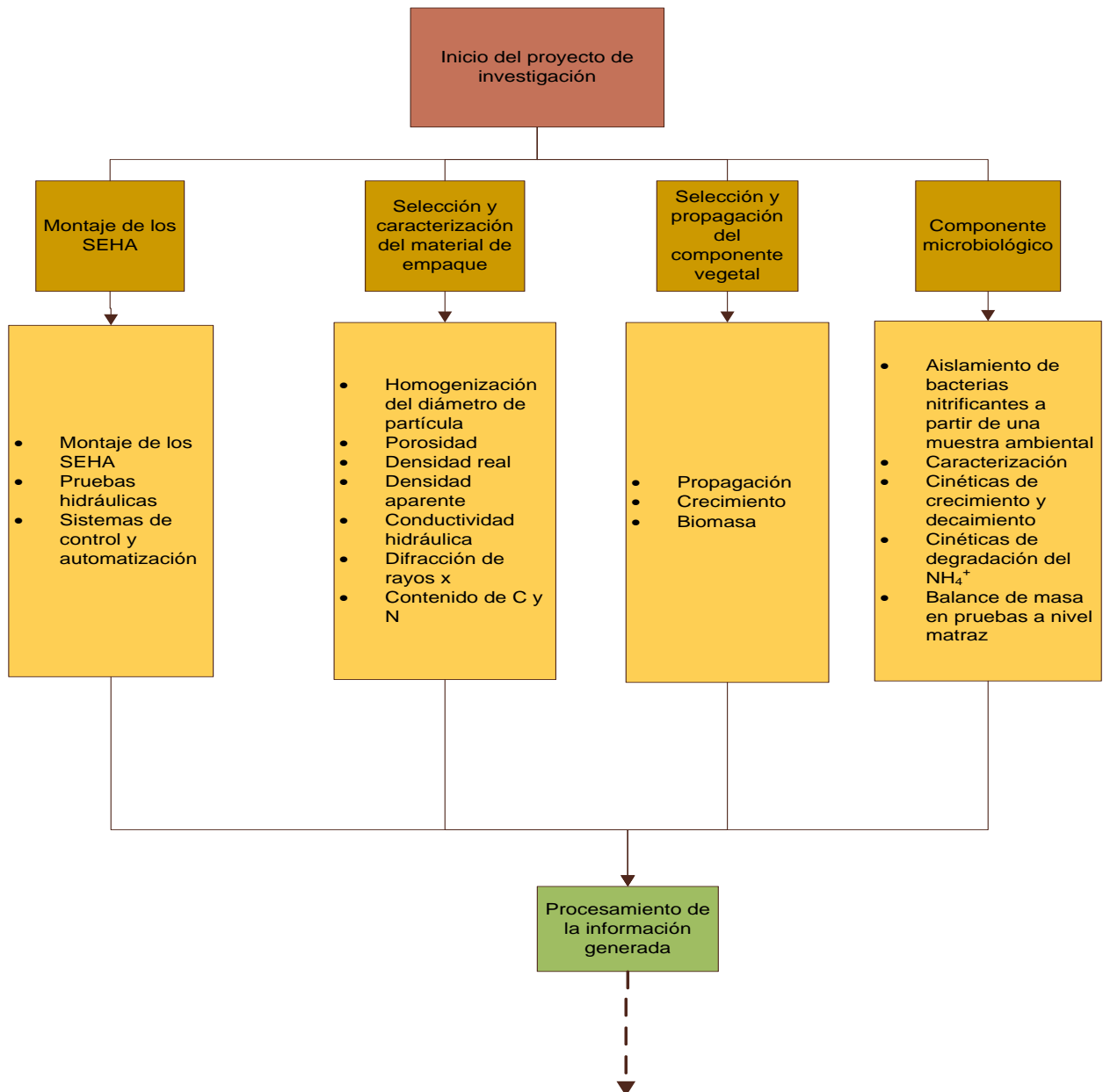


Figura 18. Diagrama de flujo la fase de experimentación previa

Los alcances de la etapa de experimentación previa fueron los siguientes:

- Obtención y caracterización del componente microbiano
- Selección y propagación del componente vegetal
- Selección y caracterización del material de empaque
- Montaje de los sistemas experimentales

4.4 Diseño de los SEHA

La construcción de los Sistema Experimentales se llevó a cabo en tres fases

- Diseño: Dimensionamiento de los SEHA
- Montaje: Armado de las partes del reactor: Tubos de muestreo, sellado de los reactores, montaje de válvulas, montaje de los herrajes de sujeción y accesorios como bombas de agua aire y medidor de flujo.
- Montaje del sistema de automatización: Montaje del controlador lógico (PLC por sus siglas en inglés) y diseño del programa de automatización.

El diseño de los SEHA obedece principalmente a tres razones:

- Analizar y potenciar el proceso de nitrificación en HA
- Que las dimensiones de los sistemas experimentales se asemejen a los sistemas reales.
- Que el volumen necesario para realizar el muestreo no sea mayor al 5 % del volumen total del SEHA.

Los criterios para el dimensionamiento de los HA se enfocan principalmente en 2 vertientes, aquellos que se basan en volumen o bien en área (Wallace y Knight, 2006). Los métodos basados en el volumen se ajustan a un tiempo de retención hidráulica tal que permita la reducción de contaminantes (Reed, 1995, Crites y Tchobanoglous, 2000), mientras los métodos basados en área están enfocados a la reducción de contaminantes en función del área húmeda de los sistema (Kadlec y Knight, 1996).

Existen diversos criterios a considerar, tal es el caso del tamaño de partícula el cual según los criterios de Crites y Tchobanoglous (2000), mencionan que un tamaño de partícula entre 2 y 5 mm favorecen el proceso de nitrificación debido a la mayor superficie de contacto que proporciona el material para el desarrollo de una biopelícula de organismos nitrificantes y denitrificantes. Sin embargo, sólo se recomienda este tamaño de partícula para cargas de D.Q.O. menores a 200 mg/L, si el tamaño de partícula fuese mayor a los 10 mm o con una porosidad mayor al 50 %, el sistema favorecerá la remoción de carbono sin embargo se reducirá hasta en 50 a 60 % la remoción de nitrógeno.

4.4.1 Profundidad del medio filtrante

En cuanto a la profundidad del medio filtrante existen diversas medidas en función del contaminante que se requiera remover, sin embargo las medidas comunes oscilan entre 0.45 y 1.20 m (Vymazal, 2009). No obstante, se consideró que una profundidad media de 0.70 m es suficiente para el proceso de nitrificación, debido a que el proceso se realiza en condiciones aerobias y en los primeros 0.30 m de los sistemas (Vymazal, 2009). Por lo tanto se pretende analizar si existe una diferencia significativa entre los diferentes estratos, siendo que se espera encontrar que a esta profundidad no exista un cambio significativo y permitiendo de la misma manera un ambiente suficientemente anaerobio para permitir la transformación del NO_3^- hacia la desnitrificación. La razón de carga hidráulica es también un criterio importante y fuertemente asociado a tiempo de retención hidráulica debido a que demasiada carga hidráulica o demasiado tiempo de residencia hidráulica termina por afectar fuertemente la dinámica poblacional de los microorganismos encargados de transformar y degradar los diferentes contaminantes en el agua, propiciando bajas eficiencias en cuanto a la remoción de contaminantes en el sistema. Para tal fin Crites y Tchobanoglous (2000), mencionan que se debe considerar la proporción de 4.5 a 9 L de agua por cada 0.092 $\text{m}^2/\text{día}$.

Las dimensiones de los SEHA, son de 0.48 m de diámetro interno x 0.70 m de altura, con un volumen teórico, sin material de empaque, de 130.90 L, mientras que el área es de 0.189 m². Tomando en cuenta que el material de empaque tiene una porosidad de aproximadamente 30 % se esperó que el volumen teórico de los SEHA fuera cuando menos de 40L. Este volumen bastaría para realizar una frecuencia de muestreo de hasta 3 veces diarias o bien, 23 muestreos durante un periodo de 7 días, esto es debido a que el volumen total que se necesita para cuantificar los parámetros fisicoquímicos es de 95 mL por muestreo (Tabla 12), lo anterior permite la extracción de hasta un 5 % del volumen de los sistemas y así evitar una extracción excesiva del amonio, así como del componente microbiano.

4.4.2 Selección y caracterización del material de empaque

El tamaño de partícula que se empleó en los SEHA fue de 1 a 2 mm para aumentar el proceso de nitrificación en los sistemas experimentales. Otro criterio importante es el tipo de material, pues para su selección se debe considerar la dureza del material, tal que permita su durabilidad y baja compactación, esto con el fin de evitar el desmoronamiento del mismo y como consecuencia un taponamiento del sistema, por lo tanto también es necesario que el material esté libre de partículas orgánicas finas, limos finos y arcillas, de tal manera que estos elementos no ocasionen una colmatación del lecho filtrante. El material de empaque que fue empleado en los SEHA fue gravilla de SiO₂ gracias a su poca reactividad con el medio y la estabilidad de la molécula. El proceso para el acondicionamiento del material de empaque comenzó con el tamizado del material por medio de un cernidor con malla metálica de la cual se obtuvo un tamaño de partícula de entre 1 y 2 mm. Posteriormente, el material fue lavado con agua corriente potable hasta retirar la arenilla del empaque. El material fue secado a 55° C durante 5 días. Se realizó el cálculo de la densidad aparente del material de empaque siguiendo el método propuesto por UEX (2009), esto para conocer el volumen de material a emplear en los SEHA. Adicionalmente, se calculó la conductividad hidráulica para estimar los tiempos de llenado y vaciado de los SEHA,

estableciendo así los tiempos necesarios para la operación por el sistema de automatización en los SEHA.

4.4.3 Montaje de los SEHA

El montaje comenzó con el ensamblado del cuerpo del reactor (Fig. 19 A, B). Una vez ensamblado el cuerpo, se colocaron los tubos de muestreo laterales (Fig. 19 C). Posteriormente, se instalaron en las bases metálicas y se equiparon con los cinturones de soporte para darles consistencia y evitar fracturas en la columna de los SEHA. Una vez ensamblados se colocaron las electro válvulas (Fig. 19 D) y se procedió a realizar las pruebas de sellado.



Figura 19. Componentes de los sistemas experimentales que simulan humedales Artificiales: A) Cuerpo de SEHA, B) Tapa superior del SEHA, C) SEHA antes del montaje, D) Electroválvula.

Una vez instalados los SEHA, se realizaron las siguientes pruebas para el arranque de los sistemas.

- Pruebas de sellado y volumen del reactor sin material de empaque
- Montaje del sistema de automatización
- Pruebas de hidráulicas de tiempo de llenado y vaciado



Figura 20. Pruebas de sellado de los SEHA.

Una vez concluidas satisfactoriamente estas pruebas se empacaron los SEHA con la gravilla de SiO_2 previamente lavada y secada, se realizaron nuevamente las pruebas hidráulicas de tiempo de llenado y vaciado así como la capacidad de volumen real de los SEHA.



Figura 21. Sistemas Experimentales empacados y consola del sistema de automatización.

Por último, los SEHA fueron cubiertos por una capa de etileno acetato de vinilo para evitar el contacto de la luz con el material de empaque. Se puso en marcha el sistema de automatización el cual controla las electroválvulas así como las bombas de aire y agua que operan dentro de los SEHA (Figura 22 y Figura 23).



Figura 22. Sistemas experimentales “encamisados” con una cubierta aislante a la luz.



Figura 23. Electroválvula y panel de control de los SEHA

4.4.4 Selección y propagación del componente vegetal

El componente vegetal se propagó siguiendo el método de división por esquejes a partir un organismo de *Arundo donax* extraído de la zona lacustre de Xochimilco.

Propagación del componente vegetal:

1. Se selecciono el rizoma del ejemplar en segmentos de 0.15 m de longitud para obtener esquejes (Fig. 24 A).
2. Se aplico una solución de enraizador comercial en una proporción de 2 g/L a lo largo de todo el rizoma (Fig. 24 B)
3. Se introdujo el rizoma en la cavidad del sustrato a una profundidad de entre 0.03 y 0.05 m.

Una vez que los esquejes desarrollaron rizomas, fueron trasplantados a contenedores con medio de soporte compuesto por humus. El componente vegetal fue irrigado con agua potable durante 30 días (Fig. 24 C).

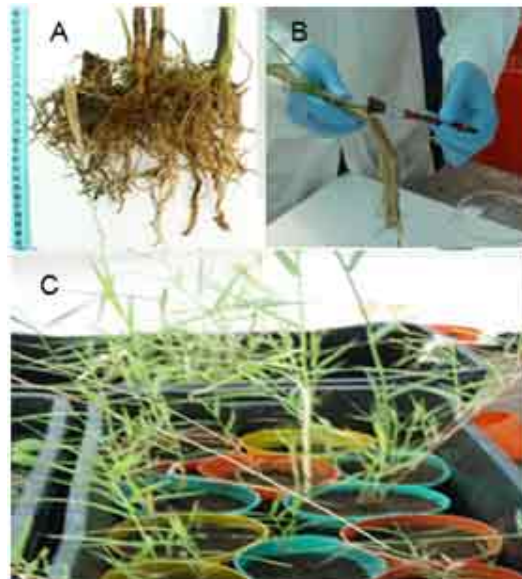


Figura 24. Propagación del componente vegetal

Para determinar la generación de biomasa, se diseñó un sistema para evaluar el componente vegetal en condiciones controladas (Figura 25. Sistema para medir el crecimiento vegetal bajo temperatura y fotoperiodos controlados.B), el cual consta de un contenedor con 8 perforaciones donde se introdujeron macetas con 400 g de material de gravilla de óxido de sílice con un diámetro de 1 a 2 mm (Figura 25 A). El sistema se mantuvo iluminado con una lámpara de HIQ de 4500K con un fotoperiodo de 12 h. El riego se realizó por goteo, administrando diariamente a cada planta 250 mL de una solución nutritiva con una concentración de N_T de 40 mg/L. El componente vegetal se monitoreó durante tres meses, se realizaron podas al componente vegetal cada 30 días manteniendo una longitud promedio de la planta de 60 cm, la materia vegetal retirada fue pesada y se registró tanto el peso seco como el peso húmedo.

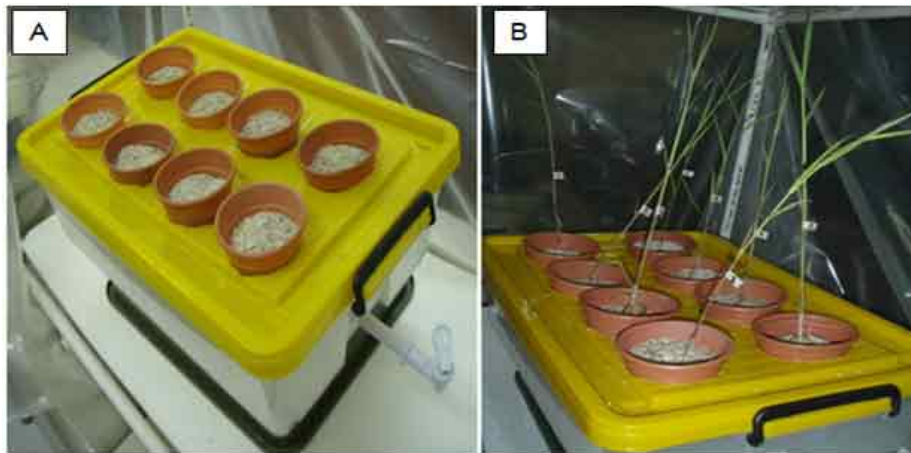


Figura 25. Sistema para medir el crecimiento vegetal bajo temperatura y fotoperiodos controlados.

4.4.5 Componente microbiano

4.4.5.1 Obtención de bacterias nitrificantes a partir de una muestra ambiental

Con el objetivo de obtener un inóculo de bacterias nitrificantes para los SEHA, se empleó una muestra procedente de la planta de tratamiento de aguas residuales de Ciudad Universitaria (Figura 26), a partir de la cual se aisló y caracterizó el componente microbiano empleado en los SEHA.



Figura 26. Toma de muestra para aislamiento de bacterias nitrificantes.

Las muestras colectadas fueron sedimentadas por 5 h. El sedimento se resuspendió en 1 L de medio enriquecido con amonio partir de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Hanaki, 1999) por duplicado. El cultivo fue puesto bajo condiciones aerobias con aire húmedo para evitar el arrastre de humedad debido a la aireación. El cultivo se mantuvo en un cuarto de incubación durante 20 días en condiciones de oscuridad y a una temperatura de 30°C.

Al cabo de 20 días el cultivo fue resuspendido por agitación, a partir de este, se realizaron 4 diluciones: 50, 25, 10 y 5 mL de muestra en 100 mL de medio mineral para bacterias nitrificantes (Hanaki, 1999). Las diluciones se incubaron por 20 días bajo aireación húmeda permanente y se realizó el monitoreo del pH, transcurridos 20 días se repitió el procedimiento.

Durante este periodo el valor del pH fue monitoreado y controlado con la adición periódica de NaOH al 2M para mantener un valor promedio de 8.5 unidades de pH dentro de los cultivos. Lo anterior, debido a que el valor de pH descendió en promedio 2 unidades cada 2 días. Transcurridos 60 días, se filtraron los cultivos con un papel filtro con diámetro de poro de 180 μm con el fin de depurar los cultivos de microorganismos y partículas no deseados. El filtrado fue diluido nuevamente al 50 % con medio rico en NH_4^+ y cultivado por 20 días con aireación húmeda permanente a 30° C (Figura 27).



Figura 27. Cultivos en aireación húmeda

Para determinar si existía actividad nitrificante se realizaron pruebas bioquímicas colorimétricas con el reactivo de Griess (ver Anexo II). Con esta prueba el nitrito es detectado y analizado por la formación de un color rojo o rosado en el tratamiento de una muestra conteniendo H-NO_2^- , el color tiende a ser más tenue cuando existe una mayor concentración a H-NO_3^- (Figura 28). Una vez confirmada la reacción colorimétrica del reactivo de Griess.

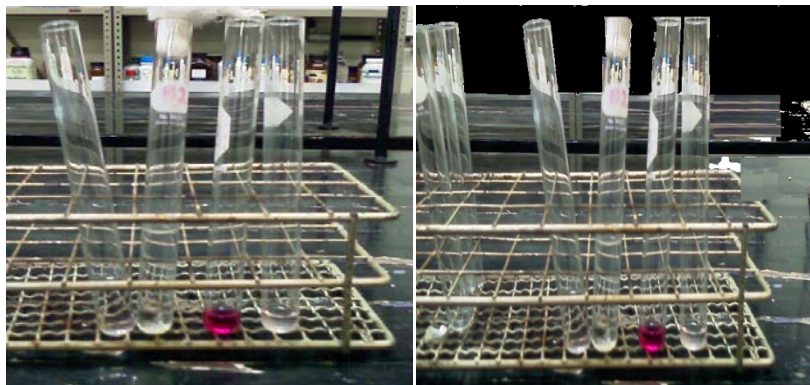


Figura 28. Prueba con el reactivo de Griess

Los cultivos fueron divididos en dos partes (Figura 29). Una parte se mantuvo con un medio mineral con amonio en una concentración de 60 mg/L de NH_4^+ y materia orgánica disuelta de 70 mg DQO/L (ver Anexo II). En este cultivo, se aumentó la biomasa progresivamente hasta obtener el inóculo para los Señala otra parte, se empleó para realizar la identificación de las principales bacterias presentes en el cultivo y posteriormente, aumentar la biomasa de aquellas con actividad nitrificante, una vez que estuvieran aisladas y caracterizadas.

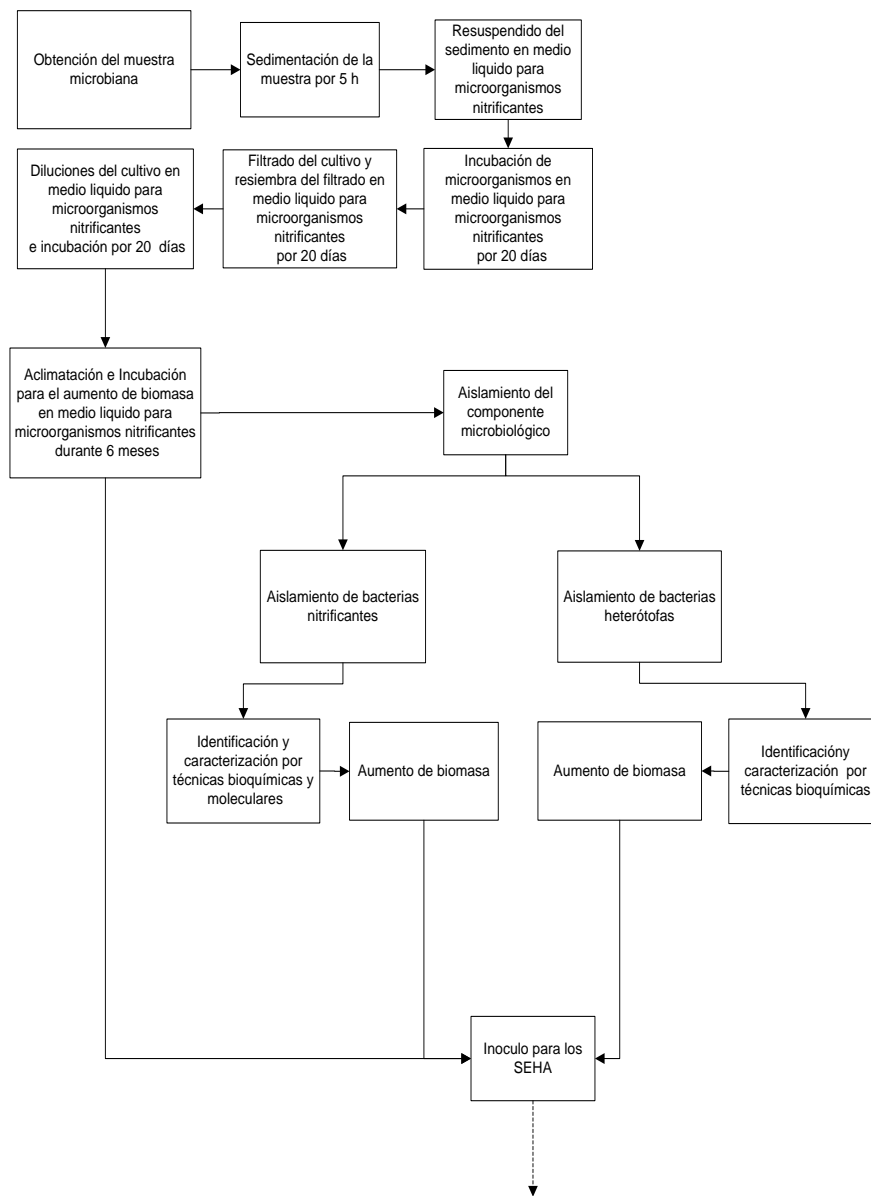


Figura 29. Metodología empleada para el aislamiento y caracterización del componente microbiano

4.4.5.2 Aislamiento de bacterias

El aislamiento y caracterización de los microorganismos que se encontraban en el consorcio se realizó por medio de vaciados en placa, con medio sólido enriquecido con amonio (Atlas, 2005) y resiembras periódicas con el fin de depurar los cultivos.

A partir de los cultivos en placa se tomaron cinco muestras de colonias que se desarrollaron en los medios de cultivo para bacterias nitrificantes, con un volumen de 40 μL , las cuales fueron suspendidas en 1 mL de solución salina 0.85 %. Una vez que se homogeneizaron los cultivos, se extrajeron 3 muestras de 1 mL de cada una, las cuales fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 3 minutos. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el botón en una solución fisiológica al 0.85 % de NaCl para posteriormente realizar un sembrado en medio sólido enriquecido con amonio. La inoculación a los medios se realizó tomando 1 mL del extracto para su sembrado por medio de la técnica de microgoteo, se colocaron 20 gotas de 10 μL en 6 cajas con medio para bacterias nitrificantes (Atlas, 2005). Los cultivos se incubaron durante 14 días a 27 °C y se observó su desarrollo. Las primeras colonias bacterianas se hicieron aparentes a partir del noveno día, estas colonias fueron tomadas y resembradas en medio nitrificante líquido para aumentar la biomasa. Posteriormente, se aplicó el reactivo de Griess para verificar si los microorganismos tenían actividad nitrificante, al dar positivas se cultivaron nuevamente en medio sólido para bacterias nitrificantes (Atlas, 2005), durante 14 días. Una vez que se observó el desarrollo de colonias uniformes en cuanto a su morfología dentro de los cultivos, se realizaron resiembras por medio de la técnica de estría cruzada para asegurar el aislamiento de los organismos nitrificantes. Al cabo de 30 días, se realizaron tinciones diferenciales a los organismos provenientes de los cultivos y mediante su observación al microscopio, se determinó si las características morfológicas y respuesta a los colorantes concordaban con lo indicado en bibliografía especializada (Holt, 1999).

Una vez que se corroboró que los cultivos correspondían a un mismo tipo celular, las colonias fueron sembradas en un medio mineral sólido enriquecido con amonio en una concentración de 60 mg/L de NH_4^+ , pH 8.5 y a una temperatura de 27° C (ver Anexo II). Estos cultivos se resembraron nuevamente en medio sólido para nitrificantes hasta conseguir colonias puras.

4.4.5.3 Identificación de bacterias nitrificantes.

La identificación de las bacterias nitrificantes es de suma importancia, pues dependiendo de la especie es la afinidad al sustrato y por tanto la cinética de transformación del mismo (Koops, 1991). Una vez que las bacterias se aislaron y se verificó su capacidad nitrificante, se realizó su determinación morfológica empleando para ello observaciones al microscopio y tinciones diferenciales de Gram, Neisser y Sudan IV.

4.4.5.3.1 Identificación genética de las bacterias nitrificantes

Con el objetivo de identificar genéticamente las bacterias nitrificantes aisladas, se empleó la técnica de biología molecular basada en el análisis por PCR (polymerase chain reaction). Para ello, se procedió a extrapolar la extracción del ADN según la metodología de Montrà (2007) y empleando los siguientes cebadores

AmoA-1F5' GGG GTT TCT ACT GGT GGT POSICION 332 A 349

AmoA-2r5' CCC CTC KGS AAA GCC TTC TTC

K=G o T, S=G o C POSICIONES 802 A 822

Del gen *amoA* en *Nitrosomonas europaea* con 491 pb (Rotthauwe *et al.*, 1997)

El PCR se realizó siguiendo las condiciones indicadas en la Tabla 9.

Tabla 9. Condiciones empleadas para el análisis molecular basado en PCR

Condiciones de termociclador		Mezcla de reacción	
Desnaturalización inicial	95 % 5 min pausa	Buffer	1 x
Desnaturalización	94°/60 s	DNTPs	20µM
Alineación	60°/90s	Cebadores	10µM
Extensión	72°/90s	Taq polimerasa	2.5 U
Número de ciclos	36	ClMg ⁺	1.5mM
Extensión final	72°/10 m	Templado	5µL

A partir del material genético amplificado y obtenido por la técnica de PCR, se realizó una electroforesis en gel de agarosa en una concentración de 1.8 %, con un peso teórico de 398 pb.

4.4.5.3.2 Identificación de bacterias heterótrofas

La identificación de los microorganismos heterótrofos es de gran importancia para el proceso de nitrificación en los HA, debido a que consumen altas cantidades de oxígeno, presentan una elevada tasa de duplicación, lo que constituye un factor limitante para el desarrollo de microorganismos nitrificantes. El resultado de la competencia por el espacio y oxígeno entre los dos grupos resulta desfavorable para las bacterias nitrificantes dado su lento crecimiento relativo. Por lo anterior, se realizó a nivel bioquímico la identificación de las bacterias predominantes en los SEHA y con ello inferir su posible influencia en el proceso de nitrificación.

A partir de los cultivos prefiltrados, se realizaron pruebas de identificación de grupos bacterianos heterótrofos por medio de microcultivos y pruebas bioquímicas. La identificación comenzó extrayendo un volumen de 100 µL y cultivándolo por el método de estriado cruzado por agotamiento en medio BHI (Brain Heart Infusion, por sus siglas en inglés). Posteriormente, fueron cultivadas por 12 h a una temperatura de 27° C, obteniéndose 12 colonias diferentes. Estas colonias fueron sembradas en medios selectivos y posteriormente, cultivadas en placas de micropozos de 100 µL con medios que permitieran su identificación.

Los medios empleados para las pruebas bioquímicas fueron los siguientes:

Para la fermentación de hidratos de carbono se emplearon los siguientes sustratos: Sacarosa (SAC); Arabinosa (ARA); Sorbitol (SOR); Glucosa (GLU); Trealosa (TRE); Inositol (INO); Lactosa (LAC); Rafinosa (RAF); Rhamnosa (RHA); Manitol (MAN); Maltosa (MAL); Xilosa (XIL); Dulcitol (DUL); Salicina (SAL). Para la asimilación de sustratos, se emplearon: Malonato (MALO); Citrato de Simon's (CIT). Para las reacciones de descarboxilación de aminoácidos: Lisina (LIS); Ornitina (ORN) y Arginina (ARG). Para la desaminación de aminoácidos se empleó la Fenilalanina (FDA). Adicionalmente se realizaron otras pruebas indicadoras de actividad nitrificante como la reducción de nitritos a nitratos a nitritos (NIT), hidrólisis de Urea (URE) con rojo de Metilo (RM), Producción de ácido sulfhídrico (H_2S); Producción de Indol (IND), Producción de gas N_2 ; Movilidad (MOV), presencia de citocromo oxidasa (OXI); producción de pigmento con óxido-fermentación de glucosa (OF). Todos los sustratos fueron inoculados con las cepas problema, se incubaron a $37^\circ C$ por 24 horas y se revisaron a las 24 y 48 horas. Las interpretaciones se hicieron de acuerdo a Balows (1991).

4.4.5.3.3 **Cinéticas de poblacionales bacterianas y degradación del NH_4^+**

Para poder determinar las cinéticas bacterianas y la degradación del NH_4^+ se realizaron dos experimentos a nivel matraz por triplicado. El primer experimento, consistió en el seguimiento de la degradación del nitrógeno amoniacal, mientras que el segundo consistió en el seguimiento de la dinámica de crecimiento poblacional de las bacterias nitrificantes durante 29 días, (Figura 30).

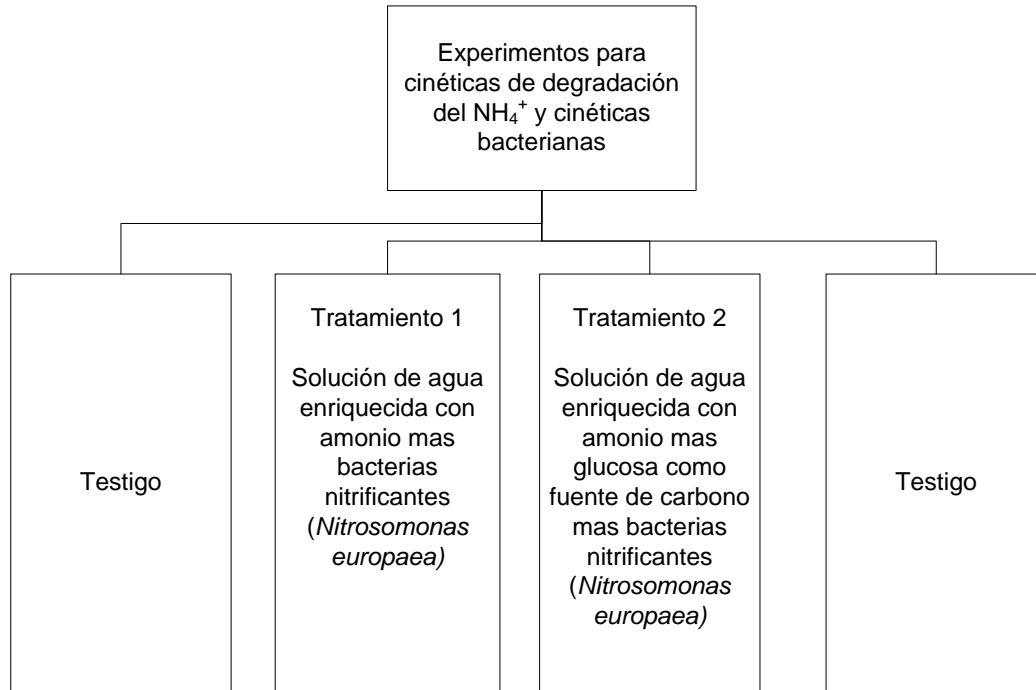


Figura 30. Diseño de experimento para las pruebas de cinética de crecimiento microbiano y degradación del NH_4^+

4.4.5.3.4 Cinéticas de degradación del NH_4^+ por bacterias oxidadoras de amonio

Tratamiento 1

Este tratamiento consistió en colocar 2 L de solución enriquecida con amonio en una concentración de 65.9 mg/L de NH_4^+ en dos envases de vidrio ámbar, a un envase se le adicionó 150 mL de bacterias nitritantes de la especie *Nitrosomonas europaea* en concentración de 4.8×10^3 UFC por mL mientras que el restante fungió como testigo.

Tratamiento 2

En este tratamiento se colocaron 2 L de solución enriquecida con amonio en una concentración de 65.9 mg/L más glucosa en una concentración de 19 mg/L, a un envase se le adicionaron 150 mL de bacterias nitrificantes en concentración de 4.8×10^3 UFC / mL mientras que el otro sirvió como testigo.

4.4.5.3.5 Cinéticas de degradación del NH_4^+ por el consorcio bacteriano aclimatado más la adición de bacterias nitrificantes

El segundo experimento consistió en colocar 2 L de solución enriquecida con amonio en una concentración de 65.9 mg/L adicionada con micronutrientes y fuente de carbono (ver Anexo II), se le adicionó 100 mL de bacterias nitrificantes en concentración de 4.9×10^4 UFC /mL más 100 mL de un cultivo de bacterias heterótrofas (Figura 31).

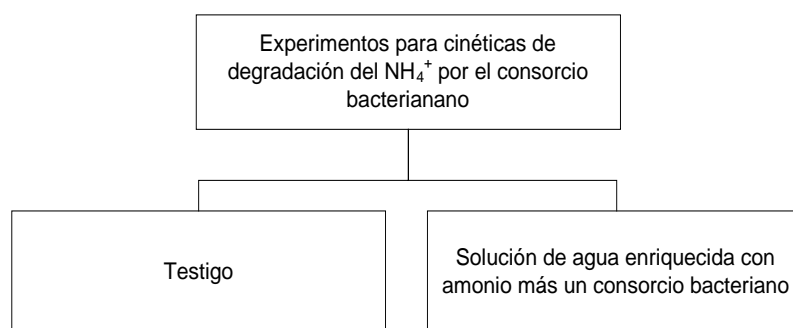


Figura 31. Diseño de experimento para las pruebas de cinética de degradación del NH_4^+ por el consorcio bacteriano tratamiento 1.

Todos los tratamientos fueron realizados por triplicado y mantenidos en condiciones de aireación húmeda para evitar la evaporación del medio de cultivo como consecuencia del arrastre por humedad. Los tratamientos se mantuvieron a una temperatura promedio de $28.31 \pm 1.20^\circ \text{C}$, el monitoreo se realizó cada 7 días durante 28 días. Durante este periodo se monitorearon los parámetros fisicoquímicos y el componente microbiano, con el fin de determinar la cinética de degradación del NH_4^+ y la generación de biomasa con el inóculo bacteriano. Las técnicas fisicoquímicas que fueron utilizadas para realizar el seguimiento de la degradación del amonio por los organismos aislados se muestran en la Tabla 10. La determinación de la cantidad de organismos presentes en los experimentos se realizó por medio de la técnica de unidades formadoras de colonias UFC a través del método de siembra por microgoteo en placa (ver Anexo II).

Tabla 10. Técnicas empleadas para medir la concentración de N en sus diferentes estados de oxidación en los cultivos de bacterias nitrificantes.

Parámetros	Frecuencia de muestreo	Técnica
pH	Cada 7 días	Electrodo de pH
Nitrógeno amoniacal (N-NH ₄ ⁺)	Cada 7 días	Nesslerización APHA, 1989
Nitratos (NO ₃ ⁻)	Cada 7 días	4500-NO ₃ ⁻ NMX-AA-079-SCFI-2001
Nitritos (NO ₂ ⁻)	Cada 7 días	Método por diazotización de p-nitroanilina (2009)
Oxígeno disuelto (O.D.)	Cada 7 días	Electrodo de membrana para O ₂
Temperatura	Cada 7 días	Electrodo para temperatura
Biomasa Bacterias	Cada 7 días	UFC por microgoteo

Los datos generados a partir de la experimentación previa permitieron realizar el cálculo de las cinéticas de degradación del amonio, crecimiento y decaimiento bacteriano, así como el balance de masa del nitrógeno en las pruebas a nivel matraz. Estos datos posteriormente fueron empleados para alimentar el modelo conceptual preliminar y compararlos con los obtenidos en los SEHA.

Experimentación en los SEHA

4.5 Experimentación en los SEHA

4.5.1 Diseño de experimento

La experimentación previa, permitió una mejor conceptualización sobre el diseño de experimento así como el arreglo de los SEHA, los cuales presentan los siguientes arreglos experimentales:

- Todos los sistemas tienen el mismo material de empaque.
- Un sistema experimental con inoculación de bacterias nitrificantes y con plantas vasculares de la especie *Arundo donax*.
- Un sistema experimental con inóculo de bacterias nitrificantes.
- Un sistema experimental sólo con la planta vascular *Arundo donax*.
- Un sistema experimental testigo sin adición de bacterias nitrificantes y sin plantas.

Una vez concluida la fase de montaje de los SEHA, y con base a los resultados obtenidos se fijaron las condiciones de operación de los sistemas.

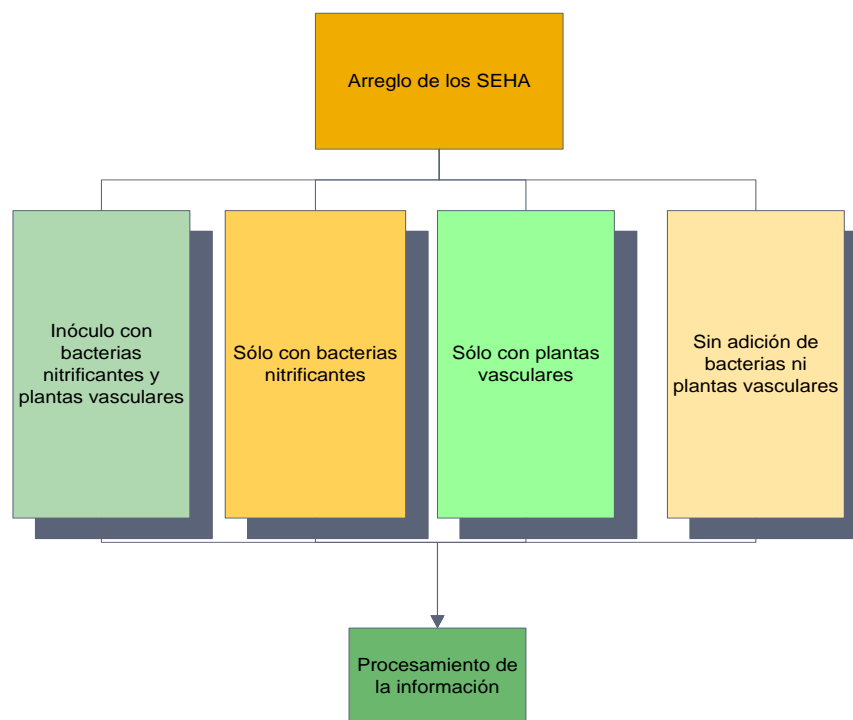


Figura 32. Diseño de arreglos en los SEHA

4.5.2 Arranque de los SEHA

Los SEHA fueron alimentados con 52 L de agua enriquecida con amonio en una concentración promedio de 60 mg/L, una DQO promedio de 70 mg/L, más la adición de una solución de micronutrientes (ver Anexo II).

4.5.2.1 Incorporación del componente vegetal en los SEHA

El componente vegetal fue colocado en dos de los SEHA según el arreglo planteado (Figura 33). La incorporación del componente vegetal en los SEHA comenzó con la colecta de los ejemplares de *Arundo donax* previamente propagados, a los cuales, por medio de lavados con agua corriente, se les retiro el excedente de sustrato en la zona del rizoma.



Figura 33. Preparación y cultivo del componente vegetal en los SEHA, A) Lavado de la rizósfera B) Registro de la longitud del tallo, C) Pesado de los organismos, D) Cavidades para la siembra de los organismos vegetales

Se registró el peso húmedo y la longitud del tallo de los ejemplares, la siembra en los SEHA se llevó a cabo realizando un lavado del rizoma con una solución de HCL y $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ al 40 % en proporción 1:1 durante 10 segundos y posteriormente se enjuagó con agua estéril. Se realizaron cuatro cavidades en la superficie del material de empaque con unas dimensiones de 10 cm de profundidad con diámetro de 5 cm y un espaciado de 20 cm entre cada cavidad, donde se colocaron los ejemplares de *Arundo donax*, posteriormente las cavidades fueron rellenas con el material de empaque extraído.

4.5.2.2 Inoculación del componente microbiano en los SEHA

El componente microbiano en los SEHA fue inoculado según el diseño de experimento planteado anteriormente (Figura 34), con 6 L de medio enriquecido con amonio (Anexo II), el cual contenía bacterias nitrificantes oxidadoras de amonio, en una concentración de 3.64×10^3 células/mL.



Figura 34. Inoculación de los SEHA, A) Inoculación del agua enriquecida con amonio en el tanque contenedor, B) Inoculación del componente microbiano.

Transcurrido un periodo de 27 días, se adicionaron 3.8 L de medio enriquecido con NH_4^+ el cual contenía el consorcio bacteriano incubado y aclimatado previamente, el cual contenía bacterias oxidadoras de amonio, oxidadoras de nitritos, así como bacterias heterótrofas. Una vez inoculados los SEHA con el consorcio se realizó el

seguimiento durante 100 días. Periodo durante el cual fueron monitoreados los parámetros (Tabla 11) que permitieron analizar el proceso de nitrificación en los SEHA.

4.5.2.3 Operación de los SEHA

La operación de los SEHA fue implementada en función de las necesidades de generar información para el esclarecimiento del proceso de nitrificación, así como a los resultados obtenidos durante la experimentación previa. Tal es el caso del tiempo de residencia hidráulico (TRH), el cual fue establecido en base a los datos generados sobre el consumo del oxígeno y oxidación del NH_4^+ observados durante dicha fase. La operación de los SEHA está dividida en 2 fases: (1) la fase de arranque y (2) la fase de estabilización. Realizando dentro de esta última, modificaciones al TRH que permitieron esclarecer el consumo de oxígeno asociado a la degradación de NH_4^+ en función del tiempo dentro de los SEHA. Durante la fase (1), el agua del sistema es aireada en el tanque contenedor durante 10 minutos antes de ingresar al SEHA. Posteriormente se realiza un bombeo, el cual tiene una duración de 9 minutos hasta alcanzar la capacidad máxima del SEHA, al mismo tiempo se activa la válvula de cierre. El sistema permanece inundado durante 50 min y posteriormente el agua es vaciada del sistema. El sistema permanece en reposo (sin inundar) durante 2.5 h, para posteriormente reiniciar el ciclo con un total de 48 ciclos por semana. Durante este periodo, se controló el valor del pH adicionando una solución de KOH al 2 M en un volumen variable dependiendo de la concentración dentro de los SEHA, con el fin de mantener un pH promedio de 8.5, así mismo la concentración de NH_4^+ fue mantenida por medio de la adición de una solución rica en amonio (Anexo II), tomando en cuenta la diferencia de concentración entre el valor inicial y el final en periodos de 7 días, esto con el fin de mantener un promedio de 60 mg/L de NH_4^+ , en un volumen que dependió de la pérdida por evaporación el cual en promedio fue de 0.950 L por semana.

Fase (2), una vez alcanzados los promedios de degradación que sugirieron una tendencia constante de degradación, se cambiaron las condiciones de operación, donde el periodo de aireación aumentó a 30 minutos en el tanque contenedor antes de ingresar al SEHA. Posteriormente, se realiza el bombeo, el cual tiene una duración de

9 minutos hasta alcanzar la capacidad máxima del SEHA, al mismo tiempo que es cerrada la válvula en el sistema. El sistema permanece inundado durante 7 h y posteriormente el agua es vaciada del sistema el cual permanece en reposo (sin inundar) durante 30 minutos para después reiniciar el ciclo, con un total de 21 ciclos por semana.

4.5.3 Muestreo

El muestreo se realizó cada 7 días durante 127 días en los diferentes arreglos experimentales, La toma de muestra se realizó extrayendo 35 mL de cada punto de muestreo. Para las muestras de material de empaque se extrajeron 5 g de los diferentes puntos de muestreo para la determinación de carbono y nitrógeno total en el material de empaque. Los parámetros analizados se muestran en la Tabla 11. Los puntos de muestreo fueron realizados en el influente y efluente, así como en los diferentes puntos de muestreo, los cuales están distribuidos en cuatro puntos de la siguiente manera: 10 cm, 20 cm, 50 cm, 70 cm. Adicionalmente se realizó un monitoreo cada tercer día de los valores O.D., potencial redox, pH y temperatura.

Tabla 11. Parámetros a evaluar en los sistemas experimentales.

Parámetros	Frecuencia de muestreo	Técnica y Equipo
pH	Cada 3 días	Electrodo de pH
Nitrógeno amoniacal (N-NH ₄ ⁺)	Cada 7 días	Nesslerización APHA, 1989
Nitratos (NO ₃ ⁻)	Cada 7 días	4500-NO ₃ ⁻ NMX-AA-079-SCFI-2001
Nitritos (NO ₂ ⁻)	Cada 7 días	Método por diazotización de p-nitroanilina (Sreekumar, 2009)
Oxígeno disuelto (O.D.)	Cada 7 días	Electrodo de membrana para O ₂
Temperatura	Cada 7 días	Electrodo para temperatura
Demanda química de oxígeno (DQO)	Cada 7 días	método 5220-C NMX-AA-030-SCFI-2001
Potencial redox	Cada 7 días	Electrodo de platino para potencial redox
Biomasa Bacterias	Cada 15 días	UFC y por microgoteo
Biomasa Vegetal	Cada 30 días	Medición de la longitud y peso de la planta en función del aporte de nutrientes

4.6 Modelación estadística

El planteamiento y análisis de los modelos estadísticos propuestos constó de los siguientes pasos que se ilustran en la Figura 35:

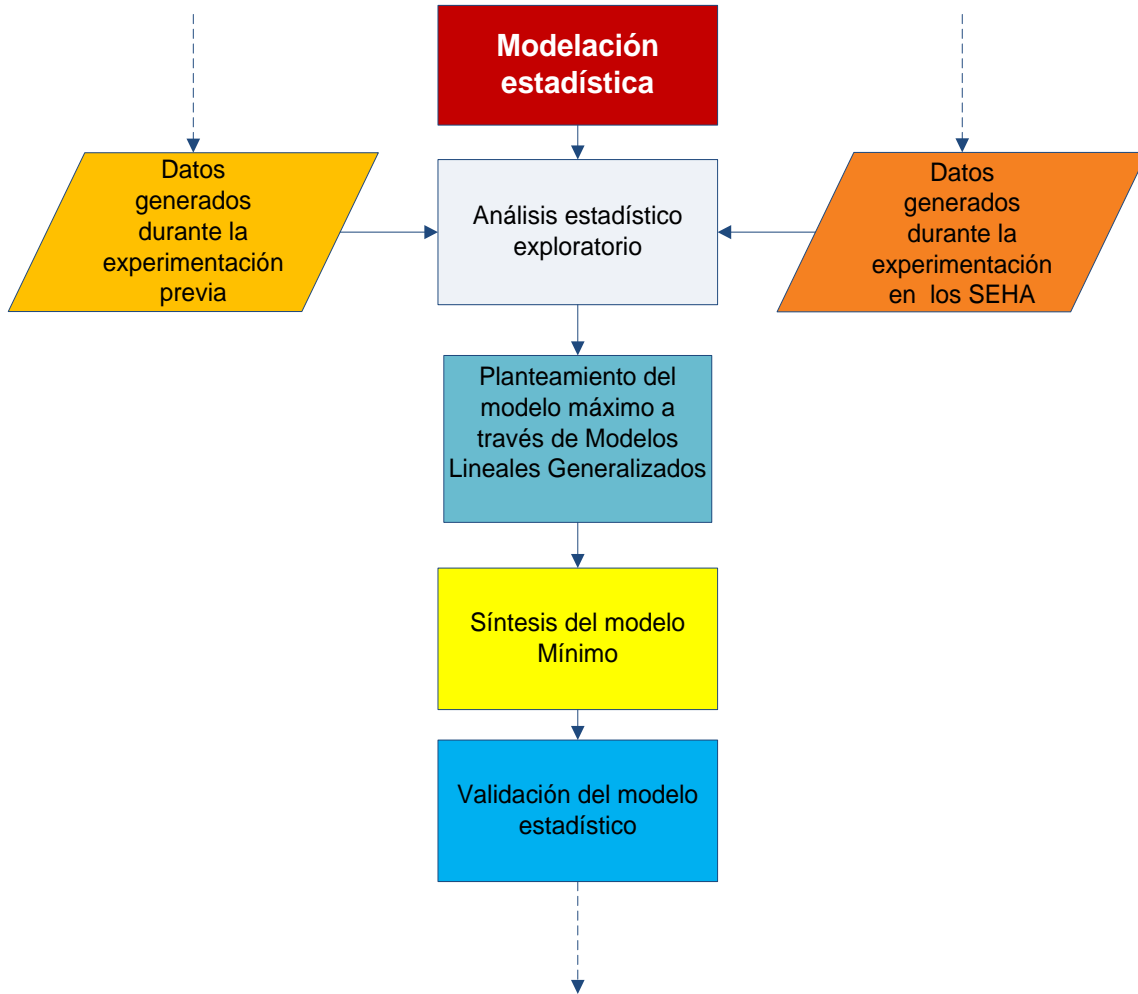


Figura 35. Diagrama del proceso de modelado y análisis estadístico sobre el proceso de nitrificación.

4.6.1 Análisis estadístico exploratorio

El análisis estadístico exploratorio comprendió tratamientos y cálculos de datos necesarios para el planteamiento del GLM (Figura 36). El análisis comenzó realizando el acopio y síntesis de la información en una base de datos generada en el software Access, a partir de la cual se realizó el manejo de la información, se generaron los cálculos y valores (Tabla 12) que permitieron conocer la tendencia general de los datos, así como establecer el tipo de distribución, la estructura del error y la función de enlace a emplear en el GLM.

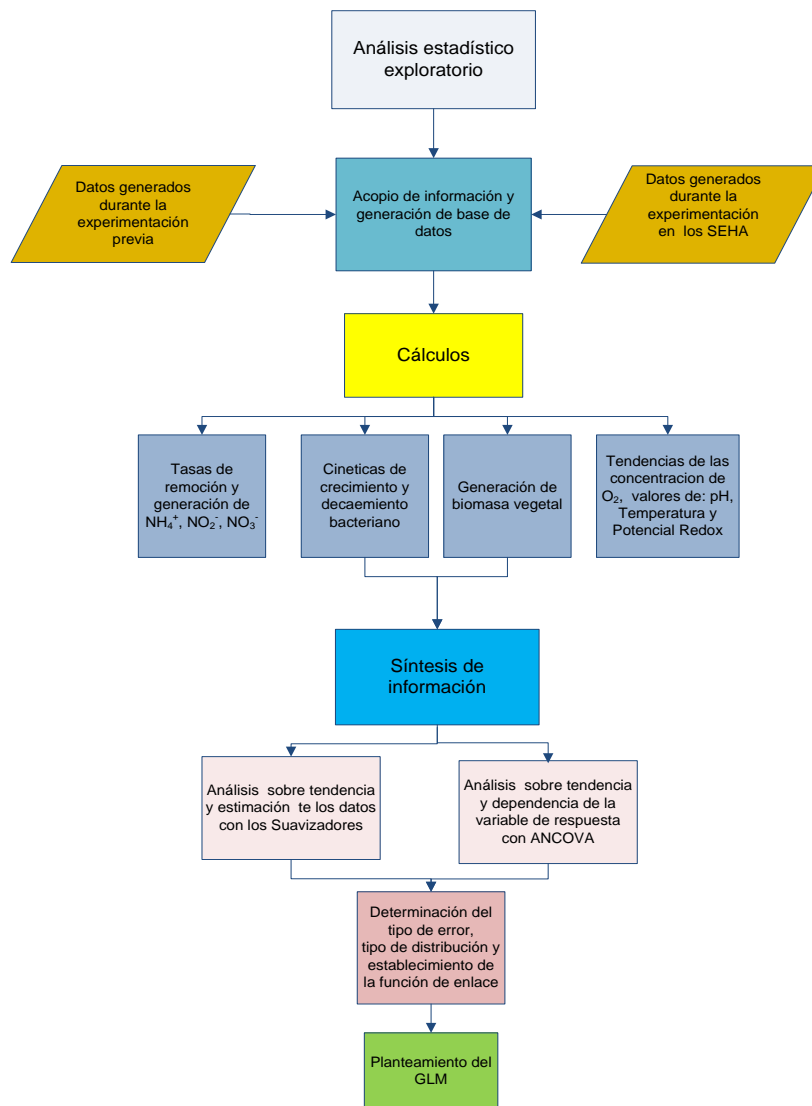


Figura 36. Metodología del análisis estadístico exploratorio.

La información contenida en la base de datos permitió generar cálculos y estimadores para evaluar la dinámica del proceso de nitrificación, tanto en la fase de experimentación previa, como en el seguimiento realizado en los SEHA. Dichos cálculos se indican en la siguiente tabla (detalles en Anexo IV):

Tabla 12. Cálculos y estimadores realizados para el análisis del proceso de nitrificación.

Cálculos y estimadores	Experimentación previa	Experimentación en los SEHA
Concentración del NH_4^+	✓	✓
Tasa de degradación del NH_4^+	✓	✓
K_s de degradación del NH_4^+	✓	✓
Concentración del NO_2^-	✓	✓
Tasa de transformación del NO_2^-	✓	✓
Tasa de degradación del NO_2^-	✓	✓
K_s de transformación del NO_2^-	✓	✓
K_s de degradación del NO_2^-	✓	✓
Concentración del NO_3^-	✓	✓
Tasa de generación del NO_3^-	✓	✓
Tasa de degradación del NO_3^-	✓	✓
K_s de generación del NO_3^-	✓	✓
K_s de degradación del NO_3^-	✓	✓
K_s de degradación de DQO	✓	✓
K_s de disminución del pH	✓	✓
Dinámica de la temperatura	✓	✓
Dinámica de la concentración de Oxígeno disuelto (O.D.)	✓	✓
Dinámica sobre el Potencial Redox	N D	✓
μ_{max}	✓	✓
K_s (bacteriano)	✓	N D
g (tasa de generación bacteriana)	✓	N D
Generación de biomasa bacteriana	✓	N D
Generación de biomasa vegetal	✓	✓

N.D.- Dato no disponible

El análisis exploratorio sobre la tendencia de los datos fue realizado mediante el empleo de suavizadores, los cuales permiten resumir o predecir la tendencia de una respuesta medida en función de uno o más predictores (Hastie y Tibshirani, 1990). El suavizador empleado para tal fin fue el denominado “smoothing spline”, el cual consiste en realizar un ajuste de los datos por segmentos polinomiales de los datos a suavizar. Los segmentos de datos se definen como nudos o puntos de ruptura polinomiales que se ajustan por regresiones cúbicas consecutivas de cada nodo, produciendo así un estimador de media móvil. A partir de dicho estimador, se genera un gráfico de dispersión suavizado (“scatterplot smoothing”), con el cual se estimada la tendencia y el tipo de distribución de la variable de respuesta.

Los resultados de las pruebas con suavizadores son cualitativas, por lo tanto para conocer la tendencia, el tipo de distribución, así como el tipo de error de la variable de respuesta, fue necesario realizar pruebas de análisis de varianza (ANOVA, por sus siglas en ingles) para conocer si existía diferencia entre los distintos tratamientos empleados en los SEHA. Para conocer si existía relación entre las variables estudiadas se realizó un análisis estadístico mediante el análisis de correlación de Spearman. El coeficiente de correlación de Spearman, es una medida de la correlación entre dos variables aleatorias continuas la cual permite conocer si existen relaciones entre los parámetros estudiados, esta correlación es independiente de la escala de medida de las variables. Una vez conocidos los tipos si existía correlación entre los parámetros estudiados, se realizo un análisis de correlación de Pearson, el cual mostró que porcentaje de correlación existe entre las variables comparadas, el cual se interpreta de la siguiente forma: Entre más se aproximan los valores a 1 y -1, la aproximación a una correlación se considera buena, cuanto más se aleja de 1 ó -1 y se acerca a cero, se tiene menos certidumbre en la dependencia lineal, un valor positivo para “r” indica que a medida que una variable crece la otra también lo hace, por el contrario si su valor es negativo, se interpreta que a medida que una variable crece la otra decrece.

El análisis estadístico exploratorio, permitió eliminar la heterogeneidad causada en la variable de respuesta por la influencia de una o más variables cuantitativas (covariables). Facilitando el planteamiento de un modelo preliminar sobre los efectos directos e interacciones que influyen de forma significativa en el proceso de nitrificación en los SEHA y en la pruebas a nivel matraz.

4.6.2 Planteamiento del Modelo Lineal Generalizado

El análisis con GLM fue realizado con el fin de conocer los efectos directos e interacciones que modifican significativamente el proceso de nitrificación, de tal manera que permita modelar con un mayor alcance dicho proceso. Asimismo, para discernir si existen diferencias entre los diferentes tratamientos como en los diferentes puntos de muestreo, de tal manera que este análisis permita establecer los predictores que conformarán el modelo de simulación.

El Planteamiento del GLM requiere definir tres grandes componentes que son imprescindibles en el planteamiento correcto del modelo:

- ✓ Tipo de error
- ✓ Función de enlace
- ✓ Tipo de prueba

Tipo de error

Para modelar la tasa de transformación del NH_4^+ fue necesario conocer el tipo de error o bien la distribución de la probabilidad para tal fin y como resultado del análisis estadístico exploratorio la distribución probabilística de los datos generados presentan una distribución de tipo exponencial negativa para la degradación y positiva para la transformación de los subproductos de la nitrificación. Este tipo de distribución es un caso especial de la distribución Gamma, esta distribución describe procesos donde los datos son continuos y tienen un sesgo positivo si es creciente y negativo si es decreciente, es decir la variable de respuesta siempre es mayor a cero (Crawley, 2002), como se observó en el caso de la oxidación del NH_4^+ , NO_2^- y NO_3^- . Para facilitar

el manejo de los datos y la aplicación del análisis estadístico por medio de los GLM, se utilizaron las constantes de degradación, puesto que al calcular dichas constantes, los valores son transformados por medio de una función logarítmica, obteniendo un tipo de distribución normal en función de la variable de respuesta.

Función de enlace

La función de enlace para los casos que presentan distribución Gamma es la inversa a la variable de respuesta o bien $1/\mu$ (Crawley, 2002). Sin embargo para el análisis de los GLM en la presente investigación se empleó como función de enlace la propia identidad de la variable de respuesta es decir la μ , debido a que se realizó previamente la transformación de la variable de respuesta.

Tipo de prueba

El tipo de prueba empleado para el análisis en GLM en la presente investigación fue la prueba "F" de Fisher con el fin de reducir la sobredispersión generada por la naturaleza de los datos (Crawley 2002). El estadístico "F" permite conocer el índice de correlación entre la variable de respuesta y las covariables, dando como resultado si es significativo el efecto medido sobre la variable de respuesta. Una vez definidos los componentes del GLM fueron probados, en primera instancia los efectos directos y posteriormente se realizaron las pruebas de interacciones, conformándose así un modelo máximo para cada etapa de la nitrificación.

El cálculo y planteamiento del modelo máximo, es un proceso que implica los tres componente antes mencionados (estructura del error, función de enlace, tipo de prueba), a partir de los cuales, se realizó el análisis del GLM, el cual se condujo por medio de comparaciones entre los modelos máximos y modelos teóricos, a través del análisis de devianza, el procedimiento esencialmente comprende una sucesión de pruebas partiendo del los modelos máximos contra modelos teóricos con distintos componentes, derivando en ajustes en el modelo teórico en función de sus significancia hasta llegar al ajuste del modelo mínimo, de tal forma que este modelo permite determinar los efectos que influyen significativamente en el proceso de

nitrificación en los SEHA. Los efectos directos así como las interacciones (Fig. 37), fueron evaluados en primera instancia por medio de pequeños submodelos, evaluando en primer lugar cada parámetro y su efecto directo sobre la variable de respuesta.

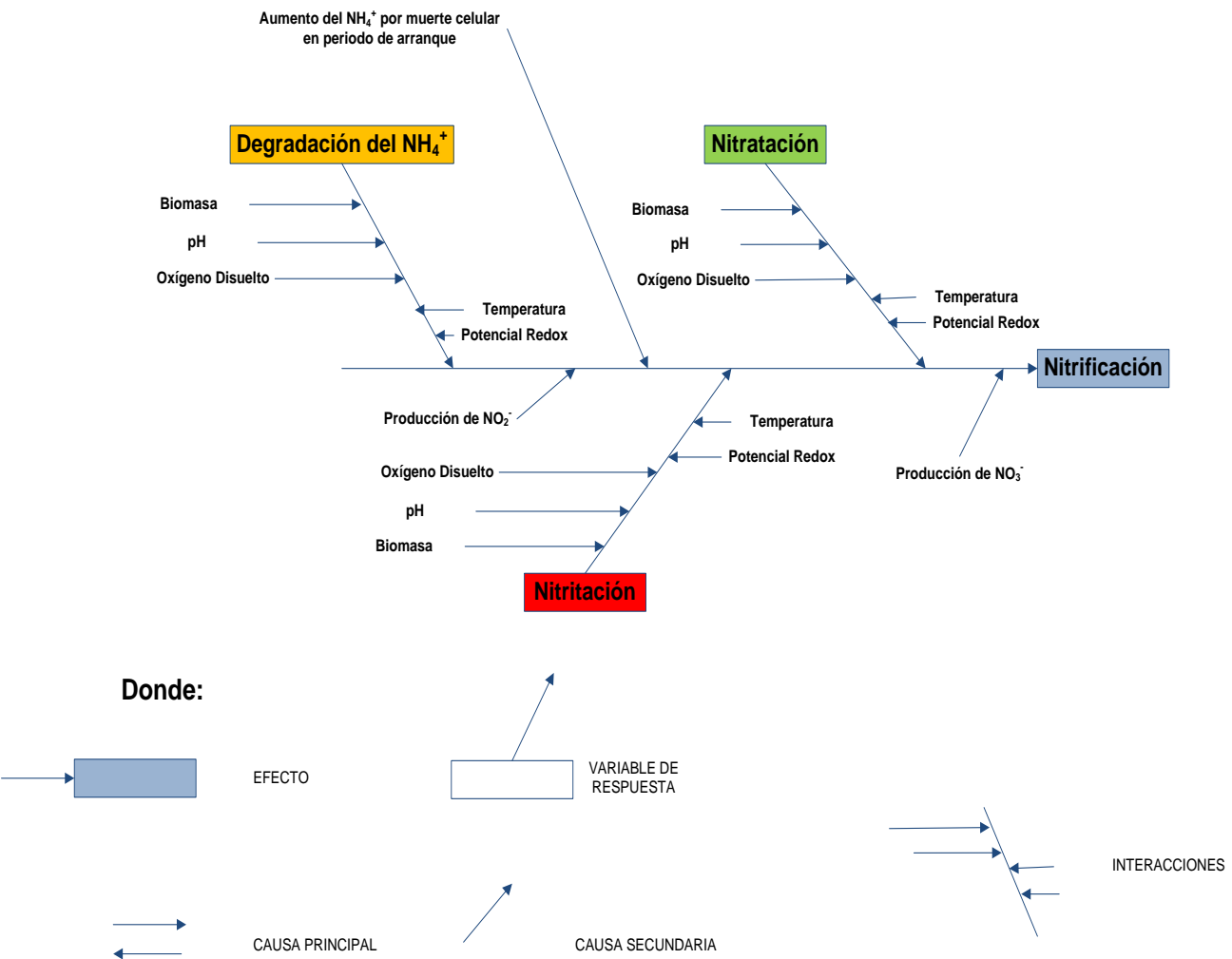


Figura 37. Diagrama de causa y efecto evaluados con GLM

A manera de ejemplo a continuación se presenta la prueba de efecto directo del pH sobre la variable de respuesta según la notación para la interfase del software S-plus:

Para evaluar el pH se desarrolló el siguiente submodelo:

Ecuación 6. Algoritmo para evaluar el efecto directo del pH sobre la constante de degradación del NH_4^+

$$GLM(\text{NH}_4 \sim +\text{pH} + \mu)$$

Donde:

- ◆ Variable de respuesta (NH_4 Constante de transformación del de NH_4^+ en 7 días)
- ◆ Efectos directos
- ◆ Error (Gausiano)

Siguiendo este patrón se evaluó el efecto directo de cada parámetro sobre la variable de respuesta, siendo la μ la función de enlace para cada modelo. Una vez que fueron evaluados los efectos directos, se realizó el análisis de las interacciones que se muestran en la Fig. 38, siguiendo el mismo procedimiento (detalles ver Anexo V)

Analizados los efectos directos e interacciones al 95% de intervalo de confianza, fue posible plantear un modelo general para la comparación de los sistemas por medio de pruebas de ANOVA (detalles Anexo V) y de esta manera discernir que parámetros fueron considerados para el desarrollo de un modelo de simulación que fuese representativo del proceso de nitrificación en los SEHA.

4.7 Modelo de simulación del proceso de nitrificación

El planteamiento del modelo de nitrificación fue realizado por medio de la interfase del software de simulación Stella, el cual permite realizar simulaciones las cuales proporcionan un marco de referencia y una interfase gráfica de usuario, para la observación e interacción cuantitativa de las variables de un sistema. La interfase puede ser utilizada para describir y analizar sistemas biológicos, físicos, químicos muy complejos, complejidad que puede representar muy bien, con sólo cuatro elementos o bloques de construcción: *stock*, *flujo*, *conector* y *convertidor*.

Stock: Es un símbolo genérico para cualquier cosa que acumula o consume recursos.

Flujo: Un flujo es la tasa de cambio de un stock.

Convertidor: Un convertidor se utiliza para tomar datos de entrada y manipularlos para convertir esa entrada en alguna señal de salida.

Conector: Un conector es gráficamente una flecha que permite a la información, pasar entre: convertidores, stocks y flujos. Un conector cuya dirección va de un convertidor uno a un convertidor dos, significa que el convertidor dos es función del convertidor uno. Es decir, el convertidor uno afecta al convertidor dos.

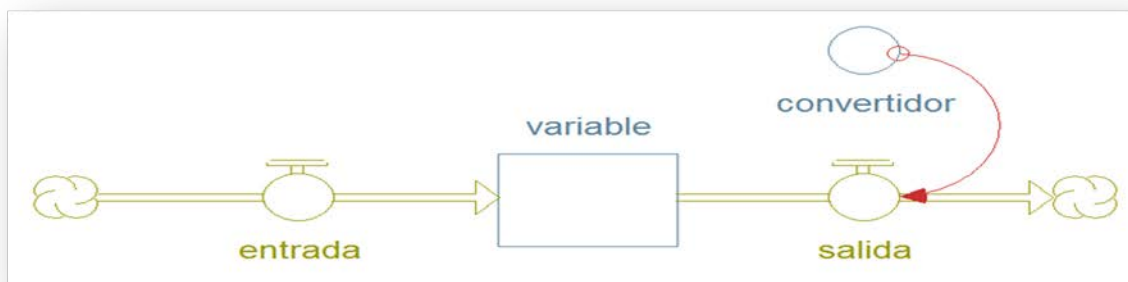


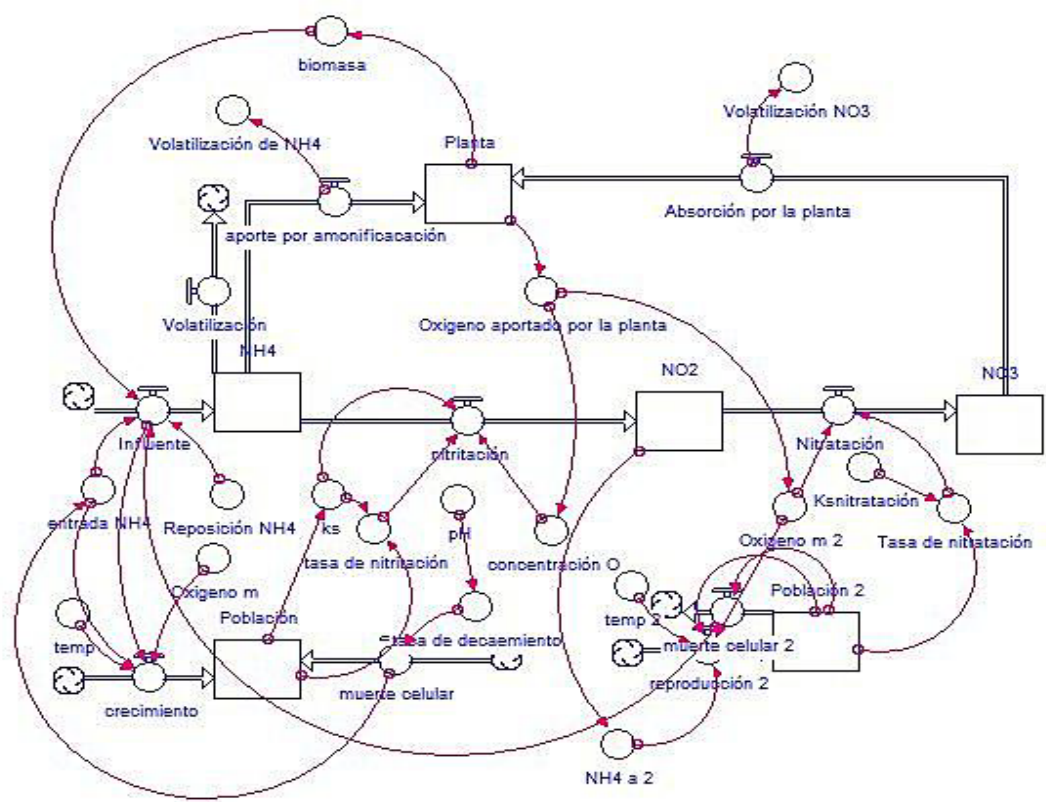
Figura 38. Interfase del software Stella.

4.7.1 Planteamiento del modelo de simulación

Como se ilustró en la Figura 11, las etapas de un modelaje están comprendidas en 4 fases: desarrollo del modelo conceptual; desarrollo del medio cuantitativo; evaluación del modelo y uso del modelo. Durante estas fases fue desarrollado el modelo de simulación del proceso de nitrificación en sistemas experimentales que simulan humedales artificiales como a continuación se detalla.

4.7.1.1 Modelo conceptual

El modelo conceptual es el primer paso la modelación, ya que este debe plantear el comportamiento del fenómeno a estudiar. A partir de este, se construye el modelo cuantitativo y sirve como referencia para realizar las pruebas sobre las diferentes dinámicas y flujos del nitrógeno durante el proceso de nitrificación en los SEHA. En la Fig. 39 se puede observar el modelo conceptual planteado en la presente investigación, el cual está dividido en 3 bloques. El primer bloque es el modelo “duro” sobre la dinámica de la nitrificación, el cual consta de tres módulos de stock, es decir cada fase del proceso de nitrificación (amonificación, nitritación, y nitratación). La segunda parte del modelo comprende los modelos que abordan las dinámicas de degradación y crecimiento bacteriano por medio de los submodelos asociados a la nitritación y nitratación respectivamente, los cuales proyectan las dinámicas relacionadas a los microorganismos y las implicaciones que estos tienen en cada proceso y se encuentran interconectados por medio de los conectores (flechas rojas Fig.39) los cuales denotan interacciones entre los predictores. Sin embargo este sólo es el modelo conceptual y por lo tanto este fue el punto de partida hasta llegar al modelo cuantitativo como resultado de los análisis estadísticos y la validación del modelo.



Modelo sobre las dinámicas

Modelo sobre el proceso de la nitrificación

Figura 39. Modelo conceptual del proceso de nitrificación en interfase del Software STELLA

4.7.2 Modelo cuantitativo sobre la dinámica de la nitrificación en los SEHA

El modelo cuantitativo fue planteado, tomando como base la estructura del modelo conceptual. El primer paso fue realizar el planteamiento de las dinámicas del sistema, es decir las pruebas necesarias para realizar el intercambio en los flujos de materia entre los componentes del modelo, una vez realizadas estas pruebas, se plantea la forma matemática general del modelo (detalles ver Anexo VI). La estructura matemática empleada en este modelo fue establecida por ecuaciones diferenciales. Este tipo de estructura aporta una gran flexibilidad para explicar el alto nivel en la dinámica de los sistemas ecológicos (Grant, 2001). Posteriormente se eligió la unidad de tiempo en el cual se desarrolla modelo. La unidad de tiempo se define con (Δt) que transcurre entre las soluciones sucesivas de todas las ecuaciones del modelo y permanece constante a lo largo del modelo de simulación. El siguiente paso fue plantear las ecuaciones del modelo dentro de los convertidores (detalles ver Anexo VI), los cuales modifican, calculan y estiman las variables de respuesta en cada stock o módulos dentro del sistema de simulación.

Con base en los resultados obtenidos en la sección de análisis estadístico, se experimentó probando con los datos generados durante la fase de experimentación previa. Una vez que el modelo fue validado con estos datos, el modelo fue probado con los datos generados a partir de los SEHA

Con base a los resultados obtenidos en el modelo estadístico los cuales permitieron conocer y establecer los efectos directos e interacciones que influyen de forma significativa en el proceso de nitrificación dentro de los SEHA, se realizaron corridas probando dos unidades de tiempo, se evaluaron intervalos de uno y siete días. El siguiente paso fue plantear las ecuaciones del modelo dentro de los convertidores (detalles ver Anexo V), los cuales modifican, calculan y estiman las variables de respuesta en cada stock o módulos dentro del sistema de simulación.

Una vez comprobadas las dinámicas de flujo en el modelo, se planteó el modelo cuantitativo para realizar las corridas con los datos generados durante la experimentación.

4.7.2.1 Modelo sobre la dinámica de la nitrificación

Este modelo está compuesto por 3 bloques de “stock”, para cada producto nitrogenado en el proceso de nitrificación (NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^-), los cuales están en función de los modelos de microorganismos y plantas, estos proveen información sobre las tasas de degradación y producción de los diferentes compuestos nitrogenados, así como cinéticas de crecimiento y decaimiento, generación de biomasa y factores físico-químicos que influyen en la dinámica de la nitrificación (detalles ver anexo V).

4.7.2.2 Modelo sobre la dinámica población bacteriana en los SEHA

Los resultados de los experimentos sobre el componente microbiano, sirvieron como base para realizar las pruebas en los modelos sobre la dinámica de la población bacteriana en condiciones controladas, permitiendo realizar las pruebas del modelo cuantitativo. El modelo bacteriano de nitrificación, está dividido en dos partes: (1) el submodelo que comprende el proceso de nitrificación, dentro del cual los organismos responsables de realizar la degradación de NH_4^+ , oxidan la molécula para formar NO_2^- y (2) el modelo de la nitratación, el cual parte del NO_2^- como sustrato para los microorganismos productores de NO_3^- .

4.7.2.3 Modelo bacteriano nitritante

El modelo bacteriano sobre la nitrificación (Figura 40) consta de cuatro módulos, el stock de oxígeno, el stock de nitrógeno, el stock de oxidación de NH_4^+ a NO_2^- y por último el de cinética bacteriana. El módulo de oxígeno es el encargado de calcular y simular la tasa de consumo de oxígeno, en función de la concentración inicial disponible y la tasa de consumo encontrada en los datos experimentales. Este módulo está conectado al

módulo de oxidación de NH_4^+ y al módulo de cinética bacteriana, pues el cálculo y simulación de estos módulos dependen de la concentración de oxígeno.

4.7.2.4 Submódulo NH_4^+

El módulo NH_4^+ degradado (color verde) es el responsable de simular y calcular las tasa de degradación de esta molécula (detalles ver Anexo V). El cálculo de la degradación depende del módulo de microorganismo (color rojo), del módulo intermediario que aborda la producción de NO_2^- (color azul), así como el módulo de oxígeno (color morado), por lo tanto el módulo “ NH_4^+ degradado” es alimentado por los tres módulos (Figura 40). El módulo NH_4^+ degradado además de calcular y simular las tasa de degradación y transformación del NH_4^+ , sirve como referencia para modular la respuesta del stock de crecimiento bacteriano, ya que este depende de la concentración del amonio como sustrato a partir del cual se alimenta el módulo de cinética bacteriana.

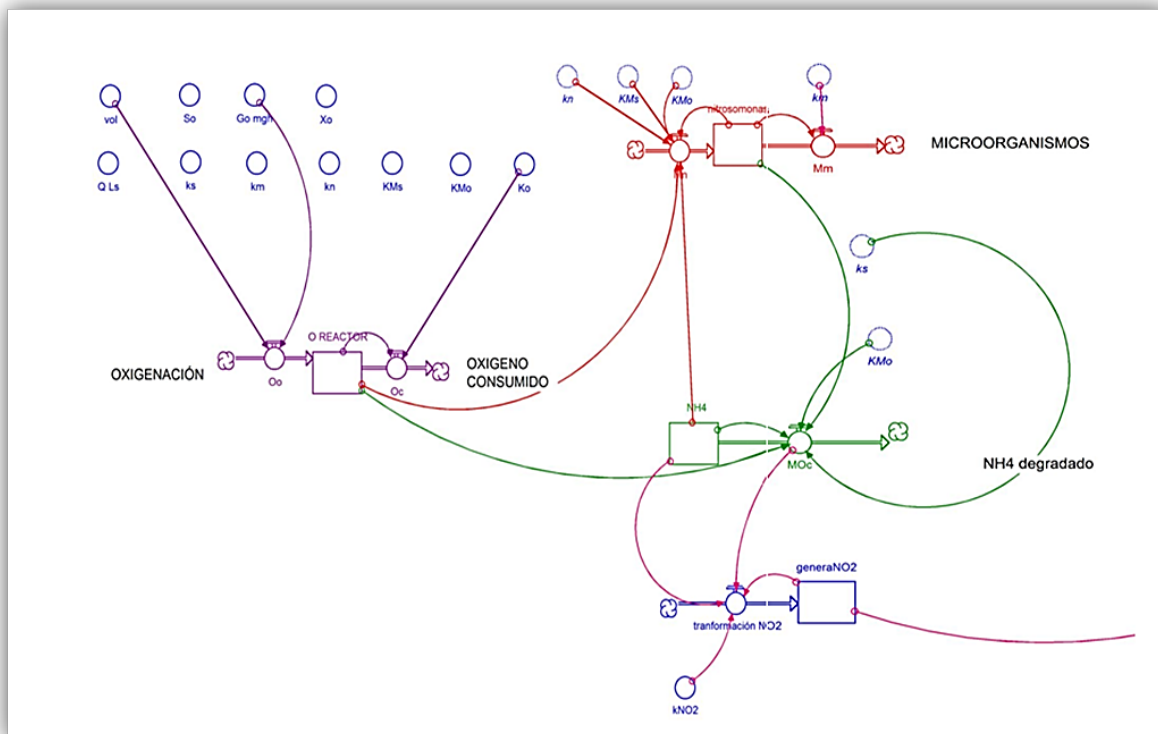


Figura 40. Modelo de la nitrificación en interfase del software Stella.

4.7.2.5 Submódulo de Cinética Bacteriana

El módulo de cinética bacteriana (color rojo, Figura 40), es alimentado por los módulos de oxígeno (color morado) y el módulo “ NH_4^+ degradado” (color verde, Figura 41). Dentro de este módulo son calculadas y simuladas las cinéticas de crecimiento, decaimiento, así como las tasas de transformación y generación de biomasa. Este módulo es capaz de simular las cinéticas de crecimiento poblacional en función de la biomasa inicial, la cantidad de amonio y la concentración de oxígeno en un sistema, o bien, con base en condiciones experimentales.

4.7.2.6 Submódulo NO_2^-

El módulo “ NO_2^- degradado” (Figura 40) es el responsable de simular y calcular la tasa de generación de esta molécula. La generación de este compuesto depende de la cantidad de microorganismos degradadores de amonio y de la tasa de generación de NO_2^- y en menor medida del O_2 , razón por la cual este módulo es alimentado por los tres módulos. Este módulo además de calcular y simular la tasa de generación y transformación del NO_2^- sirve como referencia para alimentar al stock del siguiente bloque en el modelo el cual es el módulo de la nitritación.

4.7.2.7 Modelo bacteriano nitratante

El modelo bacteriano nitratante (color rojo) Figura 41, consta de cuatro módulos, el stock de oxígeno (color morado), el stock “ NO_2^- degradado”, el stock de oxidación de NO_2^- a NO_3^- y por último el de cinética bacteriana. El módulo de oxígeno es el encargado de calcular y simular la tasa de consumo de oxígeno, en función de la concentración inicial disponible y la tasa de consumo encontrada en los datos experimentales, este módulo está conectado al módulo de oxidación de NO_2^- y al módulo de cinética bacteriana pues el cálculo y simulación de estos módulos dependen de la concentración de oxígeno.

El módulo NO_3^- es el encargado de simular y calcular las tasa de generación de esta molécula, la generación de este compuesto depende de la cantidad de microorganismos degradadores de nitritos y de la tasa de generación de NO_2^- y en menor medida del O_2 , razón por la cual este módulo es alimentado por los tres módulos. El módulo tiene la capacidad de calcular y simular la tasa de generación y transformación del NO_3^-

4.7.3 Evaluación y validación del modelo de simulación sobre la dinámica de la nitrificación en HA

El objetivo de esta etapa fue evaluar la utilidad del modelo para describir el proceso de nitrificación en los SEAH. Por una parte fue evaluada la concordancia entre el comportamiento del modelo y los patrones esperados, así como la concordancia entre las predicciones realizadas en el modelo y los datos del sistema real (SEHA).

La evaluación de la concordancia entre el comportamiento del modelo y los patrones esperados fue realizada con el fin de encontrar resultados incoherentes en el flujo y cálculo de estimadores, debido a que si no son revisadas en este punto no puede llevarse a cabo el ajuste del modelo. Durante esta etapa se realizó un ajuste en los predictores e interacciones que empleo el modelo en función del análisis estadístico, de tal manera que sólo se utilizaron los efectos directos e interacciones que modificaban significativamente el proceso de nitrificación con intervalo de confianza del 95 % según los resultados estadísticos previamente realizados.

Por último el modelo de simulación fue evaluado comparando los datos predichos por el modelo con los datos experimentales, realizando una comparación por medio de ANOVAS entre los resultados observados y predichos.

Capítulo 5

Resultados y discusión

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Resultados de la experimentación previa

5.1.1 Resultados de la caracterización del material de empaque

Las pruebas fisicoquímicas del material de empaque registraron los siguientes resultados (Tabla 13).

Tabla 13. Resultados de las pruebas de densidad al material de empaque

Propiedad	Unidades	Resultados
Densidad real	g/cm ³	2.40 ± 0.21
Densidad aparente	g/cm ³	1.494 ± 0.014
Porosidad	%	32.35 ± 6.48
Conductividad hidráulica	m/s	2.02 x 10 ⁻³ ± 1.01 x 10 ⁻⁴
Contenido de CarbonoT inicial	%	0.017
Contenido de NitrógenoT inicial	%	0.006
Contenido de CarbonoT final	%	0.026
Contenido de NitrógenoT final	%	0.020

Complementariamente se realizó una difracción de rayos-x (ver anexo V) para conocer la composición y estructura cristalina de la grava de dióxido de sílice. Este análisis reveló que la composición es dióxido de silicio (SiO₂) en forma de cuarzo y su estructura es hexagonal.

5.1.2 Resultados del montaje de los sistemas

Durante el montaje de los SEHA se evaluaron los tiempos de llenado y vaciado, así como la capacidad de carga hidráulica, los cuales sirvieron para el ajuste de la programación del sistema de automatización y puesta en marcha de los experimentos dando como resultados los datos que se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. Volúmenes y tiempos de los SEHA en diferentes condiciones

Parámetro evaluado	Unidades	Resultados
Capacidad del SEHA sin empacar	Litros	129.80
Capacidad del SEHA empacado	Litros	54.02
Tiempo de llenado del SEHA sin empacar	minutos	7.34
Tiempo de llenado del SEHA empacado	minutos	9.05
Tiempo de vaciado del SEHA sin empacar	minutos	1.04
Tiempo de vaciado del SEHA empacado	minutos	5.23

De esta manera se establecieron los tiempos de llenado en 9.2 min y el tiempo de vaciado o apertura de válvula en 15 min para permitir el vaciado y escurrimiento en los SEHA.

5.1.3 Resultados del componente vegetal

El componente vegetal se monitoreó durante tres meses, se realizaron podas al componente vegetal cada 30 días manteniendo una longitud promedio de la planta de 60 cm, la materia vegetal retirada fue pesada y se registró tanto el peso seco como el peso húmedo Los resultados se observan en la Tabla 15.

Tabla 15. Promedio de materia vegetal generada

mes	Promedio peso seco	Promedio peso húmedo
1	17.57 g	118.03 g
2	18.02 g	124.28
3	17.47 g	116.9 g

n=24

Con un total generado de 56.03 g de peso seco y 359.21 g peso húmedo durante tres meses.

5.1.4 Resultados del componente microbiano

5.1.4.1 Aislamiento de microorganismos nitrificantes

Bacterias aisladas en medio selectivo para microorganismos oxidadores de amonio modificado de Atlas (2005) con 7 días de incubación a 28° C (Fig. 42 y Fig. 43).

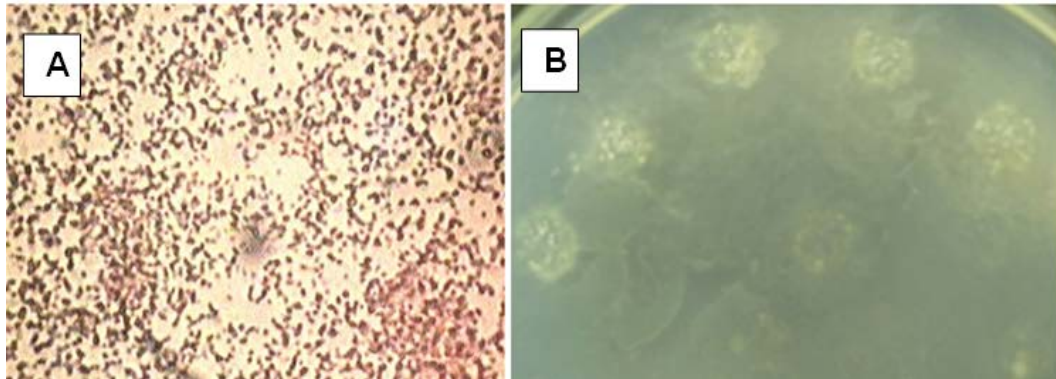


Figura 42. Bacterias nitrificantes A) Preparación con tinción de Gram de bacterias nitrificantes a 100X obtenidas a partir de medio enriquecido con amonio B) Colonias de bacterias nitrificantes en medio sólido enriquecido con amonio.



Figura 43. Colonias aisladas de bacterias nitrificantes.

5.1.4.2 Resultados de la identificación morfológica

Como resultado del aislamiento e identificación morfológica del componente microbiano se obtuvo que la reacción a la tinción de Gram fue negativa (Figura 44; C y D). La morfología celular observada en las preparaciones microbiológicas fue del tipo bacilococos, mostrando ambas características, correspondencias con las descritas para bacterias del tipo *Nitrosomonas* sp. (Holt, 1999).

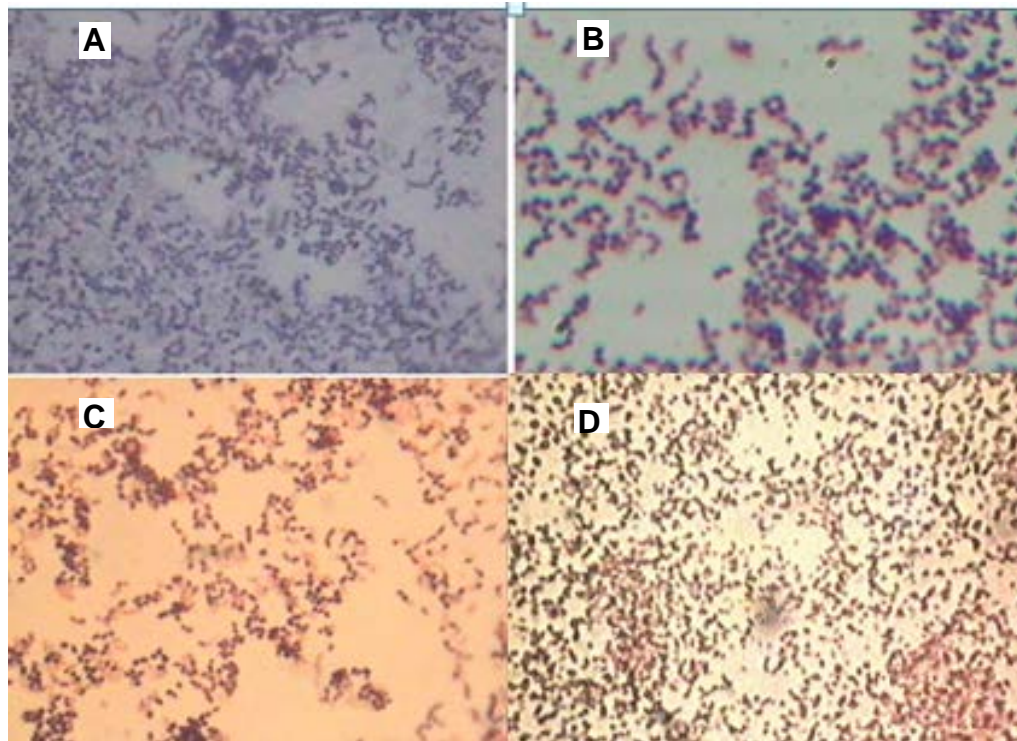


Figura 44. Observaciones con microscopía óptica en aumento de 100X de colonias de bacteria nitrificantes: A, B.-Tinción con Azul de metileno, C, D.-Tinción de Gram

Las tinciones de Neisser y Sudan facilitan la identificación bacteriana, ya que estas tinciones permiten distinguir entre los grupos de bacterias *Nitrosomonas* sp. y *Nitrobacter* sp. (Rodríguez, 2003). La tinción de Neisser es una técnica diferencial la cual hace posible teñir la presencia de polifosfatos almacenados en las células. La reacción a esta tinción es negativa cuando las células se tiñen suavemente con un color amarillo o café, si la reacción es positiva las células se tiñen intensamente de color azul o negro. Como se puede apreciar en la Figura 45 la reacción de las células a esta tinción es negativa, fortaleciendo la tendencia sobre la identidad de los microorganismos,

apuntando a que las células bacterianas aisladas son *Nitrosomonas* sp. ya que este tipo de microorganismos no presentan acumulaciones de corpúsculos metacromáticos ni presencia de polifosfatos como en el caso de *Nitrobacter* (Rodríguez, 2004).

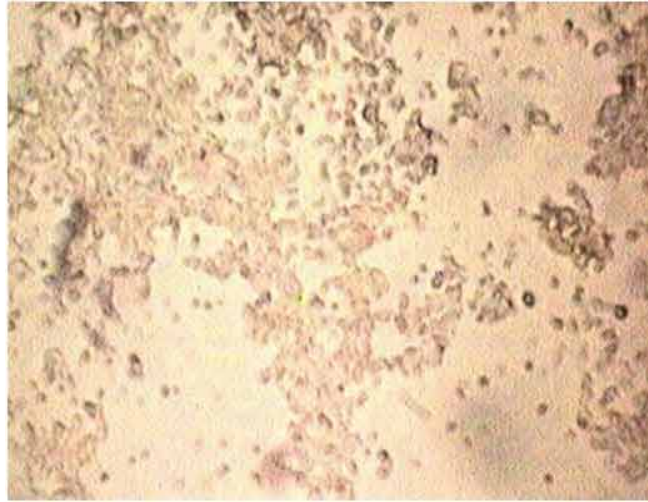


Figura 45. Tinción de Neisser 100x de colonias de bacterias nitrificantes

La tinción con sudan IV permite teñir acumulaciones de lípidos en color rojo o bien tiñe corpúsculos metacromáticos en color negro. Como se puede apreciar en la Figura 46, la reacción a la tinción fue negativa, este resultado apoya la hipótesis sobre la identificación de los microorganismos, ya que no se ha reportado que las células de *Nitrosomonas* sp. presenten acumulaciones de lípidos ni corpúsculos metacromáticos como es el caso de *Nitrobacter* sp. (Rodríguez, 2003).

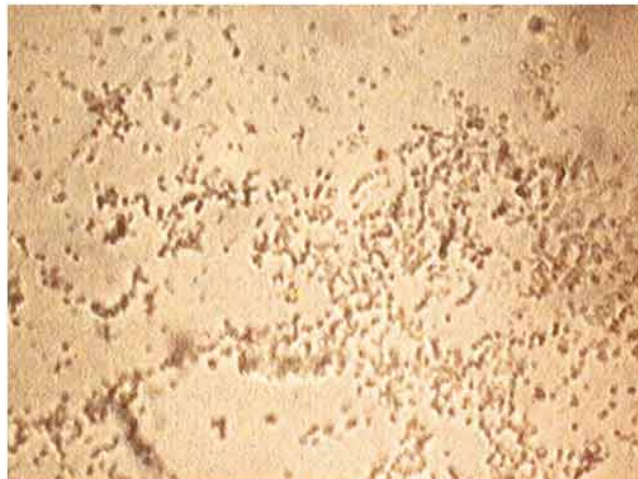


Figura 46. Tinción de Sudan IV 100x de colonias de bacterias nitrificantes

El resultado de la prueba de reactividad en medio de cultivo semisólido con urea (Atlas, 2005), permitió descartar a todo los grupos de la subclase γ -*Proteobacteria* y acotar la identificación del organismo a sólo cuatro especies del grupo β -*Proteobacteria*, de las cuales debido a la forma celular que presentaron y tomando como referencia lo reportado por Holt (1999), se trata presumiblemente de una *Nitrosomonas* sp., sin embargo se recurrió a las técnicas de biología molecular para tener la certeza en cuanto a la especie de microorganismo que fue aislado. Resultados de la identificación molecular de las bacterias nitrificantes

La prueba de electroforesis mostró que el peso experimental fue de 400 pb, siendo este muy similar al peso teórico calculado el cual fue de 398 pb (Fig.47), mostrando una correspondencia del valor esperado con el valor observado.

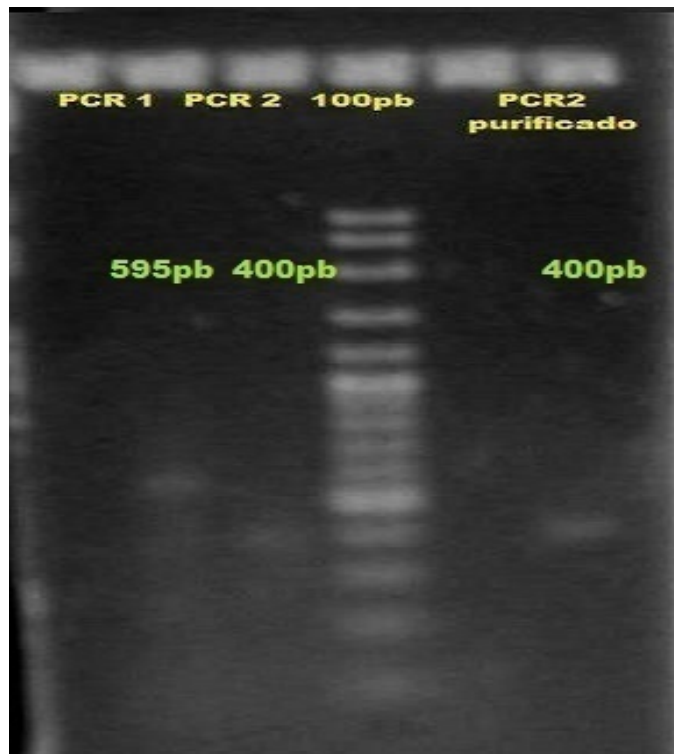


Figura 47. Electroforesis del producto del PCR obtenido de bacterias aisladas: (PCR1) Producto del PCR.- (PCR2) PCR anidado a partir del PCR1. (100 pb) Marcador de peso de 100 pb. (PCR2).- producto purificado del PCR2 para secuenciación.

La muestra obtenida del PCR purificado fue secuenciada. La secuencia (detalles ver Anexo II) fue comparada en línea por medio de un BLAST a través del software bioedit, dando como resultado una coincidencia del 99% con la secuencia del gen amoA perteneciente a *Nitrosomonas europaea* (Figura 48).

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max Ident
AL954747.1	Nitrosomonas europaea ATCC 19718, complete genome	1995	3991	100%	0.0	100%
U08050.1	Nitrosomonas europaea ammonia monooxygenase acetylene-binding	1995	1995	100%	0.0	100%
AF058692.1	Nitrosomonas europaea ammonia monooxygenase subunit A2 (amoA)	1993	1993	99%	0.0	100%
AF058691.1	Nitrosomonas europaea ammonia monooxygenase subunit A1 (amoA)	1988	1988	99%	0.0	99%
AB079053.1	Nitrosomonas sp. ENI-11 amoC2, amoA2, amoB2 genes for ammonia	1655	1655	100%	0.0	94%
AB079054.1	Nitrosomonas sp. ENI-11 amoC1, amoA1, amoB1 genes for ammonia	1655	1655	100%	0.0	94%

Figura 48. Resultado del alineamiento de secuencias (BLAST: Basic Local Alignment Search Tool) obtenida del DNA proveniente de la bacteria nitrificante aislada

Por lo cual se concluye que la bacteria nitrificante que fue aislada a partir de la muestra ambiental fue *Nitrosomonas europaea* la cual es la encargada de oxidar el amonio a nitritos.

5.1.4.3 Resultados sobre la identificación de bacterias heterótrofas

Las interpretaciones que se realizaron según a Balows (1991) mostraron la presencia las siguientes cepas bacterianas

- *Flavobacterium*
- *Aeromonas schubertii*
- *Achromobacter xylosoxidans*
- *Alcaligenes*
- *Moraxella*
- *Agrobacterium*

Una vez realizada la identificación del componente microbiano, se realizó el estudio sobre la cinética de degradación del amonio y la cinética de crecimiento celular de la bacteria nitrificante que fue aislada (*Nitrosomonas europaea*). Conjuntamente se realizó el cálculo de la cinética de degradación del amonio por parte del consorcio bacteriano, el cual fue empleado para el inóculo del componente microbiano en los SEHA.

5.1.5 Resultados sobre las cinéticas poblacionales de bacterianas y degradación del NH_4^+

Los resultados generados sobre cinéticas de degradación del NH_4^+ en medios enriquecidos con amonio e inoculados con bacterias *Nitrosomonas europaea*, permitieron realizar los cálculos y estimaciones sobre la dinámica de degradación y transformación del amonio hacia nitritos y nitratos bajo condiciones controladas. La degradación del amonio así como la producción de nitritos y nitratos son resultado en gran medida de la actividad metabólica de los organismos nitrificantes (Kadlec, 2009), por lo tanto el seguimiento de las dinámicas poblacionales de *Nitrosomonas europaea* evidencian la existencia de una fuerte correlación y especificidad al amonio como fuente energética. El seguimiento de las cinéticas bacterianas en los medios enriquecidos condujo a los siguientes resultados (Tabla 16).

Tabla 16. Cinéticas bacterianas de *Nitrosomonas europaea* en medios enriquecidos con NH_4^+

Parámetro	Unidades	Medio enriquecido amonio	Medio enriquecido amonio mas glucosa
μ_{max}	UFC/mL/ días	0.015	0.108
K_s (bacteriano)	UFC media/mL/día (mg L ⁻¹)	0.007	0.278
g (tasa de generación bacteriana)	generaciones (día ⁻¹)	2.14	2.56
Generación de biomasa	mg/día	1.8×10^{-3}	5.1×10^{-2}
Degradación por día del NH_4^+	mg/L de NH_4^+ degradado	4.15 ⁺	3.86
μ	Tasa específica de crecimiento bacteriano con sustrato limitado (día ⁻¹)	0.461	0.558
K_s (Monod)	Constante de afinidad bacteria a un sustrato limitado (mg L ⁻¹)	0.060	0.279
Remoción del NH_4^+ en 29 días	mg/L de NH_4^+	55.37	41.68

n=36

El crecimiento bacteriano para ambos tratamientos alcanzó la μ_{max} al cabo de 21 días, con un valor de 0.015 para el medio con amonio y 0.108 para el medio con amonio con adición de glucosa como fuente de carbono. La k_s obtenida fue 39.79 veces mayor para el medio con glucosa en comparación al que no se le adicionó fuente de carbono (Tabla 17). La gran diferencia del crecimiento bacteriano entre ambos tratamientos se puede apreciar desde los primeros siete días del experimento (Figura 49), periodo durante el cual la cantidad de organismos en el medio con glucosa fue 1.65 veces mayor en comparación con el medio sin fuente de carbono. El descenso en la población bacteriana se registró durante los últimos 7 días del experimento, asociado al agotamiento del sustrato por la oxidación de la molécula de amonio a nitritos (Figura 49).

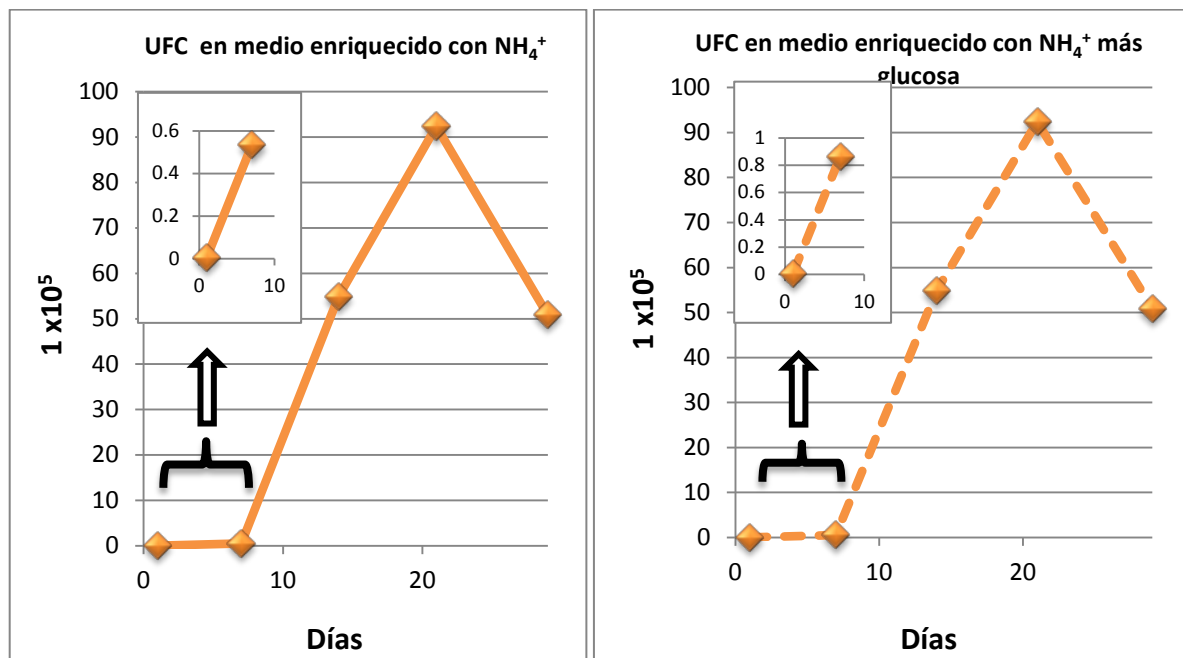


Figura 49. Curva de crecimiento bacteriano en dos diferentes medios enriquecidos con amonio

En cuanto a la tasa de generación bacteriana se obtuvieron valores muy similares entre los tratamientos: 2.14 generaciones por día para medio sin glucosa (NH₄M) y 2.56 para medio con glucosa (NH₄MG), presentando un crecimiento lento en comparación con otro tipos de bacterias como las heterótrofas, los cuales se duplican tan sólo en un periodo de horas. Para ambos tratamientos las tendencias sobre la

dinámica del crecimiento bacteriano se comportaron similares, sin embargo como se puede apreciar en la Figura 49, la cantidad de microorganismos es aproximadamente 7 veces mayor para el medio con glucosa en relación al medio sin fuente de carbono.

Esto obedece en gran medida a que en el medio NH₄M, la única fuente de carbono empleada provenía del CaCO₃ en una concentración teórica de de 2 mg /L, mientras que para el medio con adición de glucosa la concentración de fue de 70 mg/L, razón por la cual se observa un mayor crecimiento en la biomasa celular, sin embargo las tendencias de crecimiento celular para ambos mantienen una relación de 7:1.

Como resultado del análisis de las cinéticas de degradación del amonio, se obtuvo que el porcentaje de degradación para el amonio en el medio NH₄M alcanzó el 87.77 % el cual equivale a la degradación de 57.37 mg/L de NH₄⁺ en 28 días, el mayor porcentaje de degradación se registró dentro de los primeros 14 días con un 64.38 %, la menor concentración fue registrada el día 21 con 8.4 mg/L (Figura 50). Para el medio NH₄G se obtuvo un porcentaje de degradación para el amonio del 62.40 % al cabo de 28 días, el mayor porcentaje de degradación se registró dentro de los primeros 14 días con un 83.18 % así como la menor concentración del NH₄⁺ con 11.17 mg/L (Figura 50), cabe destacar que el porcentaje de degradación a 14 días en el medio NH₄G es mayor al total, debido a un aumento en la concentración del amonio en el periodo que comprendió del día 15 al 27 (Figura 51) asociado a la muerte celular, por lo tanto al realizar el balance sobre la degradación del amonio a 28 días este resulta menor al alcanzado al día 14. En ambos casos el mayor porcentaje de degradación para el amonio fue alcanzado en los primeros 14 días.

En cuanto a la concentración de NO₂⁻ para ambos tratamientos (Figura 52), las concentraciones más altas fueron encontradas al día 14, para el medio NH₄M la concentración máxima registrada de NO₂⁻ fue de 4.19 mg/L, mientras que para el medio NH₄G fue de 4.55 mg/L, con una constante de transformación (ksNO₂⁻) de 0.014 y 0.018 respectivamente.

La concentración de nitritos está fuertemente asociada a la oxidación del NH_4^+ (Figura 51 y 52). Las pruebas de coeficiente de correlación realizadas entre estos dos parámetros para ambos tratamientos, dan como resultado un coeficiente de -0.86 para el medio NH4M y -0.97 para el medio NH4G, denotando que existe una fuerte correlación lineal inversa, siendo -1 el 100% de correlación.

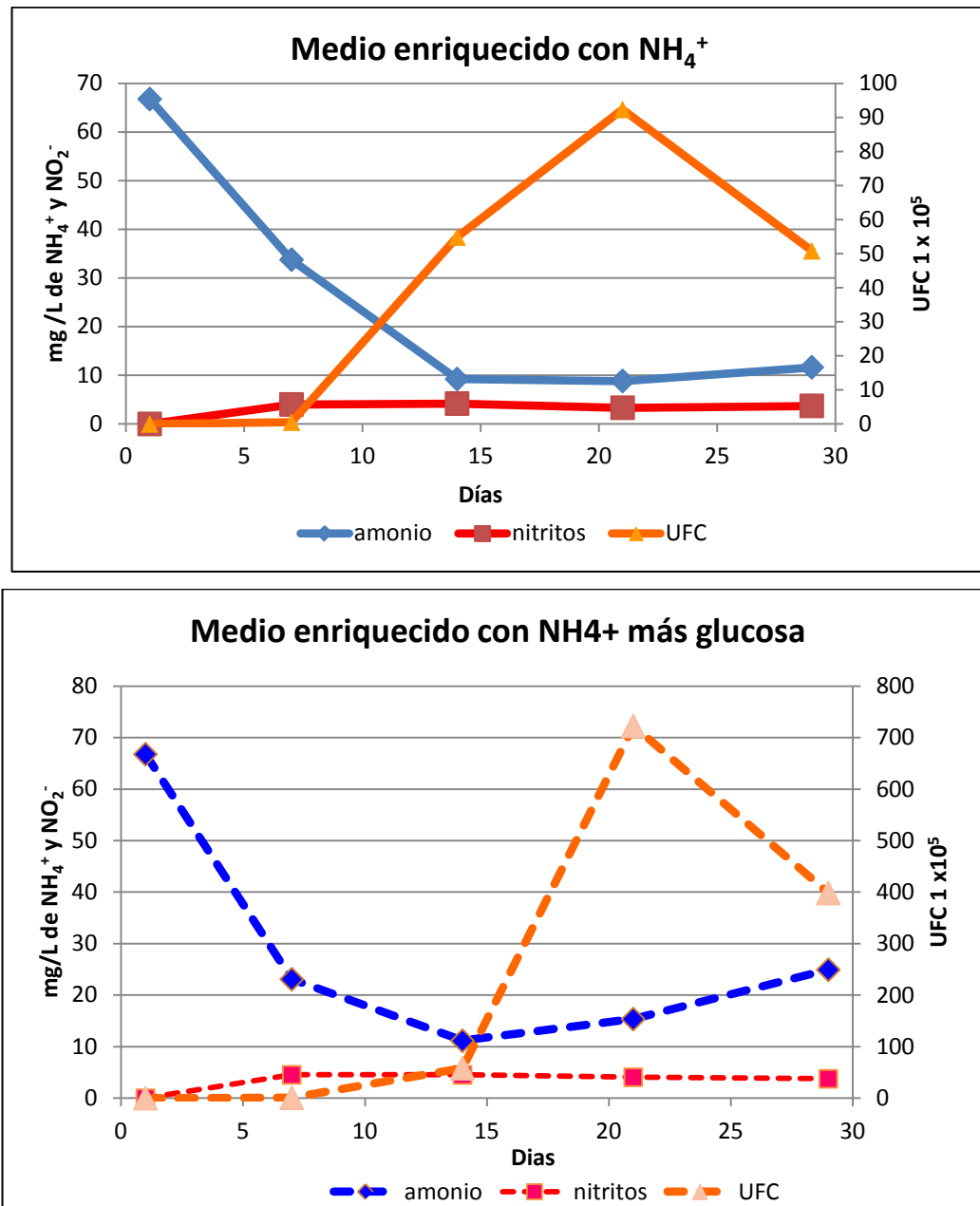


Figura 50. Dinámicas sobre la degradación del NH_4^+ , producción de NO_2^- y crecimiento bacteriano en medio enriquecido con amonio e inoculado con bacterias *Nitrosomonas europaea*

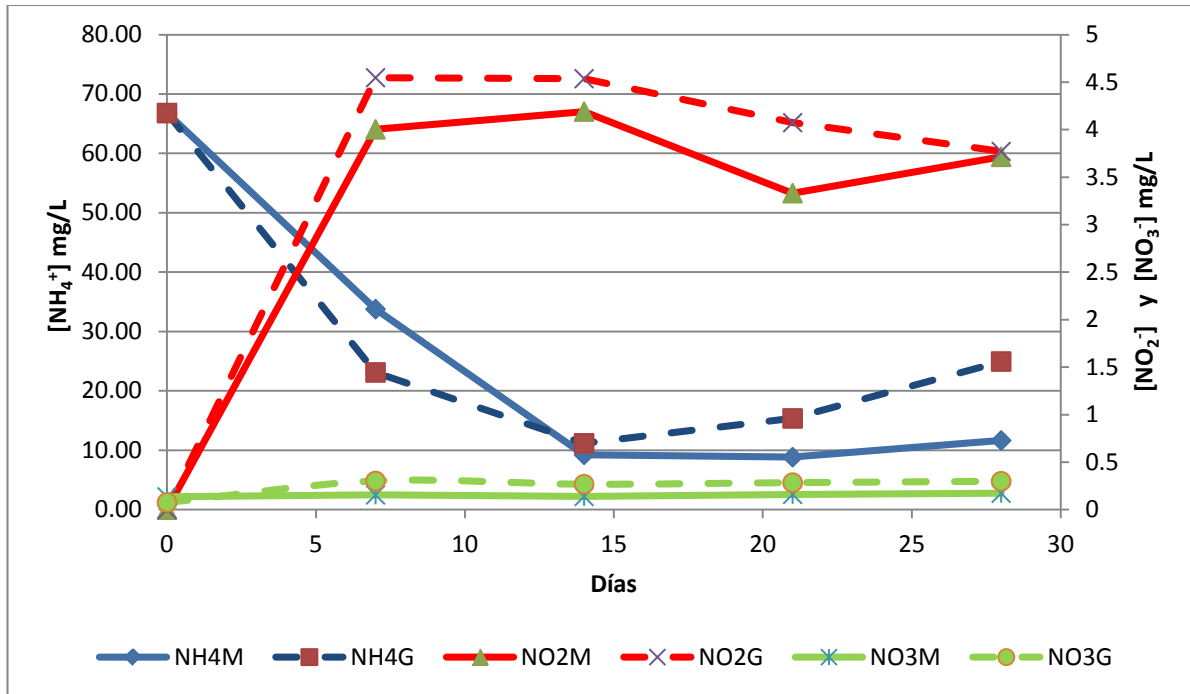


Figura 51. Dinámica sobre la degradación del NH_4^+ , producción de NO_2^- y NO_3^- en medio enriquecido con amonio e inoculado con bacterias *Nitrosomonas europaea*

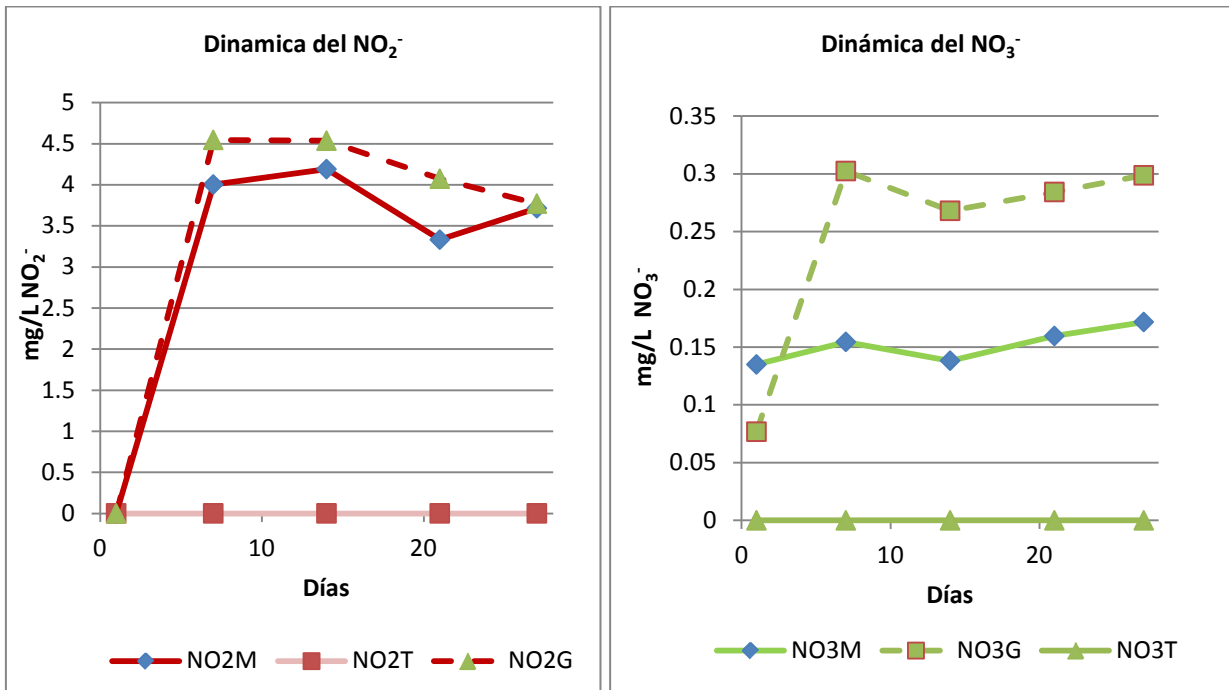


Figura 52. Dinámicas de la producción de NO_2^- y NO_3^- en cultivos enriquecidos con amonio e inoculados con *Nitrosomonas europaea*

Para el caso del NO_3^- la concentración encontrada es muy baja, la cual fue de 0.17mg/L para el medio NH_4M y 0.30 mg/L para el medio NH_4G , debido a que no se ha reportado que *Nitrosomonas europaea* puedan oxidar NO_2^- a NO_3^- , la presencia de este último compuesto puede atribuirse a la muerte celular o bien a la oxidación por mineralización, sin embargo en los testigos de la experimentación (los cuales no fueron inoculados) no se detectó presencia de NO_3^- (Figura 52).

En cuanto a la tendencia de los parámetros medidos como el pH, O.D; temperatura para el medio NH_4M se pueden apreciar en la Figura 53, donde el pH tuvo una tendencia hacia la acidificación disminuyendo en 2.14 unidades como resultado de la oxidación del amonio y la producción de ácido nítrico (Park, 2009), para el caso de la temperatura se mantuvo constante durante el experimento con un promedio de 28.31 ° C, por su parte el O.D. se mantuvo en una concentración promedio de 3.85 mg/L durante los primeros 14 días, mientras que para el resto del periodo de la experimentación, la concentración de oxígeno aumento, alcanzando hacia el final del experimento una concentración máxima de 6.03 mg/L y una concentración promedio de 5.33 mg/L al final del experimento. Esta tendencia puede explicarse en relación al decaimiento de la población bacteriana lo cual implica un menor consumo del O.D. en el medio y por lo tanto un aumento en la concentración del O.D. (Figura 54).

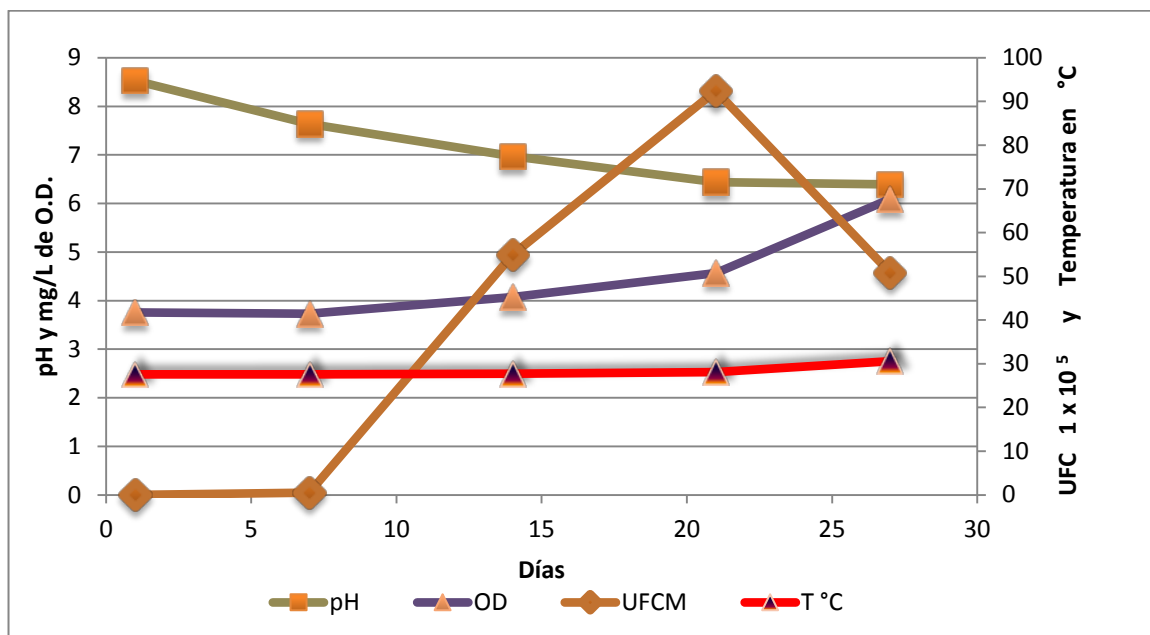


Figura 53. Dinámicas del crecimiento bacteriano en medio enriquecido con amonio asociado al comportamiento del pH, O.D. y temperatura.

Para el medio NH₄G a la tendencia del pH fue hacia la acidificación, disminuyendo en 1.77 unidades como resultado de la oxidación del amonio y la producción de ácido nítrico (Park, 2009.), para el caso de la temperatura mantuvo un promedio de 28.36 ° C, mientras que el O.D. se mantuvo en una concentración promedio de 4.25 mg/L durante los primeros 14 días (Figura 54). Para el resto del periodo de la experimentación, la concentración de oxígeno fue aumentando hasta alcanzar una concentración máxima de 5.61 mg/L y una concentración promedio de 4.86 mg/L de O.D. hacia el final del experimento, esta tendencia puede explicarse al igual que en el caso anterior, en relación con el decaimiento de la población bacteriana implicando un menor consumo del O.D. en el medio, por lo tanto una aumento en la concentración del O. D.

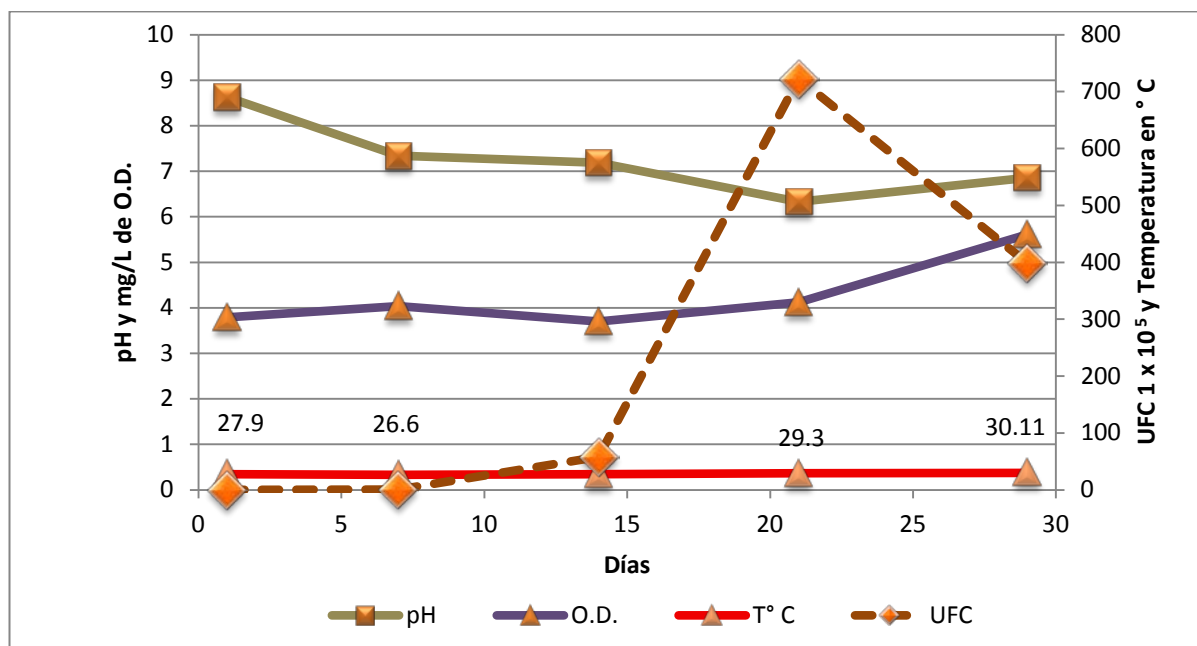


Figura 54. Dinámicas del crecimiento bacteriano en medio enriquecido con amonio más glucosa asociado al comportamiento del pH, O.D. y temperatura.

Los datos generados en cuanto a la dinámica de la degradación del amonio en conjunto con los testigos permitieron realizar el balance de masa. El balance para el medio NH₄M se muestra en la Figura 55, donde resalta que aproximadamente el 20 % del amonio se perdió por volatilización como NH₃⁺, este dato es obtenido a partir de la diferencia de concentraciones con el testigo, mientras que 21 mg/L del amonio

degradado se encuentra asociado a la generación de biomasa y probablemente en estados de oxidación que no son detectables por las técnicas empleadas en el presente estudio.

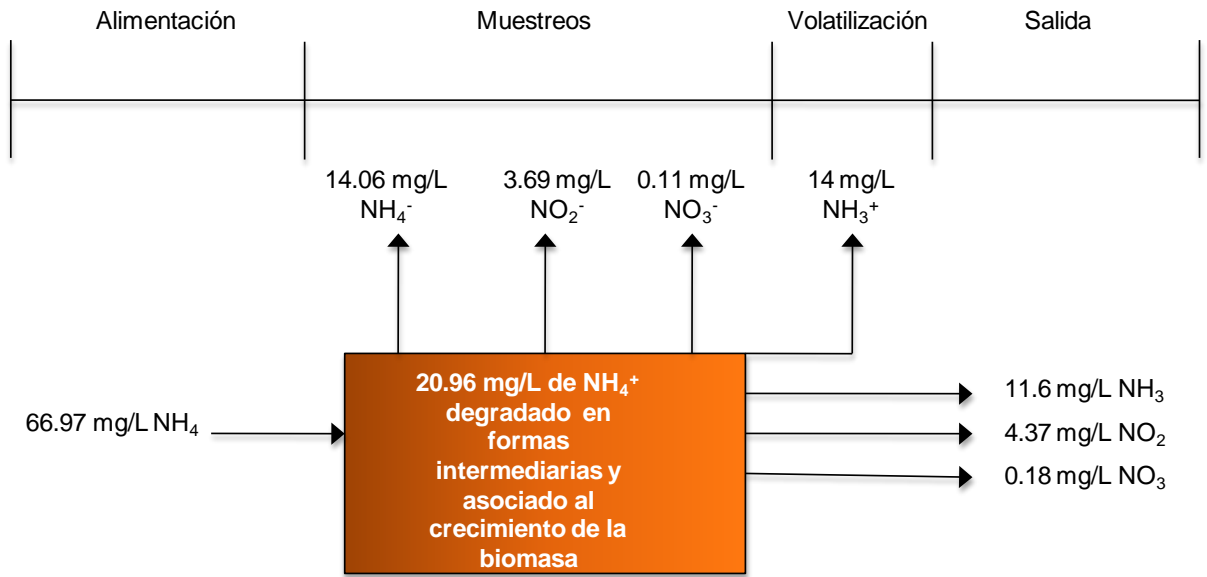


Figura 55. Balance de masa para medio enriquecido con amonio a 28 días.

El balance para el medio NH_4G (Figura 56) muestra que la pérdida de amonio como NH_3^+ por volatilización fue de 13.18 mg/L, mientras que 7.65 mg/L del amonio degradado se encuentra asociado a la generación de biomasa. El postulado anterior puede explicarse mediante la el crecimiento celular que se registró en el experimento, ya que al no existir otra fuente de Nitrógeno en el medio, el elemento fue empleado para la síntesis de moléculas tales como aminoácidos y proteínas, necesarias para el desarrollo y crecimiento de células bacterianas, sin embargo es probable que otra fracción estuviese asociada probablemente a estados de oxidación del Nitrógeno que no son detectables por las técnicas empleadas en el presente estudio. La diferencia que existe entre los dos tratamientos puede deberse en gran medida a las diferencias de biomasa generada entre los tratamientos, ya que el nitrógeno al formar parte del componente celular fue retenido y no se solubilizó en el medio por lo tanto no fue detectable en el medio, sin embargo para el medio NH_4M al contener menor cantidad de organismos es probable que el nitrógeno se encontrara en su mayoría en especies

oxidadas de nitrógeno como el ácido nítrico o bien como se mencionó anteriormente en estados de oxidación no detectables por los métodos anteriormente mencionados.

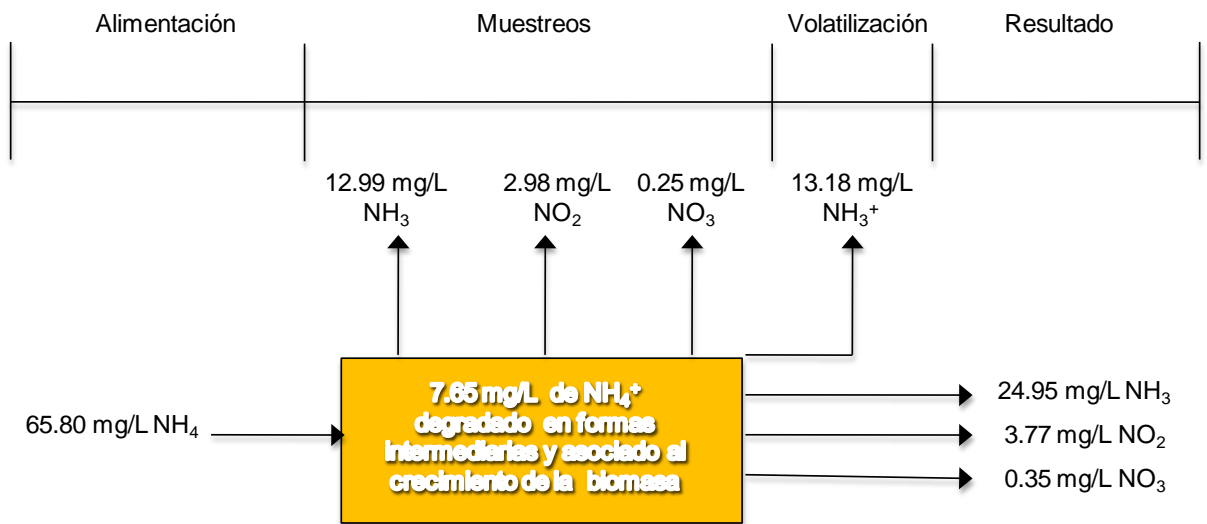


Figura 56. Balance de masa para medio enriquecido con amonio más fuente de carbono a 28 días.

Los resultados presentados ponen en evidencia la dependencia de variables sobre la dinámica de remoción del nitrógeno en función de la biomasa y por consecuencia de la actividad biológica, la oxidación del amonio a nitritos, así como la disminución del pH y las variaciones del O.D. en el medio

5.1.5.1 Resultados de las cinéticas de degradación del NH₄⁺ por el consorcio bacteriano aclimatado más la adición de bacterias nitrificantes

El análisis sobre las dinámicas de degradación del amonio en medio enriquecido e inoculado con un consorcio bacteriano dieron como resultado que el porcentaje de degradación para el amonio fue de 74.72 % el cual equivale a la degradación de 45.24 mg/L de NH₄⁺ en 28 días. El mayor porcentaje de degradación se registró dentro de los primeros 7 días con un 36.58%, la menor concentración fue registrada el día 28 con 15.30 mg/L (Figura 57).

En cuanto a la concentración de NO₂⁻, el primer aumento fue registrado el día 7 con una concentración de 0.055 mg/L, posteriormente se registró un descenso hasta 0.01

mg/L a los 14 días. Transcurrido el periodo de 21 días, se registró nuevamente un aumento en 0.043 mg/L alcanzando una concentración de 0.053 mg/L, para posteriormente alcanzar una concentración final de 0.057 mg/L al día 28.

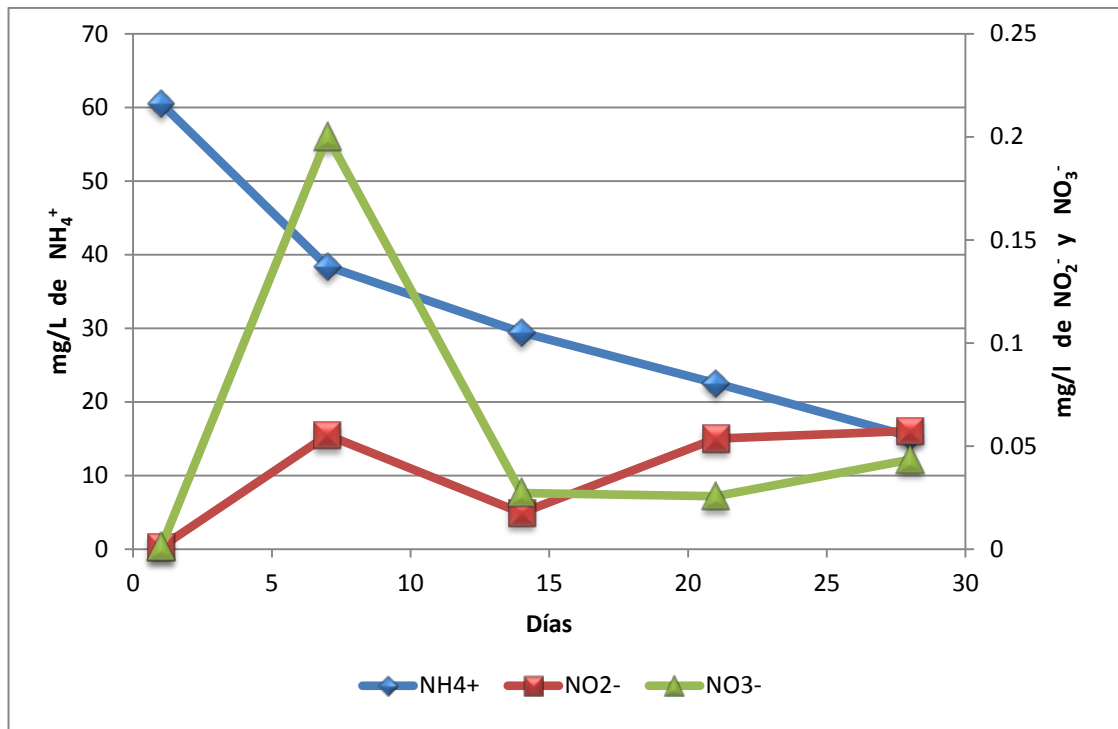


Figura 57. Dinámica de la degradación del NH₄⁺, producción de NO₂⁻ y NO₃⁻ en medio enriquecido con amonio e inoculado con un consorcio bacteriano

La producción y transformación total registrada de NO₂⁻ fue de 1.4 mg/L. La oxidación de nitritos a nitratos realizada por la actividad de las bacterias nitratantes fue registrada por medio de la producción de nitratos, la cual alcanzó una concentración de 0.20 mg/L al transcurrir los primeros 7 días, posteriormente la concentración decae a 0.02 mg/L al cabo de 14 días. La concentración de nitratos aumenta para el día 21 sólo en 0.004 mg/L y alcanza los 0.043 mg/L de NO₃⁻ para el día 28.

Como se puede observar en la Figura 57, la dinámica de degradación del amonio mantiene una relación con los valores más altos registrados para la generación y degradación tanto de nitritos como de nitratos dentro de los primeros 14 días, pasado este periodo se mantiene la actividad degradadora y transformadora, disminuyendo la velocidad de degradación del amonio como en la transformación de NO₂⁻ y NO₃⁻, esto

obedece en gran medida al agotamiento de la fuente de amonio como sustrato inicial de nitrificación. Las diferencias de concentraciones en cuanto a los niveles de nitritos durante el experimento, están asociadas a la oxidación del nitrito a nitratos por bacterias nitratantes, incrementando los niveles de nitratos en concentraciones mucho mayores que en los experimentos anteriores, sin embargo los niveles de nitratos vuelven a reducirse debido a la presencia de la bacterias que pueden degradar los nitratos, tal es el caso de una especie del género *Alcaligenes*, la cual fue identificada en como componente del consorcio bacteriano y muy probablemente se trate de la bacteria *Alcaligenes denitrificans*, sin embargo es necesario realizar pruebas moleculares con el fin de confirmar la identidad de dicho organismo. En cuanto a la tendencia de los parámetros medidos como el pH, O.D, y temperatura, como se muestra en la Figura 58 (Pág. 116) el pH tuvo una tendencia hacia la acidificación disminuyendo en 2.92 unidades como resultado de la oxidación del amonio y la producción de ácido nítrico, para el caso de la temperatura se mantuvo constante durante el experimento con un promedio de 28.36° C, mientras que el O.D. se mantuvo en una concentración promedio de 3.84 mg/L durante los primeros 14 días, el resto del periodo de la experimentación, la concentración de oxígeno aumentó, alcanzando hacia el final del experimento una concentración máxima de 4,63 mg/L y una concentración promedio de 4.05 mg/L. La tendencia del consumo de oxígeno, puede explicarse en función del alto porcentaje de oxidación del amonio en los primeros 14 días, posteriormente el incremento en la concentración de O.D: aunque con poca magnitud en comparación a los experimentos anteriores, puede asociarse a la disminución en la actividad catalítica de las bacterias nitrificantes debido al agotamiento del amonio.

Los datos generados en cuanto a la dinámica de la degradación del amonio en conjunto con los testigos permitieron realizar el balance de masa (Figura 59, Pág. 116). El balance de masa muestra que 19.83 % del amonio se perdió por volatilización como NH_3^+ , este dato es obtenido a partir de la diferencia de concentraciones con el testigo, mientras que 16.67 mg/L del amonio degradado se encuentra asociado a la

generación de biomasa y probablemente en estados de oxidación que no son detectables por las técnicas empleadas en el presente estudio.

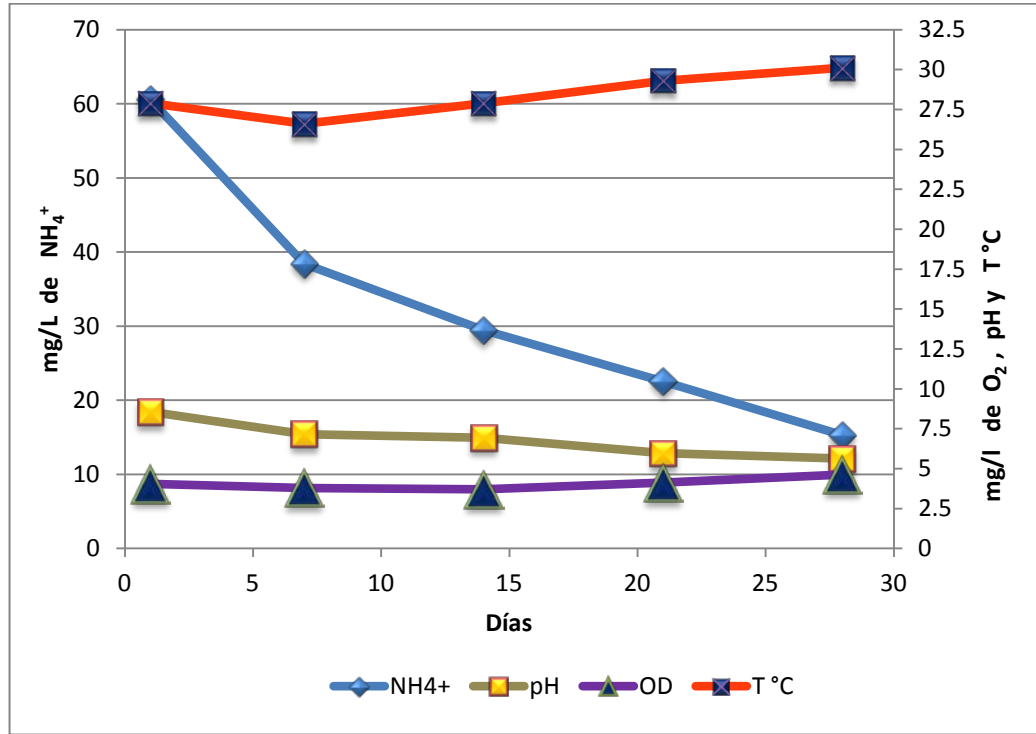


Figura 58. Dinámica de la degradación del NH_4^+ por un consorcio bacteriano en medio enriquecido con amonio asociado a las tendencias del comportamiento del pH, O.D. y temperatura.

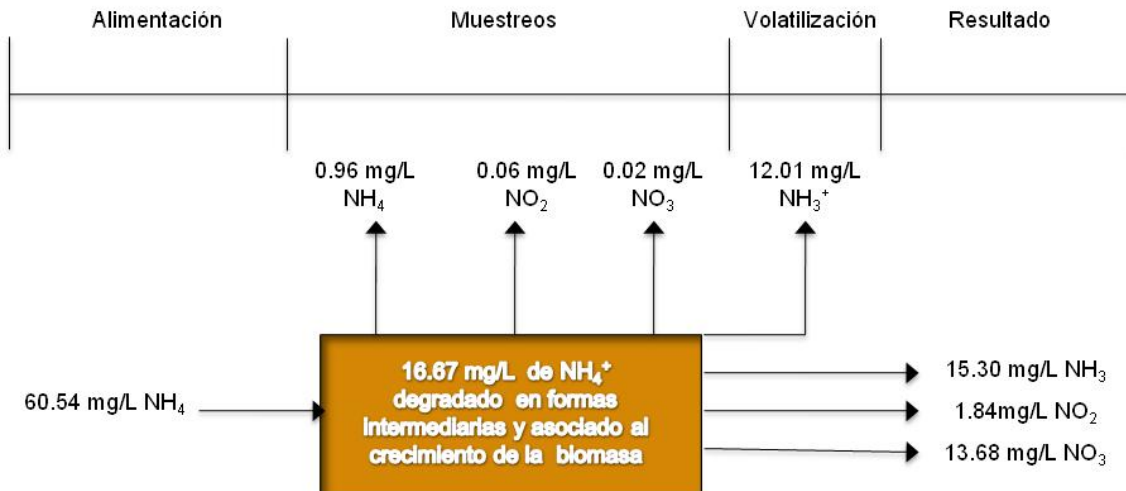


Figura 59. Balance de masa para medio enriquecido con amonio más fuente de carbono e inoculado con un consorcio bacteriano a 28 días

Los resultados presentados muestran que las dinámicas de la nitrificación están en función de la comunidad microbiológica que se desarrolló en el medio enriquecido evaluado, de manera tal que los microorganismos nitratantes permitieron la transformación de desde NO_2^- a NO_3^- evitando así la acumulación de nitritos que pudiera inhibir la oxidación del amonio por las bacterias nitrificantes o degradadoras de amonio, de esta forma ambos procesos permitieron el proceso de la nitrificación. Por otra parte los organismos denitrificantes como es el caso presumiblemente de *Alcaligenes denitrificans*, permiten la transformación de los NO_3^- a otros estados de oxidación, evitando que exista una acumulación que pudiera ser nociva para los organismos nitratantes, por consiguiente la composición de componente microbiano y las interacciones que existen entre el co-metabolismo de los organismos desempeñan un papel fundamental en las dinámicas de la nitrificación.

5.2 Resultados de los SEHA

Se realizó un seguimiento de la dinámica de la nitrificación con base a las concentraciones de NH_4^+ , NO_2^- y NO_3^- en los sistemas experimentales durante 121 días (Figura 60), en los cuales se pudo observar procesos tanto de formación y degradación de los diferentes compuestos nitrogenados, así como el efecto de los microorganismos y su influencia en la nitrificación.

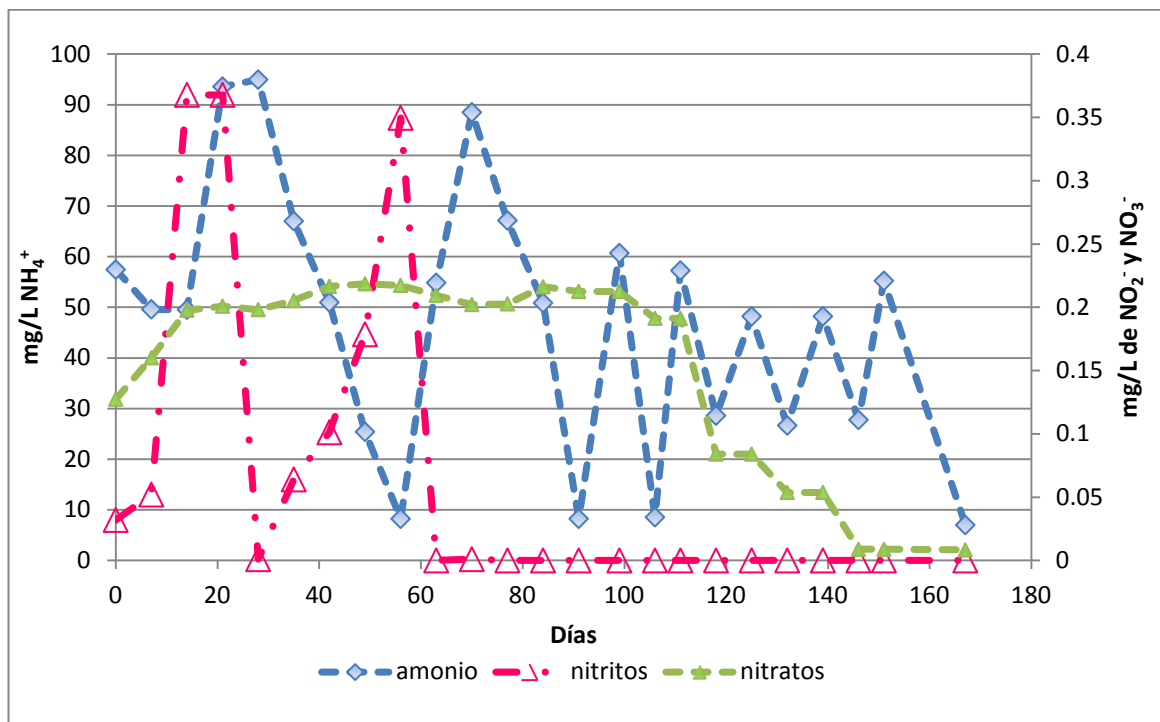


Figura 60. Dinámicas del NH_4^+ , NO_2^- NO_3^- en los SEHA durante 167 días

Para facilitar la comprensión sobre las dinámicas de degradación del amonio y las tendencias de los parámetros fisicoquímicos evaluados dentro de los SEHA, las dinámicas fueron divididas en 2 periodos: periodo de arranque y periodo de estabilización, los cuales se detallan a continuación.

5.2.1 Periodo de Arranque

Este período comprendió 21 días, en el cual se introdujeron 50 L de agua enriquecida con NH_4^+ en una concentración de 57.45 mg/L y con una materia orgánica disuelta medida como D.Q.O. de 70 mg/L (detalles ver Anexo I). Los SEHA fueron inoculados con 6 L de medio enriquecido con amonio y un cultivo de *Nitrosomonas europaea* en una concentración de 3.63×10^3 microorganismos/mL, al término de este periodo se obtuvieron los siguientes resultados.

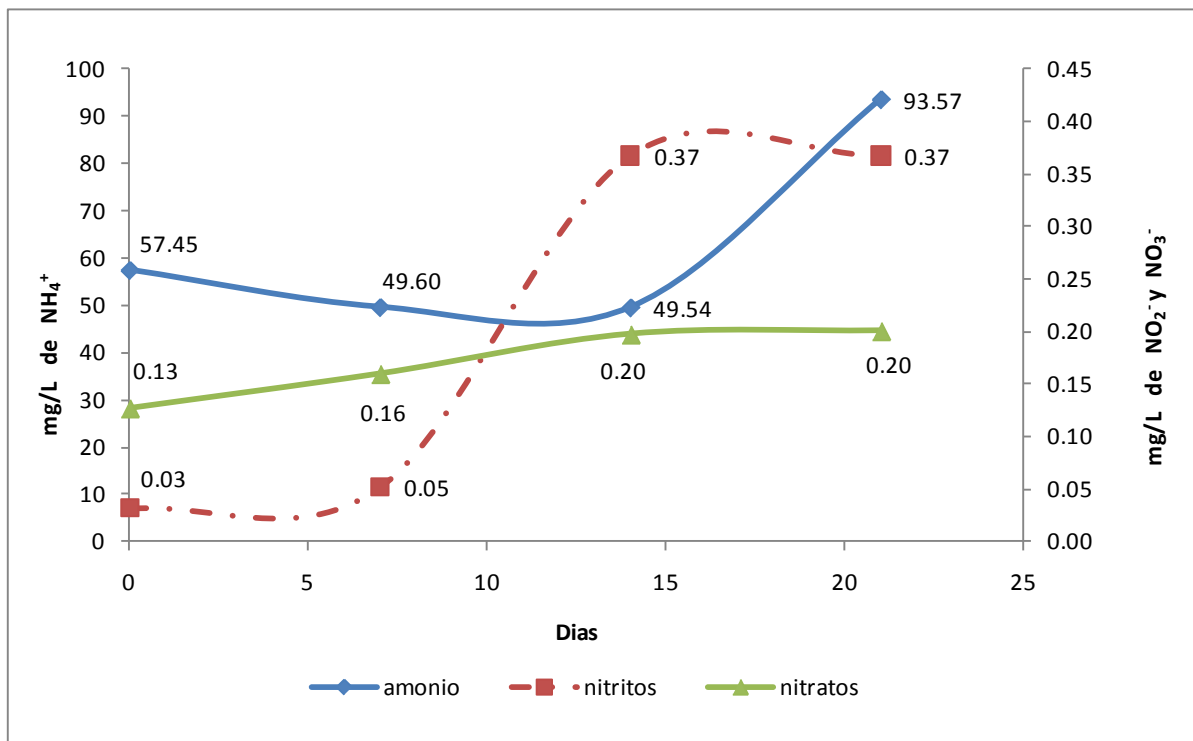


Figura 61. Dinámicas del NH_4^+ , NO_2^- NO_3^- en los SEHA durante el periodo de arranque de 28 días

Durante los primeros 7 días se puede apreciar en la Figura 61 una descenso de 7.85 mg/L en la concentración del NH_4^+ , pasados 14 días se registra apenas un descenso de 0.06 mg/L en la concentración de NH_4^+ , así como el incremento en 0.34 mg/L de NO_2^- y 0.07 mg/L de NO_3^- , evidenciando el proceso de degradación del amonio y la nitratación, sin embargo la tendencia de degradación del NH_4^+ no sigue, por el contrario la concentración del amonio se eleva 44 mg/L. Lo anterior se debe al incremento en la concentración del NO_2^- , supuesto que Seongjun, (2009), reporta la inhibición de la nitrificación por las altas concentraciones de nitritos. La acumulación de nitritos fue debida muy probablemente a que no existían organismos capaces de

oxidar el NO_2^- a NO_3^- puesto que el inóculo empleado en los SEHA durante este periodo contenía sólo bacterias oxidadoras de NH_4^+ (*Nitrosomonas europaea*), esto contribuyó a que la concentración de NO_2^- fuera tóxica para los organismos y provocara una muerte celular, esto puede ser contrastado con los valores de materia orgánica disuelta medida como D.Q.O. (Figura 62) los cuales permanecen estables hasta el día 7, sin embargo para el día 14 aumentan hasta en un 229 %, coincidiendo con el aumento de NO_2^- .

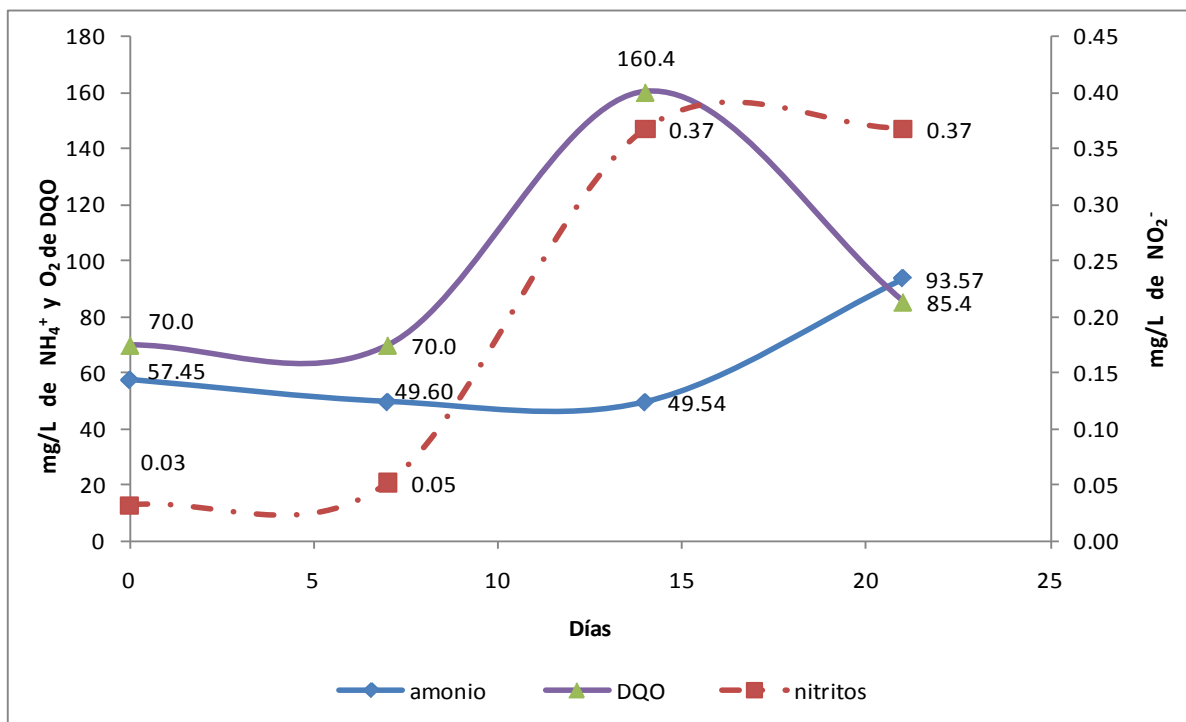


Figura 62. Dinámicas del NH_4^+ , NO_2^- y D.Q.O. en los SEHA durante periodo de arranque

Los resultados obtenidos (Figura 62) sugieren que existió un crecimiento celular durante los primeros 7 días, pasando este periodo hubo una inhibición y posteriormente una probable muerte celular masiva, que se hizo presente en el aumento de los valores de materia orgánica disuelta medida como D.Q.O, así como en los de NH_4^+ ya que no fue introducido en los SEHA durante este periodo aporte de nutrimentos. Como consecuencia el NH_4^+ que fue detectado fue liberado al medio liquido en forma de nitrógeno amoniacal. En virtud de que las muestras fueron filtradas a través de un papel filtro de fibra de vidrio libre nitrocelulosa, con poro de $0.75 \mu\text{m}$, es poco probable que las células bacterianas pasaran, debido a que *Nitrosomonas*

europaea tiene un diámetro de 0.30 a 0.61 μm (Holt, 1999), por lo tanto el NH_4^+ detectado que se encontraba en diluido en medio no estaba asociado a biomasa viable, por lo tanto es claro que el aumento en la materia carbonosa detectada en dilución, es producto de la liberación por muerte celular.

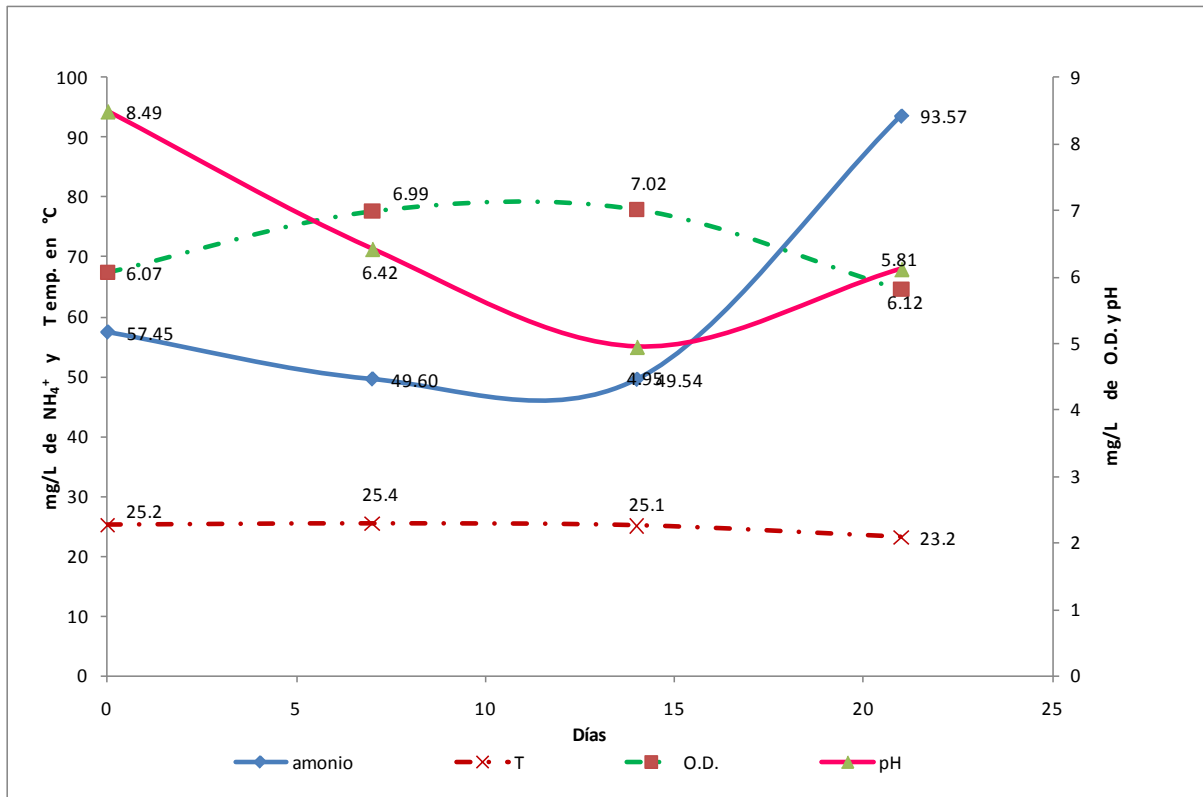


Figura 63. Dinámicas del NH_4^+ , pH, Temperatura y O.D.- en los SEHA durante periodo de arranque

En cuanto al O.D. se mantuvo en un valor promedio de 6.57 mg/L (Figura 63). En cuanto a la temperatura el valor promedio fue de 24.72° C, manteniéndose constante. El valor pH tuvo una tendencia hacia la acidez durante los primero 14 días, descendiendo 3.54 unidades, esto debido a la actividad nitrificante y la formación de nitritos y la posible formación de óxido nitroso en el medio. Para el día 21, registró un aumento en el pH debido probablemente al decremento en la nitrificación y muerte celular y por consecuencia mineralización del contenido celular de los microorganismos. Por lo tanto se puede inferir que la acumulación de NO_2^- resultado de la oxidación del nitrógeno amoniacal realizada por las *Nitrosomonas europaea* y la falta de organismos capaces de degradar este compuesto, dio como resultado la

muerte celular y el incremento de NH_4^+ en los SEHA. Las concentraciones de NO_2^- llevaron a tomar la decisión de introducir en los SEHA organismos capaces de degradar esta molécula, de tal forma que se llevara a cabo el siguiente paso de la nitrificación, la nitratación. Para tal fin se inoculó en los SEHA 3.5 L de medio que con el consorcio bacteriano analizado durante la fase de experimentación previa, el cual contenía bacterias nitrificantes capaces de utilizar al NO_2^- como sustrato para ser degradado y transformado a NO_3^- , mientras que con las bacterias heterótrofas que se encontraban en el consorcio, se esperó la degradación de nitritos a otras formas de oxidación del nitrógeno aprovechables para ellas mismas o bien, para la comunidad microbiológica residente del material de empaque de los SEHA.

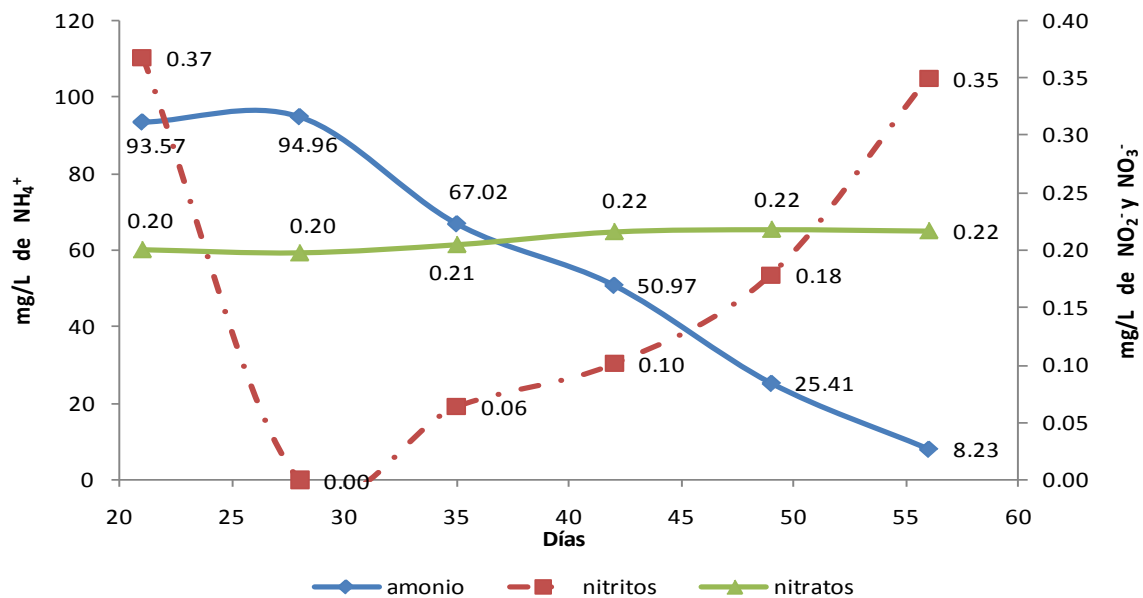


Figura 64. Dinámicas del NH_4^+ , NO_2^- NO_3^- en los SEHA durante el periodo del día 21 al50

El intervalo entre los días 21 al 27, muestra un descenso del 99 % en la concentración de nitritos como resultado de la transformación a nitratos por los microorganismos nitrificantes, por consiguiente se puede apreciar en la Figura 64, el descenso en la concentración del NH_4^+ , el cual decae 43.99 mg/L de su concentración original de 94.96 mg/L, sin embargo para el día 56, partiendo del día 28 se registra un aumento en la concentración de nitritos (Figura 64), este incremento es debido a la degradación del amonio a nitritos alcanzando su valor máximo para este periodo en 0.10 mg/L.

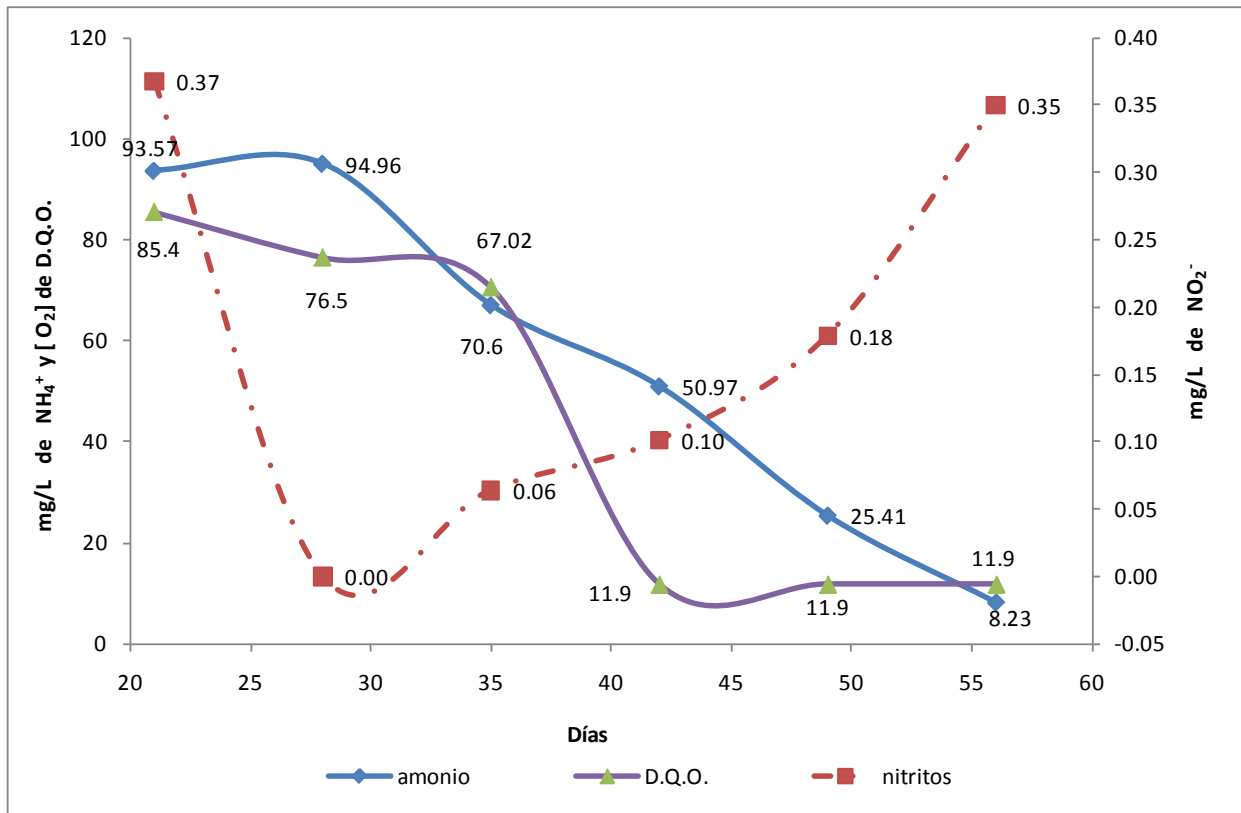


Figura 65. Dinámicas del NH_4^+ , NO_2^- y D.Q.O. en los SEHA durante los días 29 al 50

La transformación NO_2^- a NO_3^- permitió el descenso en la concentración de nitritos, dando lugar a la degradación del amonio por medio de las bacterias oxidadoras de amonio, poniendo en evidencia que las concentraciones elevadas de nitritos inhiben la actividad oxidadora del amonio por medio de las bacterias nitritantes. En cuanto a las concentraciones de nitratos se mantuvieron constantes en promedio de 0.21 mg/L, sugiriendo que existió una transformación de NO_3^- a otros compuestos nitrogenados no detectables por las técnicas empleadas como los NO_x y N_2O , producidos por la actividad de bacterias heterótrofas desnitrificantes, entrando el NO_3^- muy probablemente a la ruta biogeoquímica de la desnitrificación aerobia (Kadlec, 2009), de lo contrario se reflejaría en una acumulación de este compuesto en los SEHA.

Las concentraciones detectadas de la materia orgánica disuelta medida como D.Q.O muestran un descenso de 73.50 mg/L en el periodo del día 21 al 56 (Figura 65), sugiriendo que las fuentes de carbono fueron utilizadas por las bacterias heterótrofas

para su crecimiento y como parte de su respiración aerobia, generaron CO_2 , el cual fue empleado en la transformación de los nitritos a nitratos por la comunidad de bacterias nitratantes, por tal motivo el descenso de las concentraciones en la materia orgánica disuelta medida como D.Q.O denotan en primera instancia un crecimiento celular en la comunidad microbiológica, asimilando la fuente de carbono en materia celular y por consiguiente el uso y las concentraciones de carbono como menciona Crites y Tchobanoglous (2005), juegan un papel importante para el proceso de degradación del amonio.

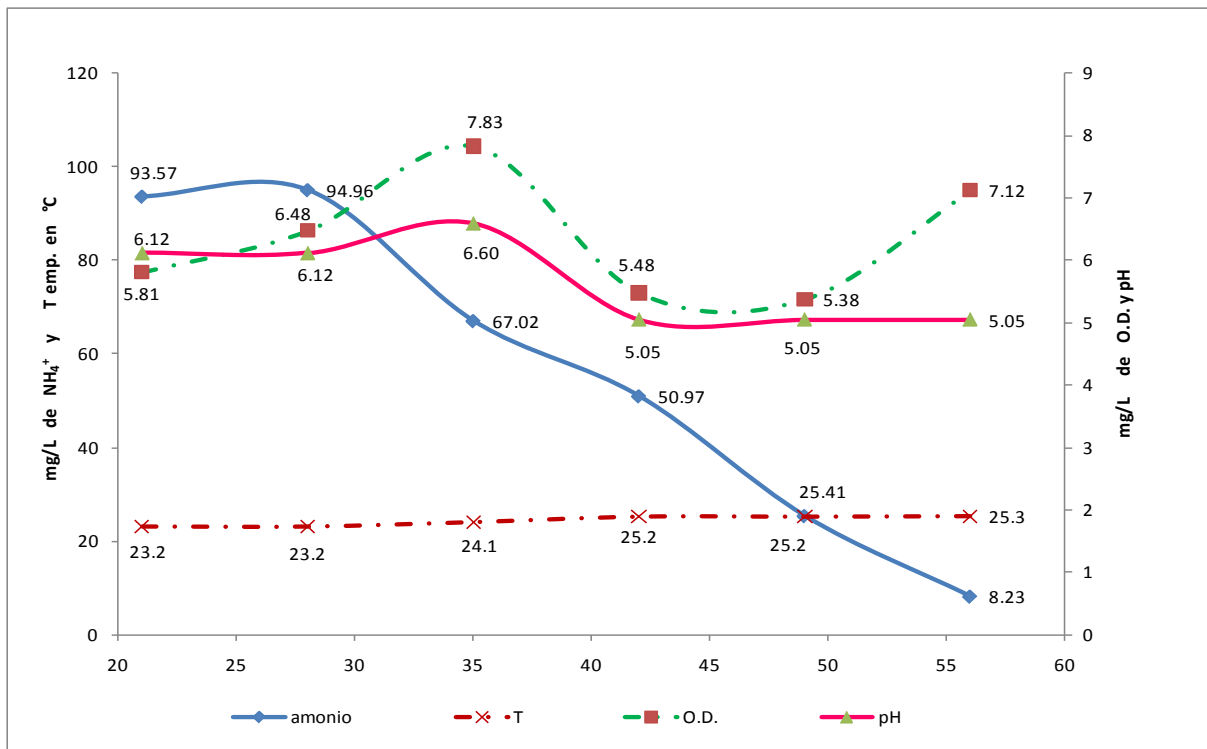


Figura 66. Dinámicas del NH_4^+ , pH, Temperatura y O.D.- en los SEHA durante los días 21 al 56

Las concentraciones de O.D. durante el periodo del día 21 al 56 presentaron fluctuaciones que coinciden con el descenso de la materia orgánica disuelta medida como D.Q.O., especialmente en el periodo comprendido entre los días 36 al 46, donde la concentración del O.D. desciende en 2.45 mg/L, mostrando que existe un incremento en el consumo de oxígeno asociado en gran medida la actividad metabólica de la comunidad de bacterias heterótrofas. Como se muestra en la Fig. 65, los SEHA fueron inoculados sólo con bacterias oxidadoras de amonio durante 14 días, durante este periodo se registró la menor concentración de O.D. en 6.09 mg/L,

mientras que para el día 51 cuando ya se encontraban en actividad las comunidades de bacterias heterótrofas y nitratantes, la concentración de O.D. descendió hasta a 5.38 mg/L (Figura 66), denotando un aumento en el consumo de O.D. como consecuencia de la actividad metabólica de las comunidades. En cuanto a la temperatura, el valor se mantuvo constante con un promedio de 24.36 ° C.

La tendencia del valor de pH se mantuvo en incremento hasta el día 36, alcanzando el valor de 6.60, posteriormente se registró un valor de 5.05, el cual se mantuvo constante hasta el día 56, esto como consecuencia nuevamente de la actividad nitrificante y la formación de nitritos y la posible formación de óxido nitroso en el medio. Como se pudo observar las tendencias de los parámetros analizados, muestran que el incremento y acumulación en los niveles de nitritos inhiben la primera fase de la nitrificación, es decir la nitrificación, induciendo el descenso en el valor del pH y aumentando el valor de la materia orgánica disuelta medida como D.Q.O. así como la concentración del O.D. sugiriendo la muerte celular. El segundo periodo analizado pone en evidencia la segunda etapa de la nitrificación, la nitratación, mostrando que para esta etapa, el descenso en los niveles de materia orgánica disuelta medida como D.Q.O. denotan el uso de las fuentes de carbono, las cuales son determinantes para la transformación de nitritos a nitratos por medio de las bacterias nitratantes. Durante esta etapa, también podemos notar que se incrementa el consumo de O.D., si bien no es posible determinar en el presente experimento en qué medida es debido al metabolismo de las bacterias quimiolitótrofas nitrificantes o a la comunidad de heterótrofas, es evidente que el descenso en el O.D. está asociado a los procesos de nitratación o bien a la desnitrificación, puesto que los niveles de nitratos se mantuvieron constantes y no se registró un incremento dentro de los SEHA.

Una vez que se alcanzó una concentración de amonio promedio de 8.23 mg/L al día 56, el SEHA fue alimentado nuevamente con fuente de amonio alcanzando una concentración de 54.84 mg/L de NH_4^+ (Figura 67), en este punto la concentración de nitritos fue de 0.35 mg/L, mientras que los nitratos permanecieron en 0.22 mg/L. Para el día 63 la concentración de amonio se incremento hasta 88.49 mg/L, debido probablemente a muerte celular, como consecuencia de las altas concentraciones de

nitritos, sin embargo la concentración de nitritos comenzó a descender a tal punto que no fueron detectables por las técnicas empleadas, las cuales se mantuvieron con esa tendencia hacia el final del período de 84 días, lo cual nos permite observar aumento en la capacidad de transformación de nitritos a nitratos por parte de la comunidad de bacterias nitratantes, sin embargo no es posible afirmar si se trata de un aumento en el tamaño de la población o bien en la afinidad por el sustrato.

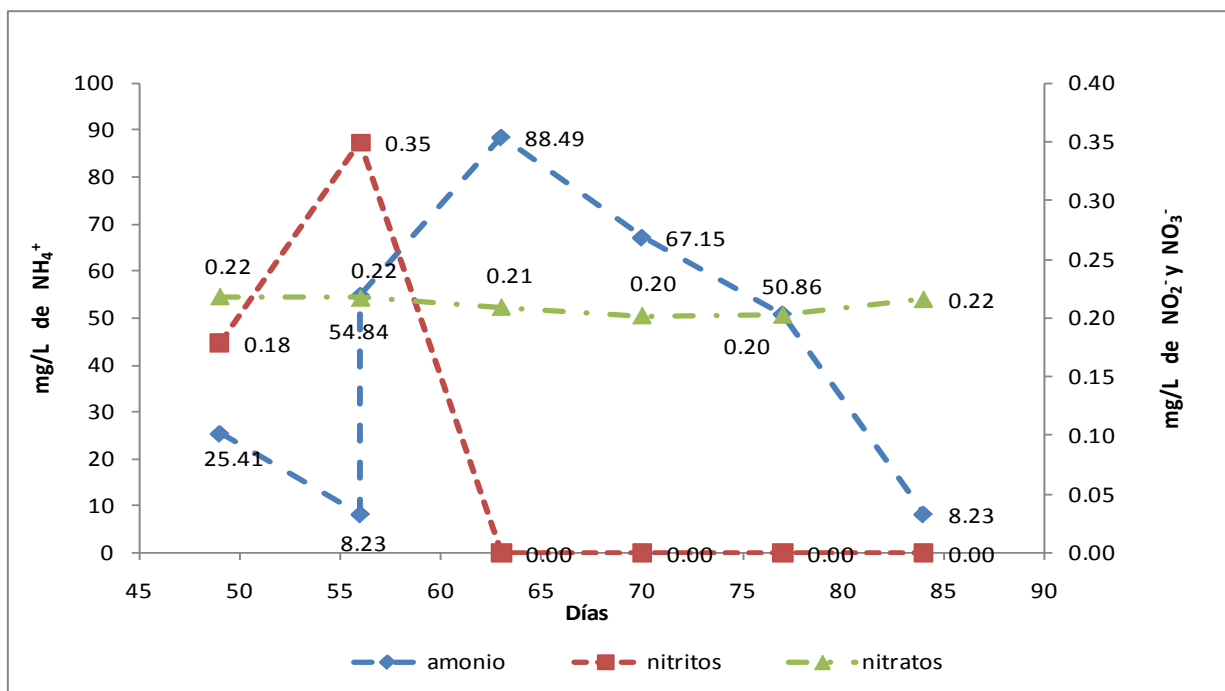


Figura 67. Dinámicas del NH_4^+ , NO_2^- y NO_3^- en los SEHA durante los días 56 al día 84

Las bajas concentraciones de NO_2^- permitieron la actividad de las bacterias nitrificantes y por consecuencia la degradación del amonio. En catorce días se registró una degradación de 37.63 mg/L, alcanzando para el día 84 una degradación de 80.26 mg/L, evidenciando una recuperación en la capacidad oxidadora de amonio por la comunidad de bacterias nitrificantes. En cuanto a la concentración de NO_3^- la tendencia se mantuvo constante con un promedio de 0.21 mg/L.

En cuanto al valor de O.D. se puede observar en la Figura 68 que la tendencia se mantiene estable hasta el día 70, donde se presenta un descenso de 1.81 mg/L para el

día 77 con una concentración de 5.45 mg/L, este descenso coincide con la disminución en la concentración de amonio, para posteriormente llegara una concentración de 5.33 mg/L para el día 84. En cuanto al pH, este tiene una tendencia similar a la del O.D., el cual para el día 70 registró un valor de 8.50 el cual descendió en 3.45 unidades llegando a un valor 5.33 para el día 84, manteniendo la tendencia hacia la acidificación en la medida que se lleva a cabo la producción de NO_2^- ocasionando por consecuencia el descenso del pH (Crites, 2005). En cuanto a la temperatura se mantiene estable en un promedio de 24.32 °C

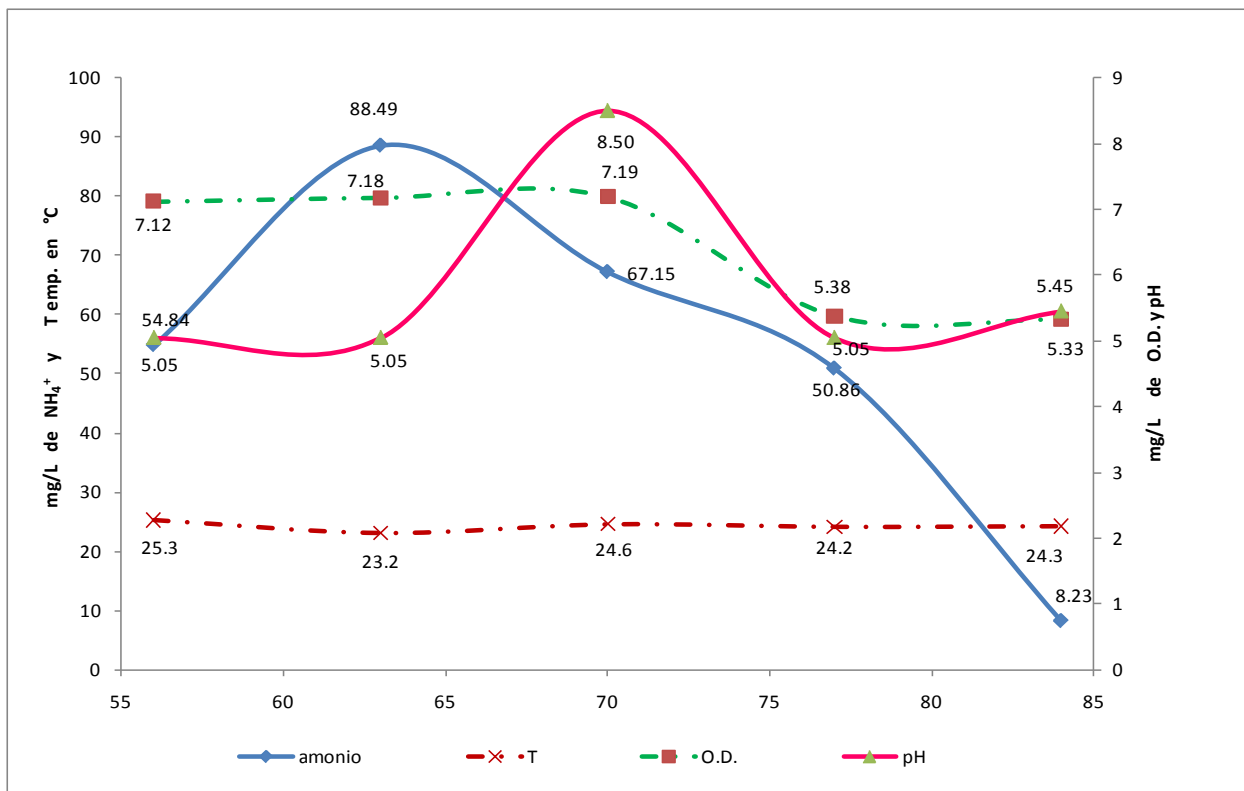


Figura 68. Dinámicas de del NH_4^+ , pH, Temperatura y O.D. en los SEHA durante los días 56 al 84

5.2.2 Periodo de Estabilización

El periodo de estabilización en los SEHA fue alcanzado a los 86 días, periodo a partir del cual se observó una tendencia constante y periódica en cuanto a los valores de degradación del NH_4^+ . Durante este periodo se adicionó una solución enriquecida con amonio cada 7 días para compensar la pérdida debida a la degradación amonio.

Durante este periodo las tendencias sobre la dinámica de degradación del amonio fueron constantes, mientras que las tendencias de degradación y transformación de NO_2^- y NO_3^- alcanzaron concentraciones muy bajas o indetectables por las técnicas empleadas. Las dinámicas de degradación del NH_4^+ durante el periodo del día 84 al 100, estuvieron en promedio del 84.87 %, mientras que para el periodo entre los días 100 al 128 el promedio de degradación fue de 62.29 %.

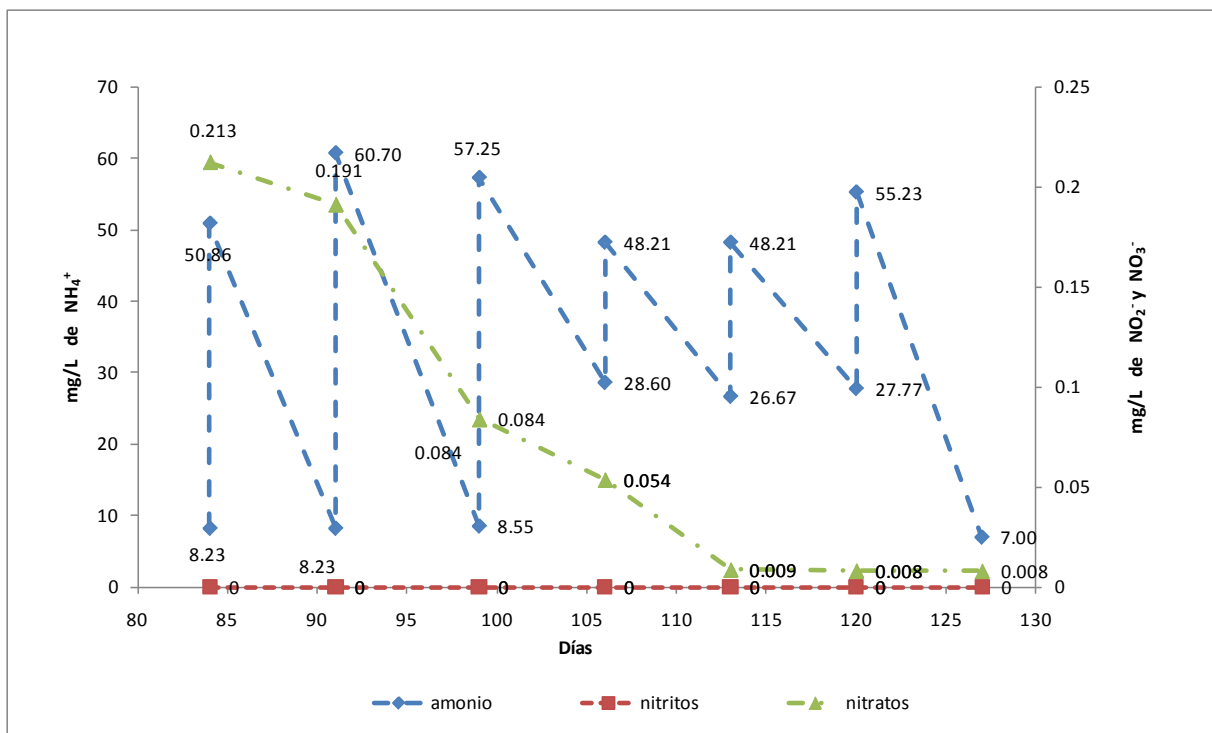


Figura 69. Dinámicas del NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- en los SEHA durante los días 86 al 128

En cuanto a las concentraciones de NO_2^- los valores mantuvieron la tendencia de ser indetectables por las técnicas empleadas, lo anterior permite inferir que la población bacteriana encargada de la transformación de esta molécula a NO_3^- alcanzó una dinámica tal, que no permitió la acumulación de nitratos en el sistema, fomentando que la tendencia de la de degradación del amonio se mantuviera constante, sin embargo y a diferencia de los periodos analizados con anterioridad las concentraciones de NO_3^- se mantuvieron constantes con promedio de 0.20 mg/L. A partir del periodo comprendido entre los días 84 y 113 se registra un descenso en las concentraciones de nitratos hasta en 95.77 %, posterior a este periodo los niveles de nitratos registran una concentración promedio de 0.04 mg/L, sugiriendo que se presentó un incremento en tasa de transformación de NO_3^- a otros compuestos nitrogenados no detectables por las técnicas empleadas, denotando que la comunidad bacteriana encargada de la transformación de este compuesto alcanzó una cinética de degradación mayor.

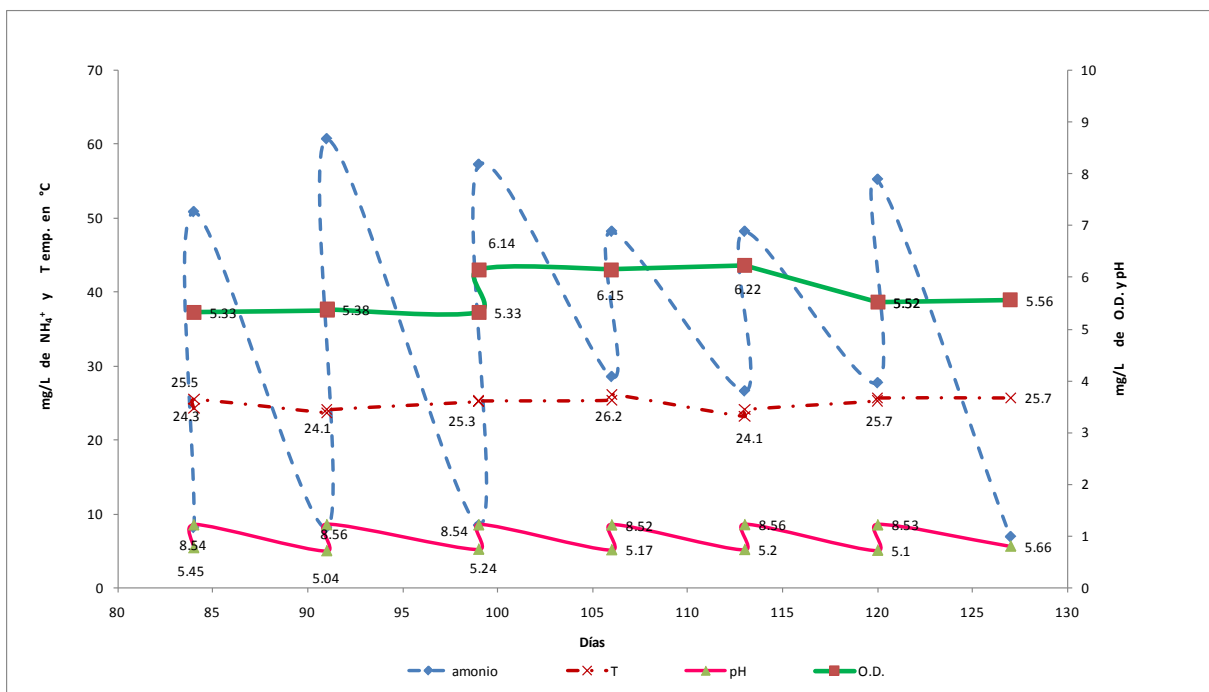


Figura 70. Dinámicas de del NH_4^+ , pH, Temperatura y O.D. en los SEHA durante los días 84 al 128

En cuanto al valor de O.D. se puede observar en la Figura 70 que la tendencia se mantiene estable hasta el día 99 donde se registró un promedio de 5.43 mg/L, a partir de este periodo se registra un aumento y se mantiene en una concentración promedio de 6.17 mg/L hasta el día 120 donde desciende a una concentración promedio de 5.54 hasta el final de periodo de experimentación. La concentración promedio de O.D.

durante este periodo es menor a la registrada en los periodos previamente descritos y es atribuible al incremento en el consumo de oxígeno por parte de los microorganismos que se encuentran en los SEHA. En cuanto al pH se registró un descenso periódico promedio de 2.26 unidades de pH, como resultado de la transformación del nitrógeno amoniacal a nitritos y la formación de productos intermediarios como son el óxido nitroso y ácido nítrico (Zhou, 2011) manteniendo una tendencia hacia la acidificación del medio en la medida que se lleva a cabo la nitrificación. En cuanto a la temperatura se mantiene estable en un promedio de 25.12 °C.

5.2.3 Comparación de la degradación de amonio por arreglo de sistema

Una vez que las tendencias de degradación del NH_4^+ fueron constantes en los SEHA fue posible realizar el comparativo entre los diferentes tratamientos (Figura 70). Los tratamientos que registraron una mayor tasa de degradación fueron los sistemas que contenían microorganismos y microorganismos mas el componente vegetal, con un promedio de degradación de 36.61 y 36.71 mg/L de NH_4^+ respectivamente, mientras que el testigo mostró una degradación de 2.24 mg/L de NH_4^+ y el SEHA sólo con plantas de 1.89 mg/L de NH_4^+ , estos promedios son por cada 7 días dentro de un periodo de 56 días. En cuanto a las dinámicas de los NO_2^- , las concentraciones permanecieron muy bajas o no detectables por las técnicas empleadas en todos los tratamientos, sugiriendo que existió una rápida transformación de nitritos a nitratos en los casos donde los sistemas fueron inoculados con microorganismos. Mientras que en los sistemas sin inóculo de bacterias nitrificantes, no se detectaron cambios en las concentraciones de NO_2^- , debido a que no existieron microorganismos capaces de transformar el amonio a nitritos, por lo tanto el descenso del amonio en estos tratamientos puede atribuirse a fenómenos fisicoquímicos tales como la adsorción del amonio en el material de empaque o bien, a la volatilización de este compuesto en forma de NH_3^+ (Kadlec, 2009). Las concentraciones de NO_3^- en los tratamientos que no se inocularon fueron muy bajas o bien no detectables por las técnicas empleadas (Figura 70). Sin embargo para los tratamientos que fueron inoculados se aprecia una

gran diferencia en cuanto a las tendencias de las concentraciones de nitratos (Figura 70).

Para el tratamiento que contenía bacterias mas componente vegetal, las concentraciones de NO_3^- durante los primeros 14 días se mantuvieron en una concentración promedio de 0.8×10^{-2}

mg/L , elevando su concentración para el día 21, alcanzando los 2.0×10^{-1} mg/L y manteniendo constante la concentración hasta el día 56 en un promedio de 2.08×10^{-1} mg/L , mientras que para el tratamiento sólo con microorganismos, la tendencia fue inversa, es decir durante los primeros 14 días las concentraciones tendieron a disminuir en apenas 2.1×10^{-2} mg/L , alcanzando su nivel más bajo para el día 35, con una concentración de 0.9×10^{-2} mg/L y manteniéndose en un promedio de 0.8×10^{-2} mg/L hasta el final del periodo.

La diferencia de las dinámicas del NO_3^- entre los sistemas que contienen sólo microorganismos y plantas con microorganismos puede deberse a diversos factores, sin embargo es notorio que la comunidad de microorganismos denitrificantes encargados de transformar el nitrato en otros compuestos nitrogenados son inhibidos por algún compuesto que pudiera ser segregado por el componente vegetal, lo anterior se ve reflejado en la acumulación de nitratos, así como en el aumento en los niveles de materia orgánica disuelta medida como D.Q.O. y reducción en el potencial redox en el sistema que contenía bacterias mas componente vegetal, la disminución del potencial redox se presentó en una magnitud de 198 mV para el día 28 y esto sugiere un claro descenso en la actividad bacteriana y una posible muerte celular en la comunidad de microorganismos e induciendo así un aumento en las concentraciones de materia orgánica disuelta medida como D.Q.O. (Fig. 72). Otro factor importante a considerar fue la pérdida de biomasa vegetal por senescencia en la medida que avanzó el experimento, lo cual pudiera indicar algún tipo de tensión fisiológica del componente vegetal que puede estar asociado a algún microorganismos en los sistemas, como es el caso de *Agrobacterium* sp., el cual fue identificado como componente del consorcio. Este tipo de microorganismos produce tumores en la zona del rizoma provocando la secreción de hormonas por parte de la planta y posteriormente su muerte

(Pitzschke, 2010), de tal manera que la secreción de sustancias por la planta como respuesta a estas bacterias pudo haber afectado la comunidad bacteriana desnitrificante sin embargo los alcances del presente trabajo de investigación no proporcionan argumentos contundentes para esclarecer esta hipótesis. En el caso del SEHA inoculado sólo con microorganismos, el consumo de materia orgánica disuelta medida como D.Q.O. hasta el día 35 fue de 35.44 mg/L cada 7 días, mientras que el potencial redox se mantuvo estable en un promedio de 210 mV (Fig. 72). Los 7 días posteriores hubo un aumento de 40 mV, para descender hasta 134 mV en el día 56, coincidiendo con el aumento de la materia orgánica disuelta medida como D.Q.O. hasta en una concentración 508 mg/L para el mismo periodo, sin embargo y a diferencia del tratamiento con plantas y microorganismos, las concentraciones de NO_3^- se mantuvieron en valores no detectables. Por lo tanto podemos plantear que la disminución en el potencial redox y el aumento en la concentración de la materia orgánica disuelta medida como D.Q.O. son indicios de una baja en la actividad metabólica de la comunidad de bacterias heterótrofas, la cual aparentemente no afectó a la comunidad de bacterias nitrificantes en este SEHA puesto que no se percibieron alteraciones significativas en cuanto a las tendencias de las dinámicas de la nitrificación, enriqueciendo la hipótesis sobre el efecto que existió en el SEHA que contenía plantas sobre la comunidad bacteriana afectando el proceso de desnitrificación que se planteó anteriormente.

Las tendencias sobre la concentración del O.D. en los dos tratamientos fueron muy similares, para el tratamiento que contenía plantas más microorganismos, el valor promedio para concentración del O.D. fue de 5.52 mg/L, mientras que para el tratamiento sólo con microorganismos se obtuvo un promedio de 5.71 mg/L, manteniéndose constante en ambos casos durante los 56 días de monitoreo (Figura 72). El valor del pH para el tratamiento con componente vegetal más microorganismos registró un descenso promedio de 2.05 unidades de pH cada 7 días, mientras que para el tratamiento sólo con microorganismos, el valor promedio fue de 3.67 unidades. Las diferencias encontradas entre tratamientos pueden estar relacionadas con los valores de potencial redox (Figura 73), los

cuales como se vio anteriormente son más altos en el SEHA que contenían sólo microorganismos a diferencia del que contenía microorganismos mas el componente vegetal, mostrando una correlación entre la disminución del pH y la transformación de amonio hasta nitritos (Figura 73). La actividad metabólica de los microorganismos nitrificantes puede ser evidenciada a través del potencial redox, el cual puede ser referente de la actividad oxidadora por la comunidad de bacterias nitrificantes. En cuanto a la temperatura se mantiene estable para ambos tratamientos en un promedio de 25° C para ambos sistemas.

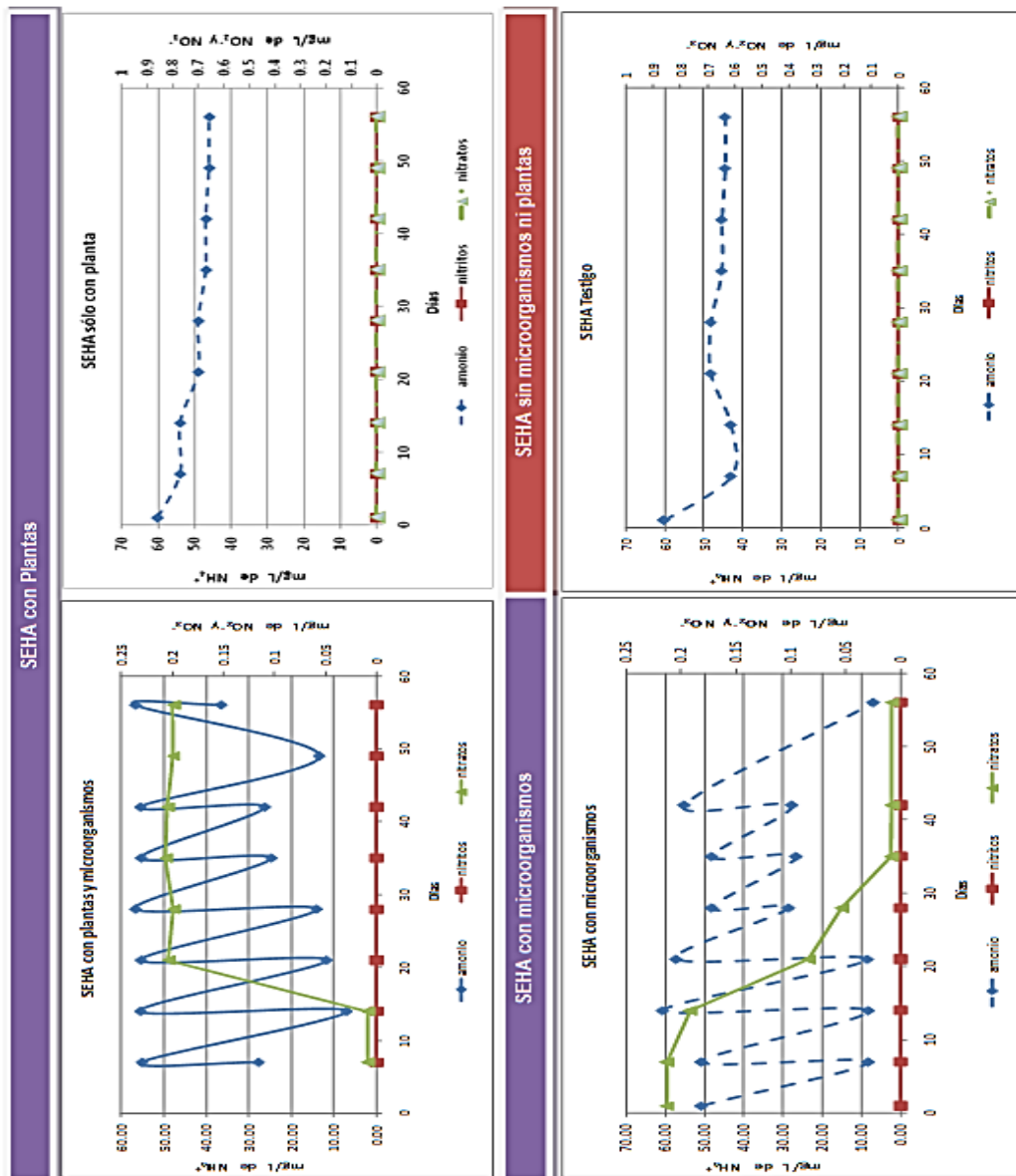


Figura 71. Dinámicas del NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- en los SEHA durante 56 días en los diferentes tratamientos

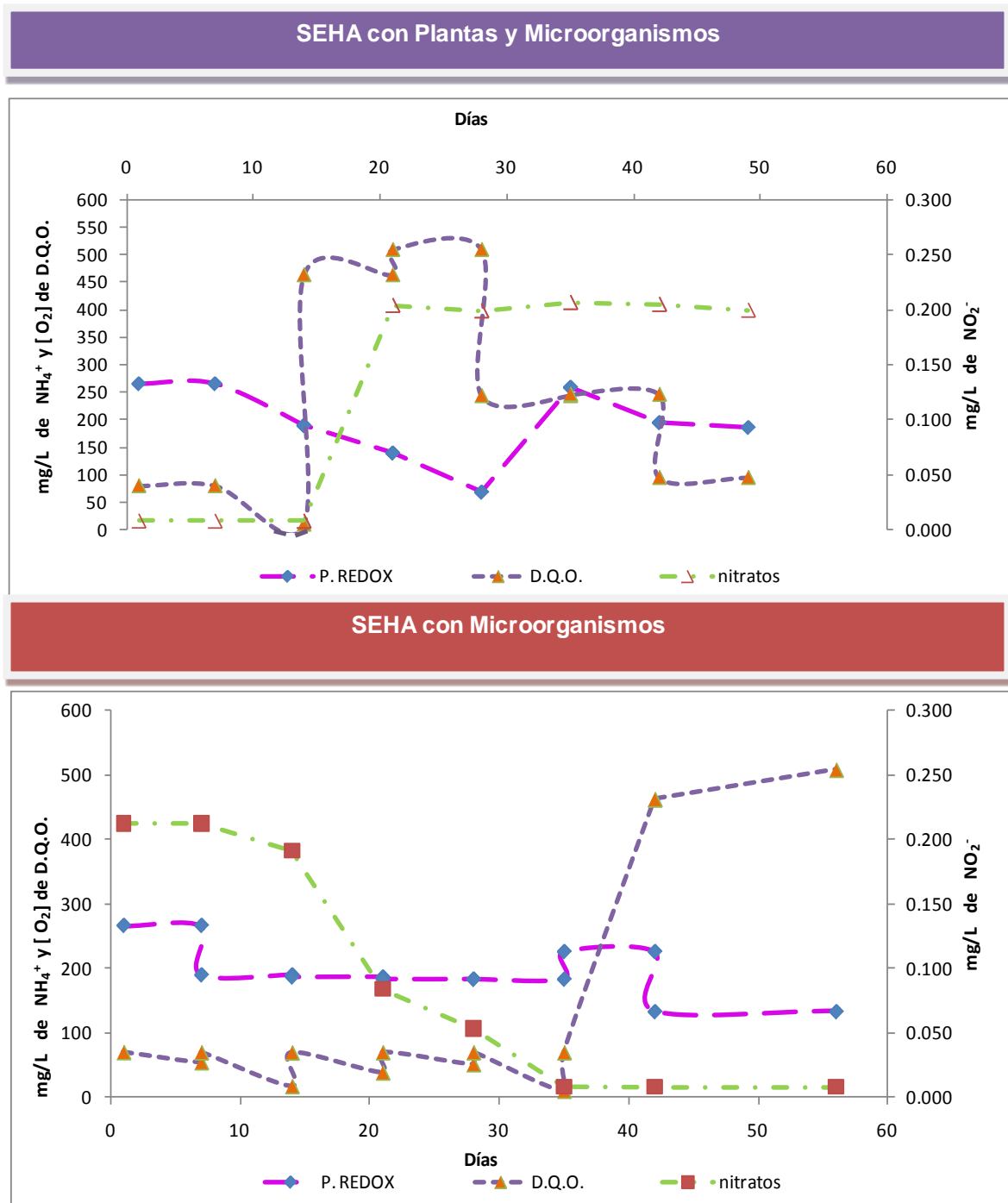


Figura 72. Dinámicas del Potencial redox, D.Q.O. y NO_3^- , en los SEHA con diferentes tratamientos durante 56 días.

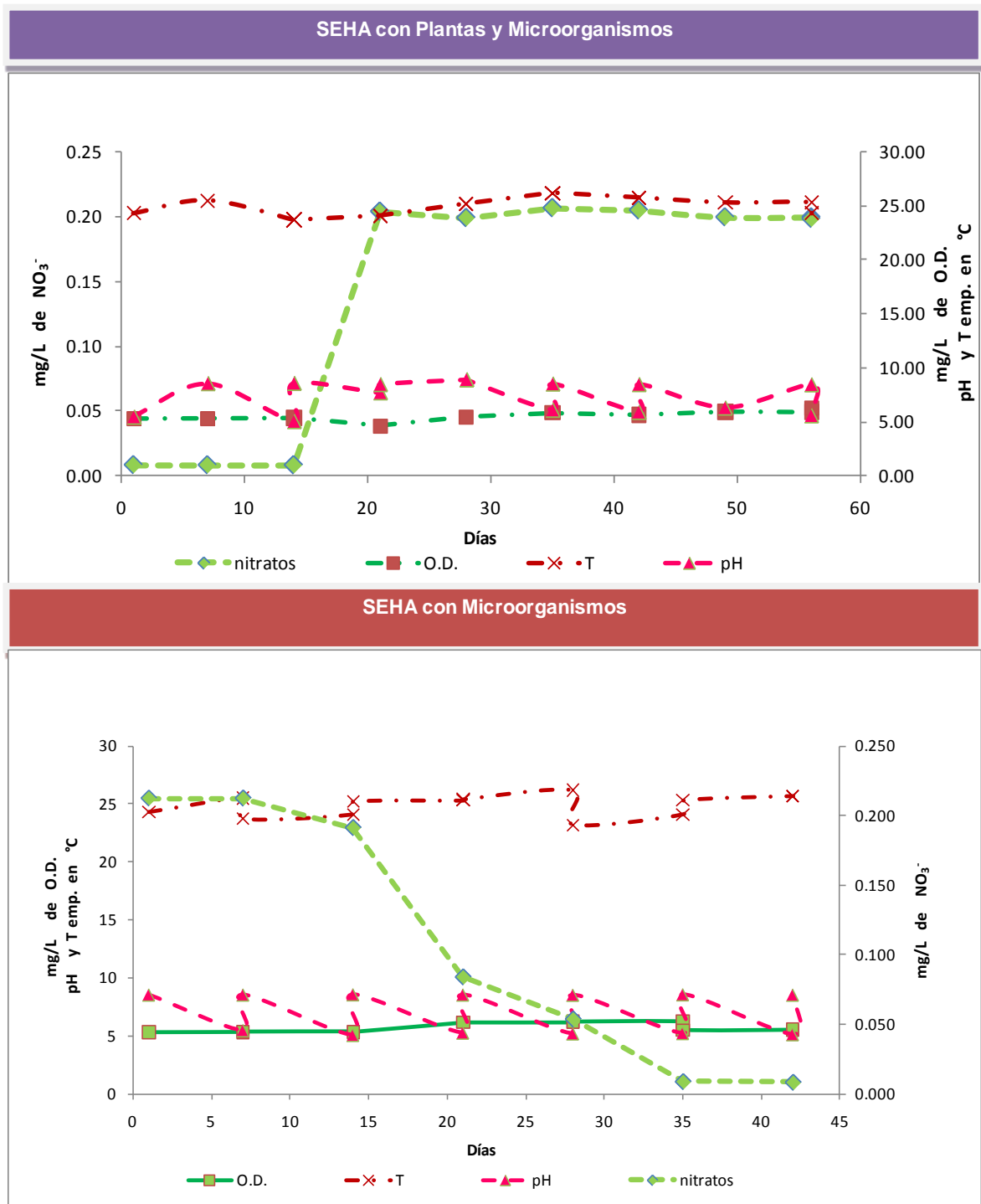
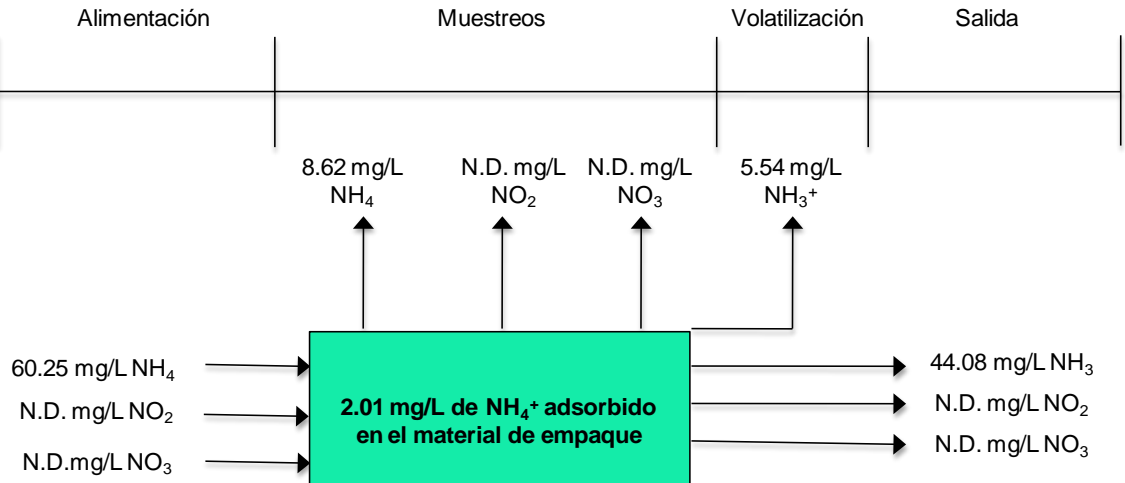


Figura 73. Dinámicas del O.D. pH, Temperatura en °C y NO₃⁻, en los SEHA con diferentes tratamientos durante 56 días

5.2.4 Balance de masa de los SEHA

Los datos generados sobre la dinámica de degradación del amonio en los diferentes tratamientos en los SEHA, permitieron realizar el balance de masa de los distintos tipos de tratamiento.

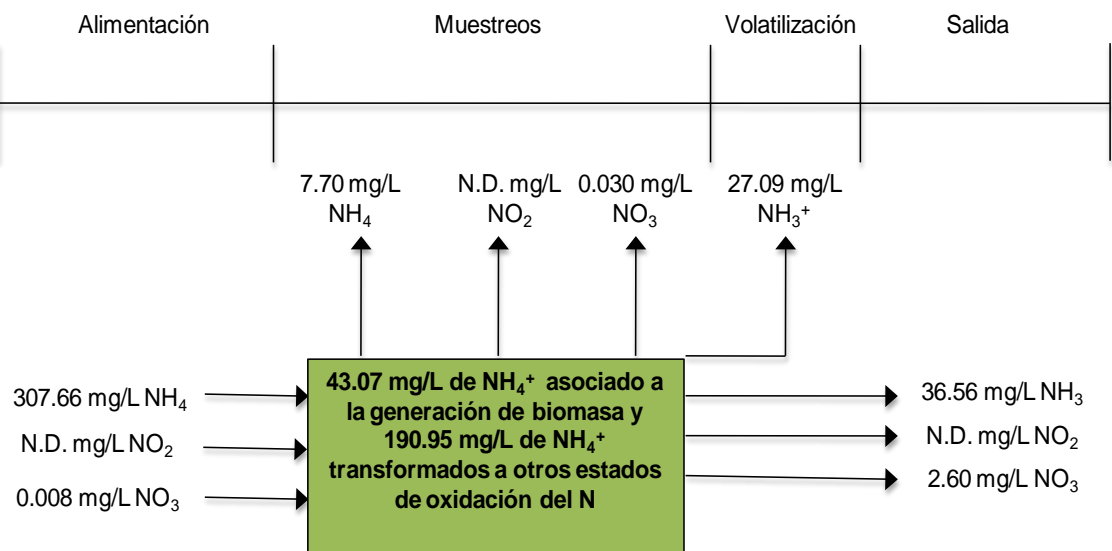


N.D. No detectable por las técnicas empleadas

Figura 74. Balance de masa del amonio para el SEHA con el tratamiento sólo con componente vegetal a 56 días

El balance de masa para el SEHA que sólo contenía componente vegetal, muestra que se obtuvo una pérdida de 26.83 % de la concentración del amonio inicial, de los cuales 14.30 % fue pérdida por muestreo y el 9.19 % por volatilización como NH_3^+ , mientras que el 3.34 % del nitrógeno quedó adsorbido dentro del SEHA. El descenso en la concentración de amonio, descartando la pérdida por muestreo, está asociado a procesos físicos-químicos como la volatilización y la adsorción. En el tratamiento no fueron detectados la formación de NO_2^- y NO_3^- por las técnicas empleadas, lo cual pone en evidencia la importancia de los microorganismos en cuanto a la oxidación del amonio ya que no existió una transformación del amonio a compuestos como nitritos o nitratos. Los resultados de este balance permitieron estimar qué porcentaje de amonio se perdió por volatilización y así poder complementar el balance del sistema que contenían tanto plantas como microorganismos.

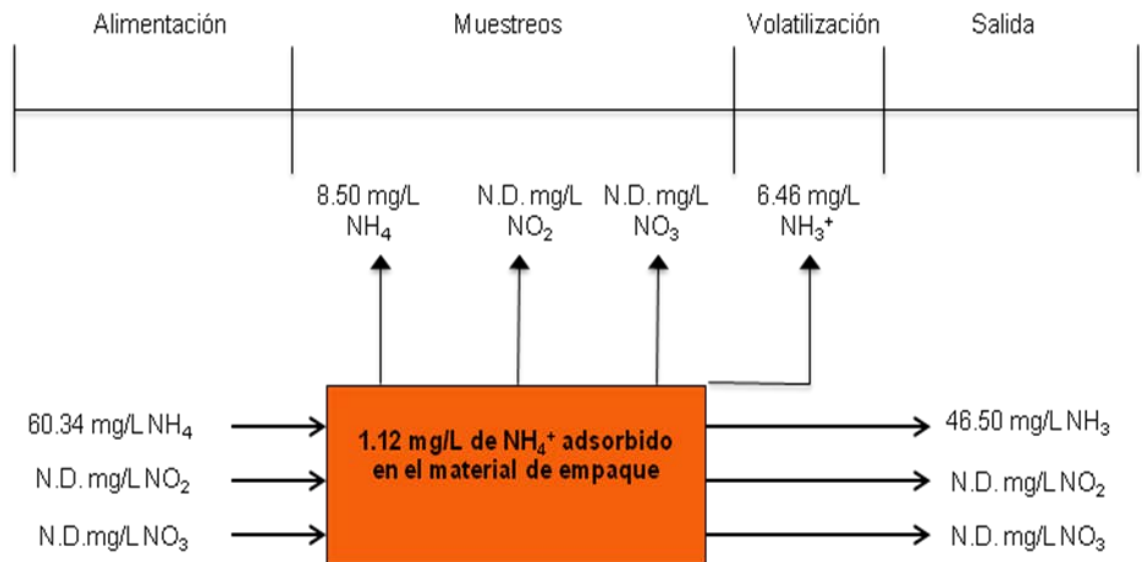
El balance de masa para el SEHA que contenía componente vegetal más microorganismos (Figura 75), muestra que se hubo una pérdida del 88 % de amonio, de los cuales 2 % fue pérdida por muestreo, el 8.8% se perdió por volatilización como NH_3^+ , este dato es obtenido a partir de la diferencia de concentraciones con el testigo (Figura 76), el 14 % del nitrógeno degradado se asocia con el crecimiento de la biomasa de microorganismos (detalles ver Anexo III).



N.D. No detectable por las técnicas empleadas

Figura 75. Balance de masa del amonio para el SEHA con el tratamiento con componente vegetal más microorganismos en 56 días

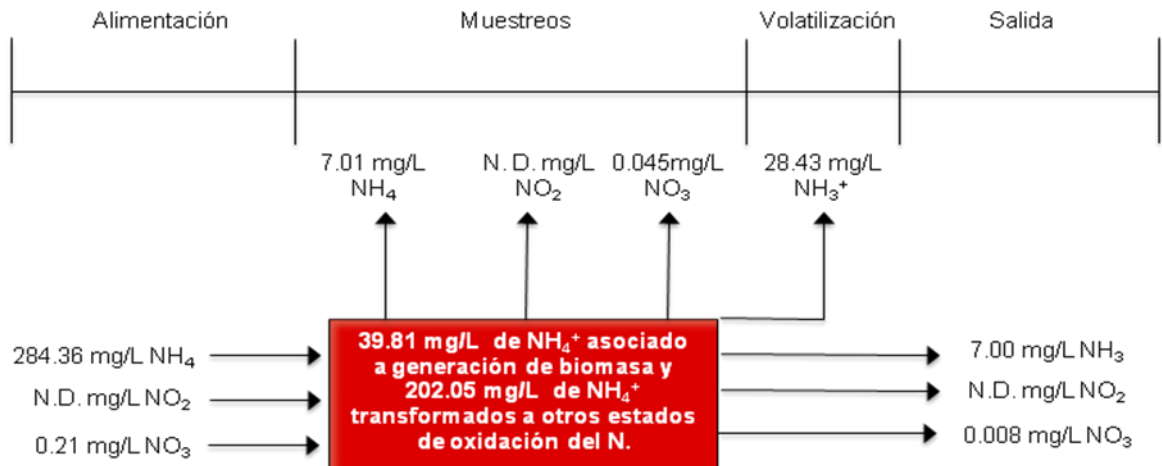
El 62.06 % del NH_4^+ que equivale a 190.95 mg/L fue transformado a otros compuestos nitrogenados, como se puede apreciar en la Fig. 77, las bajas concentraciones de nitritos y en el aumento en la concentración de NO_3^- , es resultado de la transformación del NO_2^- a NO_3^- por bacterias nitratantes, el cual aumentó en 325 veces su concentración inicial. Los nitratos a su vez paulatinamente fueron degradados hacia otras formas de oxidación del nitrógeno, entrando muy probablemente a la ruta biogeoquímica de la desnitrificación aerobia (Kadlec, 2009) generando compuestos tales como N_2O , NO y N_2 y algunos otros óxidos de nitrógeno (N_xO_y).



N.D. No detectable por las técnicas empleadas

Figura 76. Balance de masa del amonio para el SEHA con el tratamiento sin microorganismos ni componente vegetal a 56 días

El balance de masa para el SEHA que no contenía microorganismo ni componente vegetal (testigo), muestra que se obtuvo una pérdida de 22.93 % de la concentración del amonio inicial, de los cuales 14.08 % fue pérdida por muestreo y el 10.70 % por volatilización como NH_3^+ , mientras que el 1.85 % del nitrógeno quedó adsorbido dentro del SEHA, a diferencia del testigo con plantas el porcentaje de adsorción es menor debido a que probablemente la zona del rizoma en dicho tratamiento adsorbió mayor cantidad de amonio. Como se puede observar en la Figura 77, el descenso en la concentración de amonio, al igual que en el testigo con plantas está asociado a procesos físicos-químicos como la volatilización y la adsorción. En el tratamiento no se detectó la formación de NO_2^- y NO_3^- por las técnicas empleadas, ya que no existieron microorganismos que metabolizaran la oxidación del amonio a compuestos como nitritos o nitratos. Los resultados de este balance permitieron estimar, que se perdieron 6.46 mg/L de NH_3 durante 56 días en 0.19 m^2 según las dimensiones de los SEHA, valor que se encuentra por debajo de lo reportado por autores como Kadleck (2009) y Hunt (2002,2003), los cuales reportan 475 mg/L de pérdida por evaporación de NH_3 por m^2 al mes en sistemas naturales, por lo tanto este valor se encuentra dentro de rangos reportados en la literatura.



N.D. No detectable por las técnicas empleadas

Figura 77. Balance de masa del amonio para el SEHA con el tratamiento sólo con microorganismos a 56 días

El balance de masa para el SEHA que contenía sólo microorganismos, muestra que se obtuvo una degradación del 97.53 % de amonio, de los cuales 2.52 % fue pérdida por muestreo, 10.23 % se perdió por volatilización como NH_3^+ , 14.35 % del nitrógeno degradado se asocia con el crecimiento de la biomasa de microorganismos. El 72.08 % del NH_4^+ que equivale a 202.05 mg/L fue transformado a nitritos por las bacterias oxidadoras de amonio, la baja concentración de los nitritos evidencia una alta cinética en la transformación hacia nitratos por las bacterias nitratantes de tal manera que no permitieron su acumulación en el SEHA completándose así el proceso de nitrificación. El descenso en la concentración de nitratos está asociado a la desnitrificación aerobia por bacterias oligótrofas y heterótrofas facultativas (Kadlec, 2009). La concentración promedio de O.D. para este tratamiento fue de 5.71 mg/L, por tal motivo prevaleció un ambiente aerobio, generando la desnitrificación y favoreciendo el descenso de los nitratos en 26.25 veces su concentración inicial, esta transformación probablemente fue realizada por bacterias heterótrofas de los géneros *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Flavobacterium*, *Propionibacterium* (Focht y Verstraete, 1977), las cuales fueron identificadas en el consorcio bacteriano dentro de los SEHA, llevando este compuesto a otros estados de oxidación del nitrógeno tales como N_2O , NO , N_2 y algunos otros óxidos de nitrógeno (N_xO_y).

Los resultados sobre los balances en los diferentes tratamientos en los SEHA, muestran que en promedio, el porcentaje de degradación para los sistemas fue de 90 % del cual el 78% fue degradado por la comunidad microbiológica, mientras que un 10 % es atribuible a volatilización y cerca de un 2 % por adsorción, poniendo en evidencia la gran influencia de los microorganismos los procesos tanto de nitrificación como en la desnitrificación, evitando que exista una acumulación que pudiera ser nociva para los organismos nitratantes como es el caso de los NO_2^- , cuyas concentraciones mayores a 0.20 mg/L resultaron ser nocivas para los microorganismos oxidadores de amonio, por consiguiente la transformación del NH_4^+ a NO_3^- y NO_3^- a NO y N_2 , son complementarias y transforman el amonio que se encuentra en los sistemas en otros estados de oxidación del nitrógeno que los haga biodisponibles para microorganismos heterótrofos o bien autótrofos (Kadlec, 2009).

En cuanto a los parámetros monitoreados como el pH, potencial redox y materia orgánica disuelta medida como D.Q.O., están fuertemente relacionados con la dinámica y actividad metabólica de los organismos, mientras que el O.D. y la temperatura aparentemente no modifican las dinámicas de la nitrificación en los SEHA, sin embargo para conocer y cuantificar si existen diferencias significativas en cuanto a las cinéticas de degradación y la influencia de los parámetros antes mencionados, fue necesario realizar un análisis estadístico que permitiera esclarecer las hipótesis planteadas en esta sección. Los porcentajes de remoción de Nitrógeno reportados en sistemas de HA son similares a los encontrados en el presente estudio (Tabla 17), sin embargo las comparaciones por porcentajes de remoción son subjetivas, debido a que no es comparable tener porcentajes de remoción altos hasta del 90 % cuando las concentraciones del influente del sistema son bajas o menores, es decir no es lo mismo remover el 90 % de 10 mg/L de NH_4^+ a remover el 40 % de 100 mg/L de NH_4^+ , por lo tanto es recomendable para fines comparativos tomar como valor de referencia las constantes de degradación, puesto que estas por su naturaleza nunca serán mayores a 1 no importando su concentración, de tal forma que permiten una comparación real entre sistemas, sin embargo sólo algunos autores como Akrotos (2009) y Wang (2009), realizan las modelaciones en función de las constantes de la

nitrificación. Por otra parte las variaciones en los porcentajes de remoción entre tratamientos son debidas en primer lugar al tipo de agua con la cual son alimentados los sistemas, así como las concentraciones de los contaminantes, el tipo de sustrato empleado y las condiciones de operación, por tal motivo estas condiciones en gran medida condicionan el tipo de comunidades de organismos degradadores en los sistemas y por ende la eficiencia en la remoción de los distintos contaminantes.

Tabla 17. Comparación de diferentes sistemas de HA en cuanto a su forma de alimentación, tipo de vegetación, concentración de NH_4^+ de entrada.

Autor	Mayo y Bigambo, 2005	Liu et al., 2005	Howell et al., 2005	Tunçsiper et al., 2006	Chan et al., 2008	Akratos et al., 2009	Wang et al., 2009	Modelo Nitrificación 2011
Tipo de influente	Agua residual doméstica	Agua residual pre tratada	Agua residual pre tratada	Agua residual doméstica pre tratada	Agua residual doméstica	Agua residual artificial	Agua residual artificial	Agua residual artificial doméstica
Tipo de humedal	HAFH	HAFH	HAFSH	HAFH y HAFHS	HAFH	HAFH	HAFV	HAFV
Especies vegetales	<i>Typha domingensis</i> <i>Phragmites mauritanus</i>	<i>Typha latifolia</i> , <i>Typha domingensis</i> <i>Scirpus acutus</i> <i>Phragmites communis</i>	<i>Schenoplectus californicus</i>	<i>Canna</i> , <i>Cyperus</i> , <i>Typha</i> , <i>Juncus</i> , <i>Poaceae</i> , <i>Paspalum</i> <i>Iris</i>	<i>Cyperus alternifolius</i>	<i>Typha latifolia</i>	<i>Phragmites australis</i>	<i>Arundo donax</i>
Entrada de NH_4^+	207 mg/L	780 mg/L	94.29 mg/L	9.13 mg/L	32.71 mg/L	60 mg/L	50 mg/L	60 mg/L
% de remoción	48.1	45.60	37.78	76%	25%	70.33	48.08	90.02

5.3 Resultados de la Modelación Estadística

La modelación estadística permitió medir cuantitativamente la relación que guardan los efectos directos así como las interacciones entre estos, en la degradación del amonio y el efecto que tienen en el proceso de nitrificación en los SEHA.

Los resultados obtenidos tanto en la fase de experimentación previa así como dentro de los SEHA permitieron calcular las constantes de degradación y formación de los principales productos intermediarios de la fase de nitrificación, como son los nitritos y los nitratos. La correlación de los parámetros analizados durante la fase de experimentación previa, fue calculada por medio de un análisis de Spearman, el cual permitió plantear con una mayor representatividad las relaciones entre dichos parámetros dentro de los SEHA y así consolidar el planteamiento del GLM. El análisis del GLM permitió conocer qué parámetros inciden significativamente en el proceso de nitrificación y de esta forma plantear los componentes del modelo de simulación sobre el proceso de nitrificación en los SEHA en la plataforma de programación del software STELLA.

5.3.1 Resultados del análisis estadístico exploratorio

5.3.1.1 Resultados estadísticos exploratorios sobre la experimentación previa

Los resultados en esta sección fueron procesados de tal manera que permitieron una mejor comparación, para tal fin se calcularon las constantes de degradación (K_s) y formación de los principales compuestos intermediarios de la nitrificación (detalles en Anexo IV). La Tabla 18 muestra las constantes de degradación y formación obtenidas para los diferentes compuestos nitrogenados como resultado del proceso de nitrificación en los tratamientos realizados durante la fase de experimentación previa. Estos datos fueron analizados por medio de ANOVA para determinar si existen diferencias significativas en cuanto a los valores de las constantes calculadas.

Tabla 18. Constantes de formación y degradación de NH_4^+ , NO_2^- y NO_3^- en los diferentes tratamientos evaluados durante la fase de experimentación previa

Tratamiento	$K_{s(\text{NH}_4^+)}$ constante de degradación del Amonio	$K_{sF(\text{NO}_2^-)}$ constante de degradación de Nitritos	$K_{sF(\text{NO}_3^-)}$ constante de formación de Nitratos	$K_{sD(\text{NO}_3^-)}$ constante de degradación de Nitratos
NH4M	-0.06	0.37	0.01	0.00
NH4G	-0.07	0.77	0.05	0.00
NH4C	-0.04	0.90	1.09	-0.28
NH4M (Medio enriquecido con amonio e inoculado sólo con <i>Nitrosomonas europaea</i>) NH4G (Medio enriquecido con amonio más glucosa e inoculado sólo con <i>Nitrosomonas europaea</i>) NH4C (Medio enriquecido con amonio más glucosa e inoculado con un consorcio bacteriano) n=36				

Los resultados del análisis de ANOVA para $K_{s(\text{NH}_4^+)}$ en los tratamientos NH4M y NH4G muestran que no existió diferencia significativa entre los tratamientos, con un valor $p=0.88$.

De las comparaciones entre NH4M x NH4C y NH4G x NH4C se obtuvieron resultados con valores de: $p=0.61$ y $p=0.70$ respectivamente, en un intervalo de confianza del 95 % para todas las pruebas realizadas. Los análisis muestran que no existe diferencia significativa en cuanto a la constante de degradación del amonio para los tres tratamientos, puesto que en los tres casos el organismo que se encarga de degradar la fuente de NH_4^+ es sólo la bacteria *N. europaea*, puesto que esta bacteria sólo consume el amonio como fuente aceptora de electrones (Holt, 1999). Para la comparación entre los tratamientos NH4M y NH4G referente a uso de la glucosa como fuente de carbono el análisis no muestra diferencia significativa, debido posiblemente a los postulados de Holt (1999) y Crites (2005), los cuales mencionan que las bacterias quimiolitótrofas oxidadoras de amonio emplean el CO_2 como fuente principal de carbono, por lo que al ser la molécula de glucosa termodinámicamente más difícil de romper debido a su estructura, nos es empleada como fuente de carbono principal. Por lo tanto no se hace evidente una diferencia significativa en cuanto a la cinética de degradación.

Para la K_{SF} (NO_2^-) la comparación entre NH4M x NH4G no fue significativa, con un valor de $p=0.77$, mientras que, las comparaciones entre NH4M x NH4C y NH4G x NH4C la diferencia resultó ser significativa con $p=0.004$ para ambos casos. Para el caso de K_{SF} (NO_3^-) la comparación entre NH4M x NH4G fue no significativa con un valor de $p=0.061$, mientras que para los casos entre NH4M x NH4C y NH4G x NH4C, la diferencia resultó ser significativa con valores de $p=0.035$ y $p=0.01$ respectivamente. Para el tratamiento que contenía el consorcio bacteriano, las diferencias encontradas en cuanto a la constantes de degradación del los nitritos y nitratos, en comparación con los otros tratamientos, son debidas a la composición del consorcio bacteriano, ya que se encontraban microorganismos capaces de realizar la nitratación así como bacterias heterótrofas y oligótrofas, que pueden efectuar desnitrificación en ambientes aerobios (Kadlec, 2009). En cuanto al descenso en los valores del pH, los resultados del análisis de ANOVA para K_s (pH) en los tratamientos NH4M y NH4G muestran que no existe diferencia significativa, presentando un valor de $p=0.894$. Para las comparaciones entre NH4M x NH4C y NH4G x NH4C los valores obtenidos fueron no significativos con $p=0.612$ y $p=0.529$ respectivamente, evidenciando que las constantes de disminución de pH no difieren de forma significativa entre los tratamientos. En cuanto a las constantes de crecimiento y decaimiento de las poblaciones bacterianas en los medios NH4M y NH4G son muy similares con una $p=0.965$ para la k_s y $p=0.956$ en el caso de la k_{SF} , por lo tanto las constantes en cuanto a la dinámica poblacional de las comunidades bacterianas no se vieron afectadas entre tratamientos. El descenso en los valores del pH, así como las dinámicas poblacionales bacterianas presentaron una fuerte relación con el proceso de nitrificación. Los resultados del análisis de ANOVA para K_s (pH) en los tratamientos NH4M y NH4G muestran que no existe diferencia significativa, presentando un valor $p=0.894$.

Tabla 19. Constantes de disminución del pH, crecimiento y decaimiento poblacional de bacterias en los diferentes tratamientos evaluados durante la fase de experimentación previa

Tratamiento	$K_{S(pH)}$ constante de disminución del pH	K_S constante de crecimiento de <i>N. europaea</i>	K_{SD} constante de decaimiento de <i>N. europaea</i>
NH4M	-0.007	0.651	-0.085
NH4G	-0.012	0.655	-0.085
NH4C	-0.013	ND	ND
NH4M (Medio enriquecido con amonio e inoculado sólo con <i>Nitrosomonas europaea</i>) NH4G (Medio enriquecido con amonio más glucosa e inoculado sólo con <i>Nitrosomonas europaea</i>) NH4C (Medio enriquecido con amonio más glucosa e inoculado con un consorcio bacteriano) n=36			

Para las comparaciones entre NH4M x NH4C y NH4G x NH4C los valores obtenidos fueron no significativos con $p=0.612$ y $p=0.529$ respectivamente, evidenciando que las constantes de disminución de pH no difieren de forma significativa entre los tratamientos. En cuanto a las constantes de crecimiento y decaimiento de las poblaciones bacterianas en los medios NH4M y NH4G son muy similares con una $p=0.965$ para la k_s y $p=0.095$ en el caso de la k_{SF} , por lo tanto las constantes en cuanto a la dinámica poblacional de las comunidades bacterianas no se vieron afectadas entre tratamientos.

En cuanto las dinámicas del O.D. y la temperatura se mantuvieron constantes en todos los tratamientos, para comprobar esta hipótesis, se realizó una prueba de t de Student pareada al 95 % de intervalo de confianza entre los periodos analizados dentro de cada tratamiento, obteniendo que para el caso del O.D en el medio NH4M, el valor obtenido fue $p=0.274$, mientras que para el medio NH4G el valor de p fue de 0.962, por lo tanto podemos asumir que la concentración de oxígeno se mantuvo constante. La comparación de las dinámicas del O.D. entre los tratamientos NH4M y NH4G resultó ser no significativa con $p=0.740$.

Las pruebas realizadas para verificar si el O.D. se mantuvo constante en el tratamiento NH4C dieron como resultado una p con valor de 0.476, por lo tanto no se encontró una

diferencia estadística significativa entre los periodos analizados y la concentración de O.D. en el tratamiento por lo que podemos asumir que se mantuvo constante durante el experimento.

La comparación entre los tratamientos NH₄M x NH₄C y NH₄G x NH₄C resultó ser no significativa, con una valor de $p=0.618$ y 0.621 respectivamente, de tal forma que no existió diferencia significativa en cuanto a la concentración de O.D. entre los tratamientos.

La temperatura se mantuvo estable para todos los tratamientos con una p entre periodos de: $p=0.338$ para el medio NH₄M, $p=0.063$ para el tratamiento NH₄G y $p=0.427$ para NH₄C, por lo tanto la variación entre periodos de cada tratamiento resultó ser no significativa.

La comparación sobre la dinámica de la temperatura entre los tratamientos NH₄M y NH₄G dio como resultado un valor de $p= 0.955$, por lo tanto la diferencia no es significativa. Para el caso de NH₄M x NH₄C y NH₄G x NH₄C la diferencia resultó ser no significativa con una $p=0.781$ y $p=0.820$ respectivamente, por lo tanto podemos establecer que no existió diferencia significativa en cuanto a la temperatura entre los diferente tratamientos de la fase de experimentación previa.

5.3.2 Análisis de correlación durante la fase de experimentación previa

5.3.2.1 Análisis de correlación del amonio por tratamiento en función de los parámetros analizados

Los análisis de correlación sobre la degradación del amonio en los diferentes tratamientos de la fase de experimentación previa (Tabla 20, Pág. 146), arrojaron como resultado que para el medio NH₄M, la r de correlación entre el amonio y los nitritos fue de -0.86, mientras que para nitratos fue de -0.69.

Para el caso del pH la r de correlación fue de -0.92, mientras que para las UFC fue de -0.60. El tratamiento NH₄G presentó una r de correlación entre el amonio y los nitritos mayor al tratamiento anterior, con valor de -0.97, mientras que para nitratos fue de -0.92, para el caso del pH el valor de la r disminuyó, obteniendo un valor de -0.88. Para las UFC la r fue de -0.41.

Estos análisis ponen en evidencia la fuerte relación que existe entre la degradación del amonio y el aumento en la concentración de nitritos y nitratos, esta relación también se hace evidente entre el aumento en las UFC y la degradación del amonio, mientras que para el pH la correlación es directa, es decir en la medida que desciende la concentración del amonio disminuyen también los valores de pH. En cuanto al O.D. y la temperatura las r calculadas fueron muy pequeñas (detalles ver anexo V) y en consecuencia los valores obtenidos para el análisis de correlación fueron descartados, apoyados en los resultados de los análisis estadísticos antes presentados, los cuales mostraron que los valores para estos parámetros no cambiaron entre periodos, por lo tanto no se encontraron variaciones significativas que puedan correlacionarse de forma consistente con los análisis de correlación. Para el caso del tratamiento NH₄C la r de correlación entre el amonio y los nitritos fue de -0.74, mientras que para nitratos la correlación fue de -0.17, la cuál es muy baja en comparación con los otros tratamientos.

Tabla 20. Índices de correlación de las concentraciones del amonio en los diferentes tratamientos durante la fase experimental

Tratamientos	NH4M	NH4G	NH4C
Parámetros	Amonio	Amonio	Amonio
Amonio	1	1	1
Nitritos	-0.86	-0.97	-0.75
Nitratos	-0.69	-0.92	-0.18
pH	0.92	0.88	0.99
O.D.	-0.36	-0.15	-0.45
Temp	-0.48	-0.15	-0.64
UFC	-0.6	-0.41	N.D.

Los resultados obtenidos muestran la relación directa entre la degradación del amonio y el aumento en la concentración de los nitritos, sin embargo los valores obtenidos para la correlación con los nitratos sugieren que no existe una relación directa entre el descenso en las concentraciones del amonio y el aumento en las concentraciones de nitratos. Estas diferencias pueden explicarse debido al tipo de inóculo que contenían los tratamientos, ya que son diferentes grupos los que se encargan de metabolizar los compuestos nitrogenados, de tal forma que las bacterias nitrificantes como la *Nitrosomonas europaea* sólo emplearon el amonio como sustrato y las *Nitrobacter* a los nitritos, produciendo nitratos como resultado de la nitratación, por lo tanto para que se lleve a cabo la nitrificación, es necesaria la actividad los dos tipos de bacterias, pues existe un co-metabolismo entre estos grupos de organismos, sin el cual no puede llevarse a cabo el proceso de nitrificación. Para el caso del pH el valor de la r obtenido fue de -0.98 mostrando que la correlación es directa entre ambos parámetros, la degradación del amonio y la disminución del valor del pH en este tratamiento. En cuanto al O.D. y la temperatura las r calculadas fueron mayores que en los tratamientos anteriores (detalles ver anexo V), sin embargo los valores obtenidos para el análisis de correlación fueron descartados, debido a los resultados obtenidos en los análisis estadísticos antes presentados, los cuales mostraron que los valores para estos parámetros no cambiaron entre periodos, por lo tanto no se encontraron variaciones significativas que puedan correlacionarse de forma consistente con los análisis de correlación.

5.3.2.2 Análisis de correlación de los nitritos y nitratos por tratamiento en función de los parámetros analizados

Los análisis de correlación sobre la formación de nitritos en los diferentes tratamientos durante la fase de experimentación previa (Tabla 21), arrojaron como resultado que para el medio NH4M, la r de correlación entre los nitritos y nitratos fue de 0.59, para el pH fue de -0.72, mientras que para las UFC fue de apenas 0.24. Para el caso del NH4G la r de correlación entre los nitritos y nitratos fue mayor que en el caso anterior, con valor de -0.97, para el caso del pH el valor de la r fue de -0.83, mientras que para las UFC fue de 0.29. Los resultados muestran una buena correlación entre la generación de nitritos y nitratos, es decir ambos tienden una tendencia a aumentar en la medida que disminuye la concentración del amonio. En cuanto a la correlación de los nitritos con el pH, muestra que en la medida que descienden los valores de pH, la concentración de nitritos aumenta. Para las UFC la correlación es baja, debido posiblemente al aumento en la concentración de nitritos, los cuales producen un descenso en la biomasa provocando la muerte celular o bien inhibición para las *Nitrosomonas europaea*, razón por la cual se observa una baja correlación.

Tabla 21. Índices de correlación de las concentraciones de los nitritos

Tratamiento	NH4M	NH4G	NH4C
Parámetros	Nitritos	Nitritos	Nitritos
Amonio	-0.86	-0.97	-0.75
Nitritos	1	1	1
Nitratos	0.59	0.97	0.53
pH	-0.79	-0.83	-0.81
O.D.	0.26	0.19	0.41
Temp	0.065	0.03	0.31
UFC	0.24	0.29	N.D.

Los análisis de correlación sobre la formación de nitritos y nitratos en el tratamiento NH4C muestran como resultado un valor de r de 0.53, para caso del pH fue de -0.81. Los resultados muestran correlación entre la generación de nitritos y nitratos, con una

tendencia a aumentar en la medida que disminuye la concentración del amonio. En cuanto a la correlación de los nitritos con el pH, muestra que en la medida que descienden los valores de pH, la concentración de nitritos aumenta. Los análisis de correlación sobre la formación de nitratos en los diferentes tratamientos durante la fase de experimentación previa (Tabla 22), muestran que para el medio NH₄M, la *r* de correlación entre nitratos y el pH fue de -0.81, para las UFC fue de 0.72, mientras que para el O.D. fue de 0.82.

Para el caso del NH₄G la *r* de correlación entre los nitratos y el pH fue de -0.87, para las UFC fue de 0.40, mientras que para el O.D. fue de 0.41. Los resultados muestran correlación inversa con el pH, muestra que en la medida que descienden los valores de pH, la concentración de nitritos aumenta.

Tabla 22. Índices de correlación de las concentraciones de los nitratos

Tratamiento	NHM4	NH4G	NH4C
Parámetros	Nitratos	Nitratos	Nitratos
Amonio	-0.69	-0.92	-0.18
Nitritos	0.59	0.97	0.53
Nitratos	1	1	1
pH	-0.81	-0.87	-0.03
O.D.	0.82	0.41	-0.31
Temp	0.67	0.19	-0.61
UFC	0.72	0.40	N.D.

En cuanto a las UFC y la concentración de O.D. la tendencia de la correlación es directa, ya que a medida que aumentan las concentraciones de nitratos aumentan las concentraciones de O.D. y UFC por mL. Los análisis de correlación sobre la formación de nitratos en el tratamiento NH₄C muestran como resultado un valor de *r* de 0.53, para caso del pH fue de -0.03. Los resultados indican una correlación entre la generación de nitritos y nitratos, con una tendencia a aumentar en la medida que disminuye la concentración del amonio. En cuanto a la correlación de los nitratos con

el pH, muestran una baja correlación, poniendo en evidencia que si bien, el descenso en los valores del pH tiene una fuerte correlación con la degradación del amonio y la producción de nitritos, este descenso no está relacionado con la producción de nitratos. Índices de correlación de las concentraciones de los nitritos y nitratos en los diferentes tratamientos durante la fase experimental. De la misma forma las concentraciones de O.D. mantienen una correlación inversa es decir cuando aumenta la concentración de nitratos, disminuye la concentración de oxígeno.

Esta dinámica se comporta de forma inversa en comparación con los tratamientos anteriores y es debido a la presencia de bacterias nitratantes, las cuales son capaces de transformar los nitritos a nitratos, esto aunado a que en el consorcio se encontraban bacterias heterótrofas y oligótrofas capaces de transformar los nitratos en otros compuestos, permitiendo que no se acumularan en productos que pudieran inhibir el proceso de nitrificación.

5.3.3 Sinopsis del análisis estadístico exploratorio de la fase de experimentación previa

Los resultados obtenidos mostraron que no existe diferencia entre los diferentes tipos de tratamientos evaluados, en cuanto a la degradación del amonio. Lo anterior pone de manifiesto que la degradación del amonio en todos los sistemas es debida casi en su totalidad a la actividad de las bacterias nitratantes *Nitrosomonas europaea*. Las diferencias encontradas en cuanto a las dinámicas de degradación y transformación de nitratos y nitritos entre los tratamientos que sólo contenían *Nitrosomonas europaea* y el que contenía el consorcio fueron debidas principalmente a los organismos que componían el consorcio, ya que estos fueron capaces de transformar el amonio a nitritos y posteriormente a nitratos, empleando para este último paso principalmente el CO₂ producido por la actividad metabólica de las heterótrofas. La presencia de bacterias heterótrofas mostró una fuerte influencia en la degradación de compuestos nitrogenados, debido a que aportaron fuentes de carbono empleadas por bacterias quimiolitótrofas para realizar la nitratación. Por otro lado si bien la glucosa como fuente

de carbono no modificó las dinámicas de degradación del amonio ni el crecimiento bacteriano en los tratamientos sólo con *N. europaea*, si contribuyó al desarrollo de las bacterias heterótrofas y oligótrofas que se encontraban en el tratamiento que contenía el consorcio bacteriano, las cuales son capaces de realizar la desnitrificación en ambientes aerobios (Kadlec, 2009, Chang, 2011), estos microorganismos emplean fuentes de carbono como parte de su metabolismo, el cual permite la transformación de nitratos a compuestos como los N_xO_y o nitrógeno molecular. En cuanto a los análisis de correlación, se observó en todos los tratamientos que el descenso en el valor de pH está fuertemente relacionado con la degradación del amonio, del mismo modo la degradación del amonio está fuertemente relacionada con la producción de nitritos y el aumento de la biomasa. Los valores obtenidos para la correlación del amonio con los nitratos sugieren que no existe una relación directa entre el descenso en las concentraciones del amonio y el aumento en las concentraciones de nitratos, en cuanto al O.D. y la temperatura las correlaciones son bajas en relación a la degradación del amonio y producción y degradación de nitritos y nitratos.

5.3.4 Resultados del análisis estadísticos exploratorios de los SEHA

En la Tabla 23 se muestran las constantes de degradación y formación obtenidas para los diferentes compuestos nitrogenados como resultado del proceso de nitrificación en los SEHA. Estos datos fueron analizados por medio de análisis de varianza (ANOVA) aun 95 % de I.C, para determinar si existen diferencias significativas entre tratamientos en función de las constantes de degradación y formación dentro de lo SEHA.

Tabla 23. Constantes de formación y degradación de NH_4^+ , NO_2^- y NO_3^- en los diferentes tratamientos evaluados en los SEHA.

Tratamiento	$K_{s(\text{NH}_4^+)}$ constante de degradación del Amonio	$K_{sF(\text{NO}_2^-)}$ constante de formación de Nitritos	$K_{sD(\text{NO}_2^-)}$ constante de degradación de Nitritos	$K_{sF(\text{NO}_3^-)}$ constante de formación de Nitratos	$K_{sD(\text{NO}_3^-)}$ constante de degradación de Nitratos
SEHAP	-0.170	0.080	-0.410	0.056	0
SEHAPT	-0.005	0	0	0	0
SEHAM	-0.200	0.070	-0.630	0.058	-0.020
SEHAT	-0.004	0	0	0	0
SEHAP (Tratamiento con plantas e inóculo de microorganismos) SEHAPT(Tratamiento sólo con plantas) SEHAM(Tratamiento sólo con inóculo de microorganismos) SEHAT (Tratamiento sin plantas ni microorganismos) n=144					

Los resultados muestran que no existe diferencia significativa entre los tratamientos SEHAP y SEHAM con un valor $p=0.38$, mientras que las comparaciones entre los testigos SEHAPT y SEHAT resultaron ser no significativas con una $p=0.93$. Complementariamente se realizaron comparaciones entre el tratamiento SEHAP y los testigos (SEHAPT y SEHAT), las cuales dieron como resultado una diferencia significativa con una p de 5.03×10^{-5} y 7.02×10^{-5} respectivamente, del mismo modo las pruebas entre SEHAM con los testigos SEHAPT y SEHAT resultaron ser significativas con valores de p de 5.51×10^{-5} y 4.53×10^{-5} . Para el caso de la constantes $K_{sF(\text{NO}_2^-)}$ la comparación entre SEHAP y SEHAM resultó ser no significativa, con un valor de $p=0.67$. Estos resultados muestran que no existe diferencia significativa entre el tratamiento que contenían microorganismos mas componente vegetal y el que

contenía sólo microorganismos, poniendo en evidencia que el componente vegetal no modifica de forma significativa la dinámica de remoción del amonio y la producción de nitritos, por otro lado las comparaciones entre los testigos reflejan la gran importancia de los microorganismos en la degradación del amonio. Con base en los resultados obtenidos podemos establecer la importancia que tienen las bacterias oxidadoras de amonio en la degradación de este compuesto y su transformación dentro de los SEHA, mostrando que la nitrificación es resultado de la actividad metabólica de las bacterias oxidadoras del amonio transformando este compuesto en nitritos.

Los resultados en cuanto a la comparación en la formación de nitratos $K_{St(NO_3^-)}$ entre los tratamientos SEHAP y SEHAM fueron no significativos, con una p de 0.10. Los resultados obtenidos muestran que no hay diferencia significativa en el proceso de degradación del amonio así como en la producción de nitritos y nitratos en los diferentes arreglos en los SEHA, por lo tanto es posible afirmar que el componente vegetal no influye de forma directa ni significativa en el proceso de nitrificación, sin embargo la degradación de nitritos, la cual comprende el inicio del proceso de desnitrificación, se ve severamente afectada en el SEHAP, este efecto se ve reflejado en la acumulación de nitritos en el sistema, mientras que en el sistema SEHAM la tendencia sobre la concentración de nitritos fue a disminuir. Si bien el componente vegetal dentro de los HA tiene implicaciones sobre la absorción de nutrientes tales como el P y el N (Liandong, 2011), para efectos de la nitrificación no se encontró una influencia significativa sobre este proceso. Por otro lado es probable que el componente vegetal tenga alguna acción inhibitoria sobre los microorganismos encargados de realizar la desnitrificación como se mencionó anteriormente, sin embargo los alcances del proyecto no permiten esclarecer esta hipótesis. El descenso en los valores del pH tienen una fuerte relación con el proceso de nitrificación (Crites, 2005), las constantes de disminución para el pH en los medios SEHAP y SEHAM tuvieron un valor de -0.31 y -0.41 respectivamente, el análisis de ANOVA arrojó un valor de p de 0.052 el cual es no significativo estrictamente al 95 % de confiabilidad, por lo cual se interpreta que las constantes de disminución de pH no difieren de forma significativa entre los tratamientos. En cuanto a las concentraciones de O.D. se

encontró que tuvieron un valor promedio de 5.52 mg/L para el tratamiento SEHAP y 5.72 mg/L para el tratamiento SEHAM, las comparaciones por medio de ANOVA entre los tratamientos dieron como resultado un valor de $p=0.34$, por lo tanto no se registraron diferencias significativas en las concentraciones de O.D. Adicionalmente se realizaron pruebas de ANOVA entre los puntos de muestreo vertical para conocer si existía diferencia entre la concentración de O.D. a diferentes profundidades del lecho filtrante por cada tratamiento. Para ambos tratamientos se evaluaron los puntos M1, M2 y M3, los cuales se encuentran a una profundidad de 10 cm, 30 cm y 50 cm respectivamente, con referencia al borde de la tapa del reactor, los resultados mostraron que para el tratamiento SEHAP, no existe una diferencia significativa entre los puntos M1 y M2 con un valor de p de 0.46, entre M1 y M3 la p fue igual a 0.90, mientras que para M2 y M3 la p tuvo un valor de 0.50, por lo tanto al no registrarse una diferencia significativa en cuanto a la concentración de oxígeno a lo largo de la altura del lecho filtrante, podemos aseverar que el aporte de oxígeno que pudiera tener el componente vegetal en zona cercana al rizoma (M1), resulta ser no significativo bajo las condiciones de operación y con el organismo *Arundo donax* en los SEHA. Este comparativo se realizó de igual forma para el tratamiento SEHAM, en el cual no se encontraron elementos que pudieran indicar que existe una diferencia significativa entre los diferentes niveles verticales del lecho filtrante. Al no encontrar diferencias en la evaluación de los SEHA por tratamiento, así como por niveles dentro de los tratamientos, podemos decir que el aporte de oxígeno del componente vegetal es mínimo o despreciable y no modifica de forma significativa la dinámica de nitrificación dentro de los SEHA. Esto concuerda con lo reportado por Brix (1990) y Tanner (2003), donde se mencionan que el aporte de oxígeno por parte del rizoma hacia el medio circundante es despreciable y no tiene importancia cuantitativa en la degradación tanto del Nitrógeno como de materia carbonosa. En lo referente a la temperatura, se obtuvo un promedio de 25.05 ± 0.84 ° C para el tratamiento SEHAP, mientras que para el tratamiento SEHAM el promedio fue de 24.97 ± 0.83 ° C. Las pruebas sobre la estabilidad de la temperatura se realizaron por medio de una prueba de t de Student pareada, la cual dio como resultado una p a dos colas de 0.57 para la temperatura registrada del tratamiento SEHAP y 0.42 para el tratamiento SEHAM. Los resultados

indican que no existe una variación significativa en la temperatura dentro de los periodos analizados en los diferentes tratamientos. Las pruebas en cuanto a la dinámicas de temperatura entre tratamientos muestra que no existieron diferencias significativas entre los tratamientos, con valor de $p= 0.92$. Las pruebas de ANOVA entre tratamientos para el potencial redox muestran que no existe diferencia significativa entre los tratamientos SEHAP y SEHAM con un valor de $p=0.56$. En cuanto a la materia orgánica disuelta medida como D.Q.O. las pruebas entre tratamientos resultaron ser no significativos, con una $p= 0.17$, lo cual indica que no existe diferencia entre los tratamientos en los SEHA. Los resultados sobre los análisis estadísticos realizados a los diferentes tratamientos en los SEHA, permitieron establecer que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos SEHAP y SEHAM, por lo tanto podemos establecer que la presencia del componente vegetal no representa un factor que modifique de forma significativa las dinámicas del proceso de nitrificación en los SEHA, lo anterior sin descartar que el componente vegetal intervenga de forma significativa en la absorción, retención y metabolización de otros compuestos o formas del nitrógeno dentro de los sistemas de humedales artificiales.

La información generada en el presente capítulo, permitió conocer si las diferencias entre tratamientos eran significativas. Sin embargo debido a la naturaleza de las relaciones multivariadas entre los parámetros medidos y sus interacciones, no es posible medir por medio de análisis convencionales (como las matrices de correlación con el estadístico de Pearson) el efecto de todos los parámetros sobre las constantes de degradación y formación de los distintos compuestos nitrogenados dentro de la nitrificación. Para tal fin se realizó el análisis por medio de la herramienta estadística de los modelos lineales generalizados (GLM), los cuales permitieron conocer de qué forma influyeron e interaccionan los diferentes parámetros evaluados en el proceso de nitrificación.

5.4 Resultados del los GLMs

5.4.1 Modelo Lineal Generalizado para la degradación del amonio

El modelo generado para probar los efectos directos sobre la degradación del amonio se muestra en la Ecuación 7, mientras que los predictores empleados así como su nomenclatura se muestra en la Tabla 24.

Ecuación 7. Modelo lineal generalizado máximo para la degradación del NH_4^+

NH4GLM: (glm(formula = **NH4K** ~ **NO2K** + **NO3K** + **PHK** + **TEMP** + **OD** + **DQO**, family = gaussian)

Donde:

- Nombre del modelo
- Variable de respuesta
- Efectos directos

Tabla 24. Predictores empleados en la modelación de los GLM

Variables	Descripción
NH4K	Variable de respuesta (Constante de degradación del amonio a 7 días)
NO2K	Constante de formación de los nitritos a 7 días
NO3K	Constante de formación de los nitratos a 7 días
PHK	Constante de disminución del pH a 7 días
OD	Promedio del consumo del O.D. a 7 días
DQO	Promedio de fluctuación de la D.Q.O. a 7 días
TEMP	Promedio de fluctuación de la temperatura. a 7 días

Los resultados del modelo (Ecuación 7) mostraron una $r^2 = 60.96$, con un valor de devianza nula de 0.3189 a 22 grados de libertad y una devianza residual de 0.1245 a 16 grados de libertad (detalles del los cálculos ver anexo IV). Los efectos directos sobre la variable de respuesta sólo describen el 60 % de los datos analizados por este modelo.

El análisis por medio de pruebas de ANOVAs sobre cada efecto directo por la metodología de submodelos o modelos anidados arrojó los resultados que se muestran en la Tabla 25 a un intervalo de confianza (I.C.) del 0.95.

Tabla 25. Pruebas de efectos directos en el modelo para la degradación del amonio

Variables	Valor de "F"	Significancia
NO2K	0.04296	✓
NO3K	0.8971	✗
PHK	0.04669	✓
OD	0.6345	✗
UFC	0.4963	✗
TEMP	0.3398	✗
✗No significativo al 95 % ✓Significativo al 95 % n=144		

Por lo tanto estrictamente al I.C. del 0.95, sólo es significativo el efecto directo del pH sobre la constante de degradación del amonio. Los efectos directos de la constante de degradación del NO_3^- fueron no significativos para la degradación del NH_4^+ , puesto que no intervienen el proceso de nitrificación (Ec.1), ya que las bacterias que realizan la nitrificación toman como sustrato al amonio, mientras que las responsables de realizar la nitratación toman como sustrato los NO_2^- el cual es producto de la oxidación del amonio (Atlas, 2001) por lo tanto, la dependencia de las concentraciones de nitratos no es significativa para la oxidación del amonio, no obstante los NO_3^- pudieran mostrar dependencia de los NO_2^- los cuales son generados por la oxidación del amonio. En cuanto a la temperatura como se menciono anteriormente, se mantuvo estable como lo mostraron las pruebas realizadas con t de Student pareada, cuyo valor promedio fue de 25 ° C, la cual se encuentra en intervalos adecuados para el desarrollo de las bacterias oxidadoras de amonio (Holt, 1999), por lo tanto al no existir variación significativa la temperatura en el presente estudio no influyo de forma significativa en la oxidación del amonio. En cuanto al efecto de las concentraciones de O.D. sobre la degradación del NH_4^+ nunca fueron menores a 4 mg/L por lo tanto el efecto de este

factor sobre la remoción del amonio no es significativo para el presente estudio, pues según lo reportado por Beccari (1992) las cinéticas de degradación en la nitrificación sólo decrece cuando las concentraciones de O.D. son menores a 2 mg/L. En cuanto a las UFC el efecto los valores encontrados resultan ser no significativo, debido muy probablemente a que los valores experimentales obtenidos por técnicas tradicionales tales como las UFC como menciona Truu (2009), subestiman hasta en un 99% la densidad poblacional relativa de bacterias que se encuentran en los sistemas, por lo cual la estimación experimental realizada de biomasa por este método no es significativa para efectos de modelo sobre la cinética de remoción del NH_4^+ . El análisis sobre el efecto de la constante de formación de nitritos queda en el límite de decisión para ser aceptado como significativo sobre la degradación de NH_4^+ . Sin embargo, con base a la fuerte correlación que presentó la constante de degradación de NH_4^+ y la constante de formación de NO_2^- durante el análisis estadístico exploratorio, la constante de formación de nitritos es conservada como efectos directo junto al pH con el fin de obtener una mayor representatividad en el modelo. Con base a este análisis se planteo el Modelo lineal generalizado de efectos directos para la degradación del NH_4^+ (Ecuación 8).

Ecuación 8. Modelo lineal generalizado de efectos directos para la degradación del NH_4^+

NH4GLM: (glm(formula = **NH4K** ~ **NO2K** + **PHK** , family = gaussian)

Donde:

- Nombre del modelo
- Variable de respuesta
- Efectos directos

Obteniendo una $r^2 = 53.67$ para el modelo de degradación del amonio con estos dos efectos directos. Partiendo de este modelo se postuló el modelo máximo con interacciones, las interacciones probadas en modelo máximo así como su valor de significancia al 95 % se muestran la Tabla 26.

Tabla 26. Pruebas de interacciones en el modelo para la degradación del amonio

interacciones	Valor de "F"	Significancia
NO2K:NO3K	0.1528	x
NO3K:PHK	0.1665	x
NO3K:TEMP	0.7196	x
NO3K:UFC	0.8047	x
NO3K:OD	0.2589	x
NH4K:TEMP	0.5701	x
NH4K:UFC	0.2395	x
NH4K:OD	0.1192	x
NH4K:PHK	0.00096	✓
PH:UFC	0.3260	x
PH:OD	0.2440	x
OD:TEMP	0.0705	x
OD:UFC	0.8498	x
UFC:TEMP	0.1405	x
x No significativo al 95 % ✓ Significativo al 95 % n=144		

Para la prueba de interacciones sólo la interacción que involucra el pH con la constante de degradación del amonio fue significativa. Los resultados obtenidos permiten plantear el modelo mínimo u optimizado el cual está conformado como se ilustra en la Ecuación 9.

Ecuación 9. Modelo mínimo lineal generalizado de efectos directos para la degradación del NH_4^+

NH4GLM:(glm(formula = **NH4K** ~ **NO2K** + **PHK** + **NH4K:PHK** +, family = gaussian)

- Nombre del modelo
- Variable de respuesta
- Efectos directos
- Interacciones

Los resultados del análisis del GLM para la degradación del amonio en modelo denominado NH4GLM (Ecuación 9), presentan una $r^2 = 84.85$, aumentando el valor de la correlación obtenida sólo con los efectos directos. El modelo pone en evidencia la fuerte influencia del valor del pH como factor determinante en el proceso de degradación y su disminución como consecuencia de la transformación del NO_2^- en la nitratación (Park, 2009), así como la relación que existe en el aumento en las concentraciones de los nitritos como consecuencia de la oxidación del amonio.

5.4.2 Modelo Lineal Generalizado para las dinámicas de los nitritos

A partir del modelo máximo para la degradación del amonio, se originó el modelo general para probar los efectos directos sobre las dinámicas de los nitritos el cual se estructura de la siguiente forma:

Ecuación 10. Modelo lineal generalizado máximo para la degradación del NO_2^-

NO2GLM:(glm(formula = **NO2** ~ **NH4K** + **NO3K** + **PHK** + **OD** + **UFCTEMP**, family = gaussian)

Donde:

- Nombre del modelo
- Variable de respuesta
- Efectos directos

Los resultados de este modelo mostraron una $r^2 = 81.35$, por lo tanto la influencia de los efectos directos así como las interacciones sobre la variable de respuesta describen el 81 % de los datos analizados por este modelo. El análisis por medio de pruebas de ANOVA sobre cada efecto directo por la metodología de modelos anidados arrojó los resultados presentado en la Tabla 27 a un (I.C.) del 0.95.

Tabla 27. Pruebas de efectos directos en el modelo dinámicas de los nitritos

Variables	Valor de "F"	Significancia
NH4K	0.4296	x
NO3K	0.0378	✓
PHK	0.7509	x
OD	0.7099	x
UFC	0.8043	x
TEMP	0.7085	x
x No significativo al 95 % ✓ Significativo al 95 % n=144		

Por lo tanto estrictamente al I.C. del 0.95, sólo es significativo el efecto directo del NO3K sobre la constante de formación de los NO_2^- . En cuanto a la temperatura como se menciona anteriormente, se mantuvo estable en intervalos adecuados para el desarrollo de las bacterias nitrificantes (Holt, 1999) al igual que el O.D. (Beccari, 1992), por lo tanto los efectos directos de estos factores sobre transformación del NO_2^- para las condiciones establecidas en SEHA durante el presente estudio no son significativas. En cuanto a las UFC como se menciona anteriormente, el efecto los valores encontrados resultan ser no significativo, debido muy probablemente a que los valores experimentales obtenidos por técnicas tradicionales como las UFC subestiman hasta en un 99% la densidad poblacional relativa de bacterias que se encuentran en los sistemas (Truu, 2009). El efecto directo de la constante de degradación del NH_4^+ no fue significativo para la dinámica de formación del NO_2^- según los resultados obtenidos por el modelo. Sin embargo, si bien es cierto que los nitritos son el producto de la oxidación del NH_4^+ (Atlas, 2001), los valores registrados de la concentración de NO_2^- durante la fase de estabilización fueron muy pequeños (Figura 70), debido a que la

constante de transformación de NO_2^- a NO_3^- fue mayor a la constante formación del NO_2^- . Por lo tanto la respuesta del predictor resulta no significativa. Sin embargo como se mencionó en el modelo para la degradación del NH_4^+ existe una fuerte correlación entre estos dos parámetros, la cual se hace evidente cuando se analizaron las dinámicas de la nitrificación de forma aislada durante la experimentación previa, puesto que durante los experimentos sólo se favoreció la fase de nitrificación por medio del inóculo de bacterias nitrificantes en los tratamientos NH4M y NH4G, los cuales mostraron un r de correlación de -0.86 y -0.97 respectivamente para estos predictores (Tabla 21), lo cual indica que mientras desciende la concentración de NH_4^+ , aumenta la concentración del NO_2^- . El mismo caso sucede con el efecto directo del pH para este modelo, el cual no fue significativo para la constante de formación del NO_2^- . Sin embargo, la r de correlación para nitritos y pH en los tratamientos NH4M y NH4G fue de -0.79 y -0.83 respectivamente (Tabla 20), poniendo en evidencia que mientras el NH_4^+ y el pH disminuyen, la concentración de NO_2^- aumenta, mostrando coincidencias con lo reportado por Zhou (2011). De tal manera que las bajas concentraciones de NO_2^- registradas en los SEHA enmascaran la correlación dentro del análisis del modelo NO2GLM. Es importante hacer notar que los modelos planteados por cada proceso de la nitrificación abordan sólo la parte que se plantea y pretende estudiar. El conjunto de estos modelos, conforman el modelo general de la nitrificación, por lo cual para su análisis es necesario entenderlo desde esta perspectiva, puesto que muchos de los procesos se realizan de forma simultánea en los SEHA y no de forma aislada como se plantean en este tipo de modelos, por lo que el modelo general de la nitrificación (Ecuación 17) tiene una mejor representación del fenómeno.

En base a los resultados obtenidos en la Tabla 27, fue planteado el modelo de efectos directos para la formación de NO_2^- (Ecuación 11) presentando este modelo una $r^2=66.51$ para este modelo. Partiendo de este modelo se postuló el modelo máximo con interacciones para las dinámicas de nitritos, las interacciones probadas en modelo máximo así como su valor de significancia al 95 % se muestran en la Tabla 28 con lo cual se obtuvo el modelo lineal generalizado mínimo para la degradación de los nitritos (Ecuación 12).

Ecuación 11. Modelo mínimo lineal generalizado de efectos directos para la degradación del NO₂⁻

NO2GLM: (glm(formula = **NO2K** ~ **NO3K** , family = gaussian)

Donde:

- Nombre del modelo
- Variable de respuesta
- Efectos directos

Tabla 28. Pruebas de interacciones en el modelo para las dinámicas de los nitritos

Interacciones	Valor de "F"	Significancia
NO3K:PHK	0.9362	x
NO3K:OD	0.0510	x
NO3K:UFC	0.6264	x
PHK:TEMP	0.1125	x
PHK:NH4K	0.9909	x
PHK:NO3K	0.9302	x
NH4K:NO2K	0.00036	✓
PH:UFC	0.4009	x
PH:OD	0.3681	x
OD:UFC	0	x
UFC:NO2K	0.0280	✓
x No significativo al 95 % ✓ Significativo al 95 % n=144		

Los resultados obtenidos del análisis de interacciones (Tabla 28) muestran que estrictamente al I.C. del 0.95 sólo son significativas el efecto de las interacciones **NH4K:NO2K** y **UFC:NO2K** sobre la constante de degradación de los nitritos. Esta prueba pone nuevamente en evidencia la fuerte influencia entre la degradación del NH₄⁺ y la producción del NO₂⁻, mientras que la interacción con UFC en sí muestra significativa a diferencia del efecto directo. La interacción **NO3K:OD** se encuentra en el límite de decisión para ser aceptada como significativa y con el fin de obtener una mayor representatividad en el modelo, fueron conservadas estas tres interacciones, presentando una r²= 99.94, por lo tanto la influencia de los efectos directos e

interacciones sobre la variable de respuesta describen el 99 % de los datos analizados por este modelo. Una vez analizados los efectos directos así como las interacciones, el modelo lineal generalizado mínimo para la transformación de los nitritos queda conformado de la siguiente forma:

Ecuación 12. Modelo lineal generalizado mínimo para la transformación de los NO_3^-

NO2GLM:(glm(formula = **NO2~ NO3K + NH4K:NO2K + NO3K:OD + UFC:NO2K**, family = gaussian)

Donde:

- Variable de respuesta
- Efectos directos
- Interacciones

5.4.3 Modelo Lineal Generalizado para las dinámicas de los nitratos

A partir de los modelos generales para la degradación tanto de amonio como de nitritos, se generó el modelo máximo para probar los efectos directos sobre las dinámicas del los nitratos el cual se estructuró de la siguiente forma:

Ecuación 13. Modelo lineal generalizado máximo para la degradación del NO_3^-

NO3GLM:(glm(formula = **NO3~ NH4K + NO2K + PHK + OD + REDOX + DQO + TEMP**, family = gaussian)

Donde:

- Nombre del modelo
- Variable de respuesta
- Efectos directos

Los resultados de este modelo (Ecuación 13) mostraron una $r^2 = 93.69$, por lo tanto la influencia de los efectos directos así como las interacciones sobre la variable de respuesta describen el 93.69 % de los datos analizados por este modelo. El análisis por medio de pruebas de ANOVA sobre cada efecto directo se muestra en la Tabla 29.

Tabla 29. Pruebas de efectos directos en el modelo para las dinámicas de los nitratos

Variables	Valor de "F"	Significancia
NH4K	0.7009	*
NO2K	0	*
PHK	0.0174	✓
OD	0.0064	✓
REDOX	0	*
DQO	0	*
TEMP	0.7476	*
*No significativo al 95 %		
✓Significativo al 95 %		
n=144		

Las pruebas de los efectos directos sobre la variable de respuesta (Tabla 29), muestran que sólo son significativos los efectos directos del PHK y el OD sobre la constante de transformación de los nitratos, debido a que las bacterias heterótrofas encargadas de realizar degradación de los nitritos (desnitrificación) como es el caso de *Alcaligenes* sp. (Kadleck, 2009), se desarrollan en un pH de 7 a 7.5 y en condiciones aerobias, por lo tanto el descenso en estos parámetros influye significativamente en la transformación de los NO_3^- (Crites, 2005) y por consecuencia en la dinámica del aumento o disminución de las concentraciones de esta molécula en los SEHA, como fue el caso del O.D. cual durante el TRH de 7 h llegó a descender hasta 2 mg/L en promedio pero nunca descendió por debajo de los 3.8 mg/L en promedio. Para el caso del NH_4^+ y los NO_2^- , no se encontró influencia significativa sobre la constante de transformación de los NO_3^- , sin embargo las dinámicas de estos compuestos están asociadas al descenso del pH, de tal manera que existe una asociación indirecta sobre esta variable de respuesta. En cuanto a la temperatura como se mencionó anteriormente, se

mantuvo estable para el desarrollo de las bacterias oxidadoras de amonio (Holt, 1999), por lo tanto la temperatura, en el presente estudio no influyo de forma significativa en la dinámicas de transformación de los NO_3^- . En cuanto a los valores relativos a la D.Q.O. y potencial redox, no se encontró una influencia significativa como efecto directo sobre la dinámica de transformación de los NO_3^- , para el caso de ambos predictores el valor de significancia 0 denota una muy baja relación o nula en la interfase del software S-plus (Crawley, 2003). Una vez analizados los efectos directos así como las interacciones, el modelo lineal generalizado mínimo para la transformación de los nitratos queda conformado como se muestra en la Ecuación 14, obteniendo una $r^2 = 15.09$ para el modelo de transformación del nitratos.

Ecuación 14. Modelo lineal generalizado mínimo de efectos directos para la degradación del NO_3^-

NO3GLM:(glm(formula = **NO3K** ~ **PHK** + **OD** , family = gaussian)

Donde:

- Nombre del modelo
- Variable de respuesta
- Efectos directos

A partir de este modelo se postuló el modelo máximo con interacciones para las dinámicas de los nitratos, las interacciones probadas en modelo máximo así como su valor de significancia al 95 % se muestran en la Tabla 30.

Tabla 30. Pruebas de interacciones en el modelo para las dinámicas de los nitratos

Interacciones	Valor de "F"	Significancia
NO3K:DQO:REDOX	0.8631	✗
NO3K:DQO	0.6754	✗
PHK:DQO	0.0063	✓
PHK:OD	0	✗
DQO:REDOX	0.6702	✗
OD:PHK	0.2969	✗
✗ No significativo al 95 % ✓ Significativo al 95 % n=144		

Los resultados muestran que a un I.C. del 0.95 sólo es significativo el efecto de la interacciones **PHK:DQO** sobre la constante de degradación de los nitratos, esto es debido a que en la medida que el pH disminuye la materia orgánica disuelta medida como D.Q.O. aumenta, probablemente como resultado de la muerte celular (Crites, 2005). Una vez analizados los efectos directos así como las interacciones, el modelo mínimo para transformación de los NO_3^- queda conformado de la siguiente forma:

Ecuación 15. Modelo lineal generalizado mínimo para la transformación de los NO_3^-

NO3GLM:(glm(formula = **NO3~ PHK + OD + PHK:DQO**, family = gaussian)

Donde:

- Variable de respuesta
- Efectos directos
- Interacciones

Los resultados de este modelo mostraron un $r^2 = 92.36$, por lo tanto la influencia de los efectos directos e interacciones sobre la variable de respuesta describen el 92 % de los datos analizados por este modelo.

Con base en los resultados obtenidos fue posible establecer que predictores e interacciones modifican de forma significativa el proceso de nitrificación por cada etapa como se muestra a en la ecuación:

Ecuación 16. Modelos lineales generalizados mínimos por etapa de la nitrificación

NH4GLM:(glm(formula = **NH4K** ~ **NO2K** + **PHK** , family = gaussian)

NO2GLM:(glm(formula = **NO2**~ **NO3K** + **NH4K:NO2K** + **NO3K:OD** + **UFC:NO2K**, family = gaussian)

NO3GLM:(glm(formula = **NO3**~ **PHK** + **OD** + **PHK:DQO** , family = gaussian)

Donde:

- Variable de respuesta
- Efectos directos
- Interacciones

Estas relaciones se describen gráficamente por medio de un diagrama de causa efecto en la Fig.78, donde se puede apreciar las causas principales efectos directos e interacciones que inciden significativamente en el proceso de nitrificación.

El análisis pone en evidencia que el pH influye de forma significativa durante todo el proceso de nitrificación, la concentración de nitritos está en función de la degradación de amonio y del aumento o disminución de la biomasa, sin embargo la degradación del amonio también está en función de la concentración de nitritos pues a elevadas concentraciones se observó que fue inhibitoria. Los nitratos tienen una dependencia directa tanto del pH como del oxígeno disuelto, aunada a la materia orgánica disuelta medida como D.Q.O. pues en este experimento fue empleada como indicador de fuentes de carbono las cuales son necesarias para los microorganismos nitratantes que a su vez realiza la nitratación.

El GLM obtenido para el proceso de nitrificación queda estructurado de la siguiente forma:

Ecuación 17. Modelo mínimo lineal generalizado para la nitrificación

Nitrificación~glm (NH4GLM +NO2GLM +NO3GLM)

Con base en los resultados estadísticos obtenidos se utilizaron los predictores e interacciones que se muestran en la Tabla 31 para alimentar en modelo de simulación en el software Stella.

Tabla 31. Predictores empleados para el modelo de simulación del proceso de nitrificación en sistemas experimentales que simulan HA

Variables	Descripción
NO2K	Constante de formación de los nitritos a 7 días
NO3K	Constante de formación de los nitratos a 7 días
PHK	Constante de disminución del pH a 7 días
PHK:DQO	Interacción entre el pH y D.Q.O.
NH4K:NO2K	Interacción entre la constante de degradación de amonio y constante de formación de los nitritos
NO3K:OD	Interacción entre la constante de formación de nitratos y las dinámicas concentración de O.D.
UFC:NO2K	Interacción entre la constante de formación de nitratos y las dinámicas concentración de O.D.
● Efectos directos ● Interacciones n=56	

5.5 Resultados sobre el modelo de simulación del proceso de nitrificación

Los resultados del modelo estadístico permitieron conocer y establecer los efectos directos e interacciones que influyen de forma significativa en el proceso de nitrificación facilitando el planteamiento de las interacciones y dinámicas que se establecieron para el modelo de simulación del proceso de nitrificación en sistemas que simulan humedales artificiales. En este sentido y realizando los ajustes correspondientes al modelo conceptual inicial (Fig. 40) fue planteado el modelo de simulación cuantitativo (Fig. 83), en el cual se eliminó la influencia del componente vegetal al no encontrar diferencias significativas en el análisis estadístico realizado anteriormente.

Los resultados obtenidos a partir del modelo cuantitativo de simulación sobre el proceso de nitrificación fueron analizados por medio de un comparativo sobre las dinámicas de los diferentes parámetros en el modelo contra los resultados observados en los SEHA. La Fig. 79 muestra las dinámicas del amonio y del pH predichas y observadas para los tratamientos SEHAm y SEHAp, donde se puede apreciar que las dinámicas de degradación del amonio son seguidas por la del pH, reflejando la relación que se pudo observar en análisis y modelación estadística. En cuanto a los nitritos (Fig. 80) las dinámicas predichas se ajustan a las observadas en los SEHA no obstante de los valores que se presentan durante los primeros 7 días, los cuales son demasiado pequeños y no afectan las tendencias sobre las dinámicas de los nitritos. Las dinámicas sobre la concentración de O.D. (Fig. 80), muestra un comportamiento similar entre los valores predichos y observadas para los tratamientos SEHAm y SEHAp. El modelo también refleja el aumento en las concentraciones de O.D. y la relación existente entre el aumento en la concentración de la materia orgánica disuelta medida como D.Q.O. (Fig. 81) y la muerte celular por parte de los organismos heterótrofos desnitrificantes que se postuló con anterioridad.

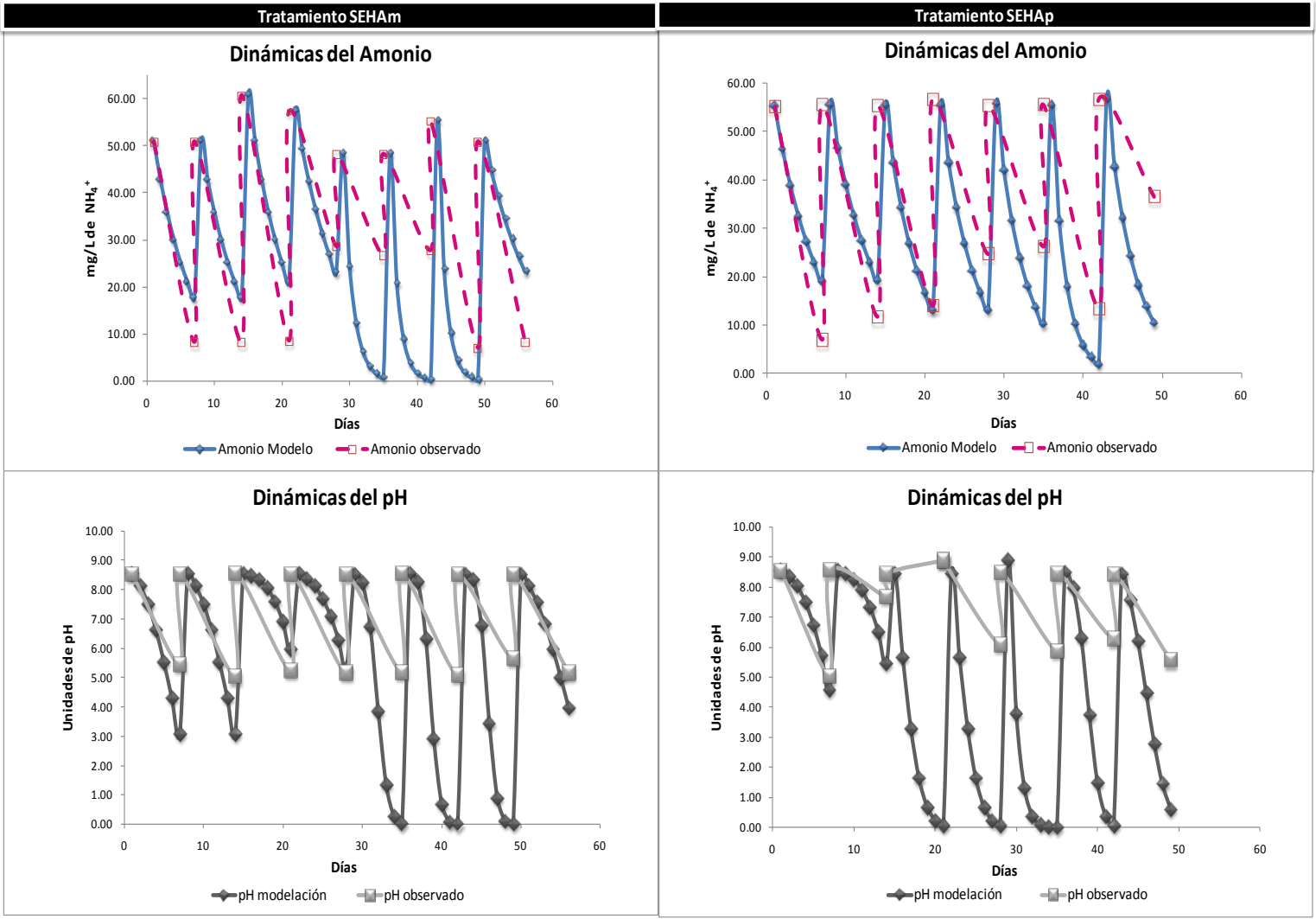


Figura 79. Dinámicas del Amonio y pH obtenidas a partir del modelo de nitrificación comparadas con las dinámicas observadas en los tratamientos experimentales realizados en los SEHA

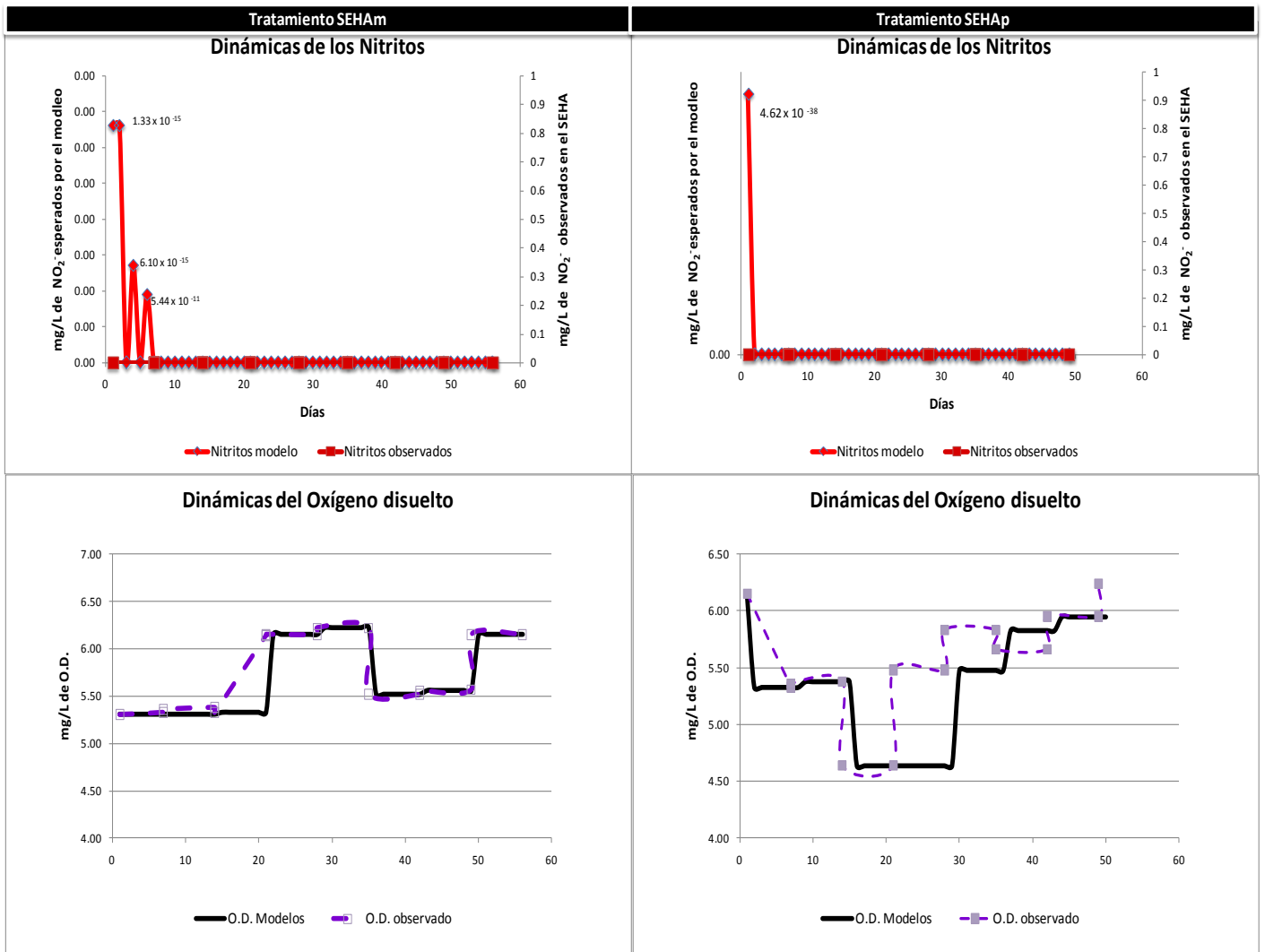


Figura 80. Dinámicas de los Nitritos y O.D. obtenidas a partir del modelo de nitrificación con las dinámicas observadas en los tratamientos experimentales realizados en los SEHA

Para el caso de los nitratos (Fig. 81), las dinámicas predichas difieren de las observadas sustancialmente, esto es debido a que la degradación de nitratos es realizada por bacterias heterótrofas y oligótrofas desnitrificantes aerobias (Cho, 2002, Kadlec, 2009) cuyas dinámicas poblacionales no fueron determinadas de forma experimental dentro de los SEHA, pues no se encontraban dentro de los alcances del presente trabajo, sin embargo las diferencias en cuanto a la concentración del total de nitratos transformados por estos organismos es muy baja en comparación con el total de nitritos transformados, ya que al estimar las concentraciones totales, la diferencia es de 0.20 mg/L de nitritos degradados en promedio. Los resultados de las dinámicas de la materia orgánica disuelta medida como D.Q.O. fortalecen el postulado, pues dentro de los periodos donde se encuentran los valores más altos de materia orgánica disuelta medida como D.Q.O. se observa un incremento de nitratos en los datos observados debidos probablemente a muerte celular de dichos organismos. Crites (2005) menciona que las fuentes de carbono son consumidas durante la desnitrificación aerobia y establece que estas fuentes de carbono pueden ser aportadas por tejidos celulares o células muertas. Por lo tanto al no suministrar otra fuente de carbono a los SEHA, es muy probable que la materia carbonosa haya provenido de células muertas de bacterias heterótrofas desnitrificantes y como consecuencia la tasa de transformación de los NO_3^- haya disminuido, dando como resultado un incremento en la concentración de este compuesto al no poder ser metabolizado por otros microorganismos.

Los estimados para el crecimiento bacteriano de bacterias nitrificantes fortalecen esta hipótesis, ya que en primer lugar no se ven afectadas las dinámicas de degradación de amonio, así como las dinámicas de transformación de nitritos a nitratos y en segundo lugar, los estimados de la población bacteriana nitrificante realizados a través del modelo de simulación no se ven afectadas según las predicciones del modelo, por lo cual la variación entre las dinámicas de las concentraciones de nitratos y la materia orgánica disuelta medida como D.Q.O. entre el modelo y los dinámicas observadas, son atribuibles a la muerte celular y el decaimiento de bacterias heterótrofas y su capacidad de transformar los nitratos en los SEHA.

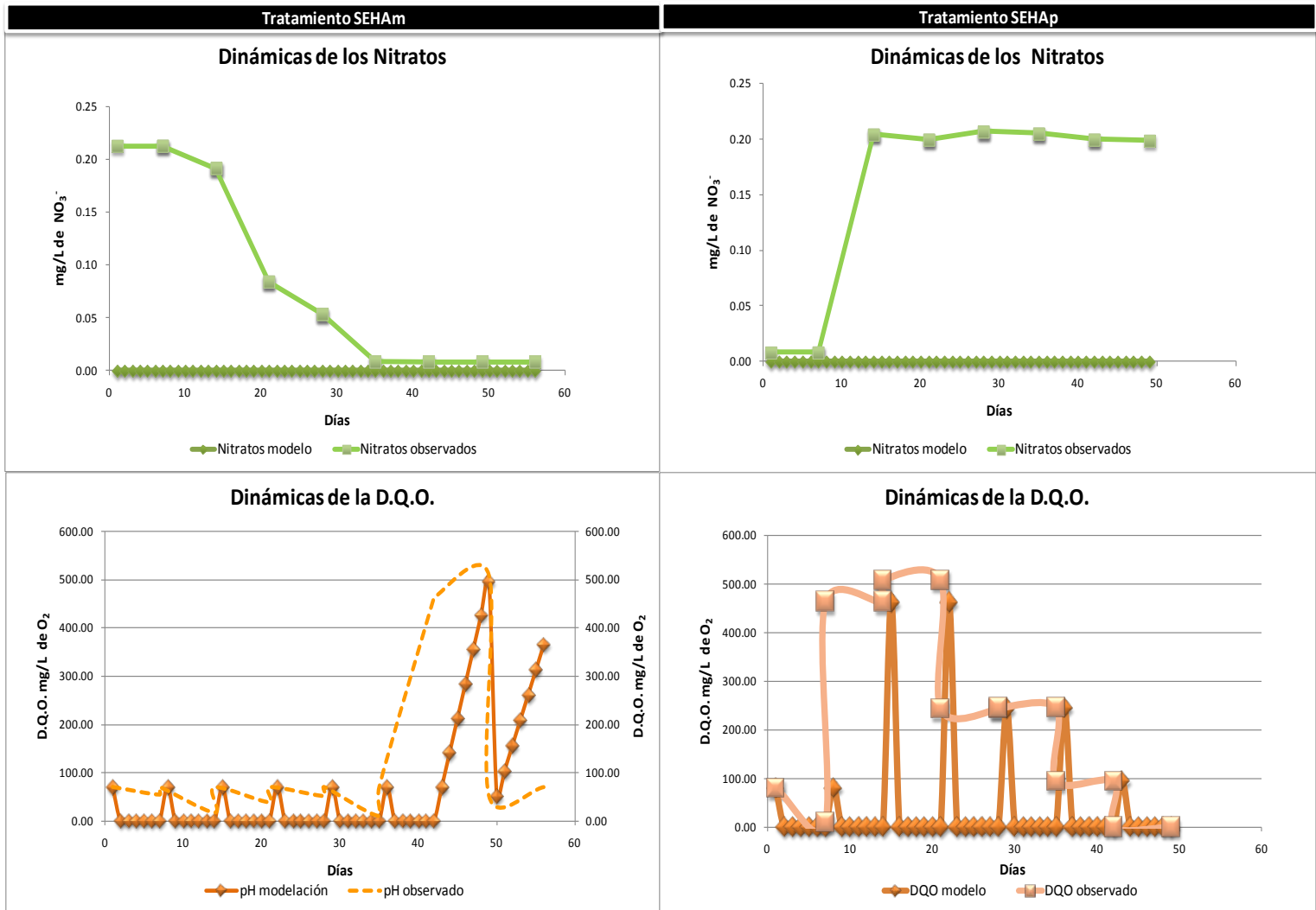


Figura 81. Dinámicas de los nitratos y D.Q.O. obtenidas a partir del modelo de nitrificación comparadas con las dinámicas observadas en los tratamientos experimentales realizados en los SEHA

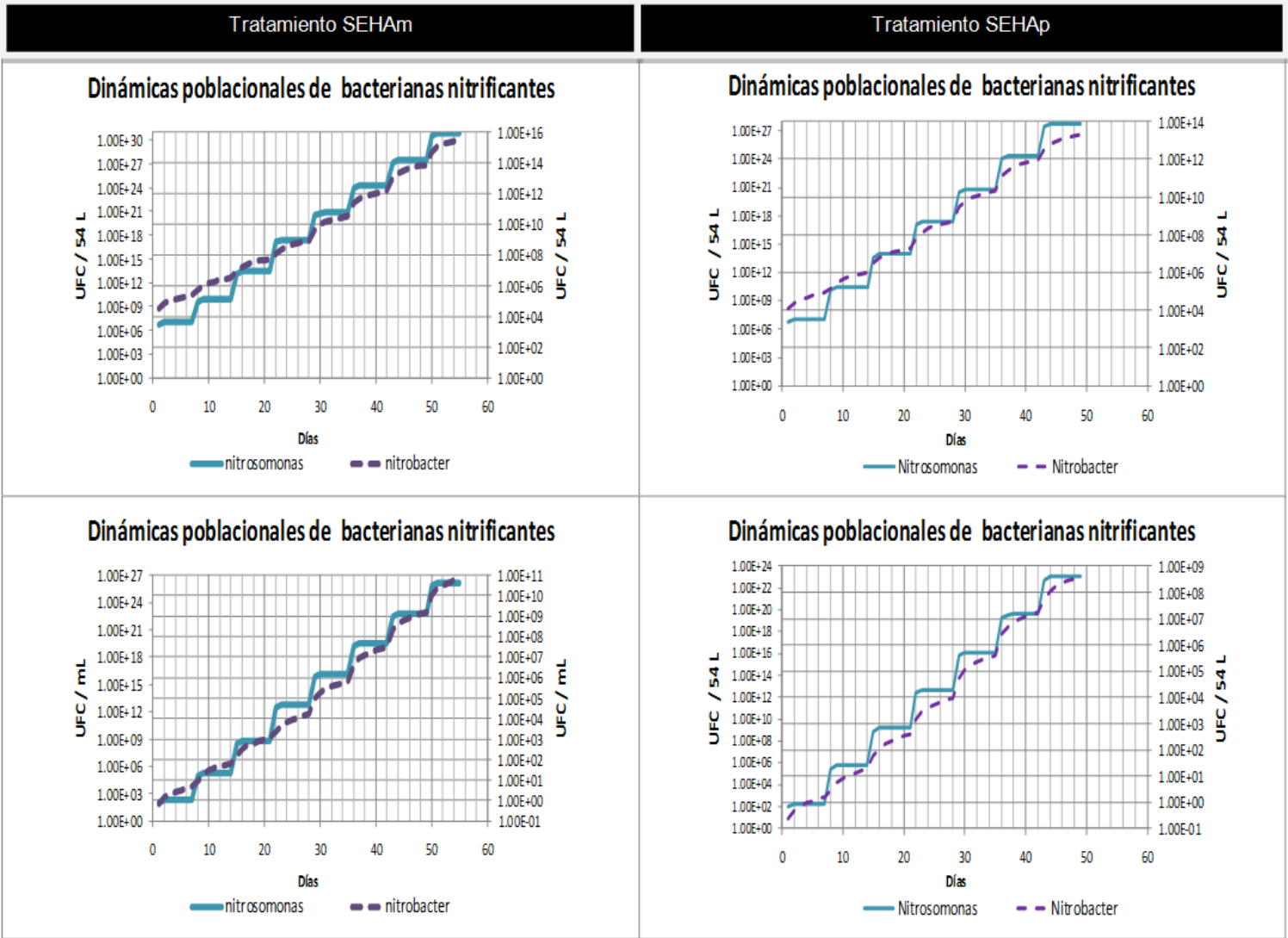


Figura 82. Dinámicas del crecimiento poblacional de bacterias nitrificantes estimadas por medio del modelo de nitrificación para los diferentes tratamientos en los SEHA

5.5.1 Validación del modelo de simulación

Los resultados obtenidos del modelo fueron comparados con los observados en los SEHA por medio de ANOVAs obteniendo los siguientes resultados.

Tabla 32. Pruebas de ANOVAs para el tratamiento SEHAM de datos observados contra obtenidos en el modelo

Prueba	Valor de "F"	Significancia
Amonio observado x Amonio modelo	0.31	✗
Nitritos observados x Nitritos modelo	0.99	✗
Nitratos observados x Nitratos modelo	8.77×10^{-7}	✓
pH observado x pH modelo	0.21	✗
O.D. observado x O.D. modelo	0.67	✗
D.Q.O observado x D.Q.O. modelo	0.028	✓
✗No significativo al 95 % ✓Significativo al 95 % n=56		

Tabla 33. Pruebas de ANOVAs para el tratamiento SEHAp de datos observados contra obtenidos en el modelo

Prueba	Valor de "F"	Significancia
Amonio observado x Amonio modelo	0.18	✗
Nitritos observados x Nitritos modelo	0.99	✗
Nitratos observados x Nitratos modelo	9.02×10^{-8}	✓
pH observado x pH modelo	0.10	✗
O.D. observado x O.D. modelo	0.26	✗
D.Q.O observado x D.Q.O. modelo	0.076	✗
✗No significativo al 95 % ✓Significativo al 95 % n=56		

Las pruebas de ANOVA para el modelo que simula el proceso de nitrificación para el tratamiento SEHAm muestran que la modelación se ajusta al proceso de nitrificación de los datos observados y sólo existe diferencia significativa para los valores predichos sobre las dinámicas de los nitratos (Tabla 32). Mientras que para el tratamiento SEHAp existen diferencias entre las dinámicas de los nitratos y la materia orgánica disuelta medida como D.Q.O. (Tabla 33), confirmando que las dinámicas para dichos predictores están en función del componente bacteriano heterótrofo. Para el caso de la modelación en el sistema SEHAp sólo existió diferencia significativa para la dinámica de los nitritos, por tal motivo el modelo cuantitativo para el proceso de nitrificación (Fig. 83) en sistemas que simulan humedales artificiales fue validado con las reservas sobre la desnitrificación y las dinámicas poblacionales de bacterias heterótrofas antes mencionadas.

En términos generales el modelo cumple con las expectativas planteadas, reflejando en gran medida las dinámicas e interacciones de los diferentes parámetros evaluados dentro del proceso de nitrificación. Una aportación importante del modelo es que permite estimar el crecimiento poblacional bacteriano nitrificante con base en el número de organismos generados en función del sustrato empleado, facilitando la estimación de las dinámicas bacterianas, proporcionando una aproximación de dichas comunidades en los sistemas de HA, por lo tanto el modelo es capaz de predecir de forma significativa el proceso de nitrificación.

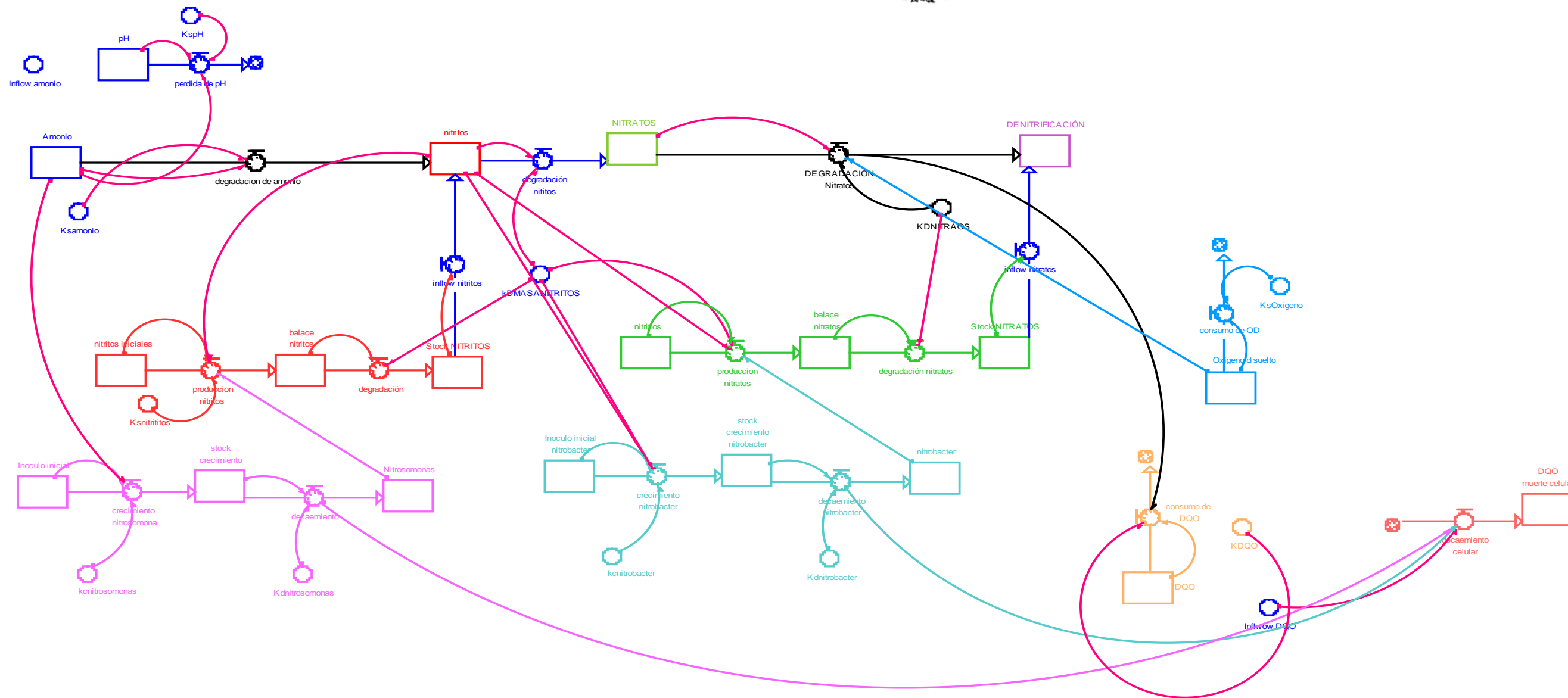


Figura 83. Diagrama del modelo cuantitativo de nitrificación en sistemas que simulan HA en la interfase del software Stella

5.5.2 Comparación entre el modelo para nitrificación propuesto y modelos existentes

La comparación de modelo propuesto con algunos existentes en la bibliografía se ilustra en la Tabla 34, donde se puede observar que los modelos empíricos en los cuales es empleado sólo el balance de masa con ecuaciones de diseño, las correlaciones entre las variables de respuesta y los parámetros evaluados no superan una $r^2=0.60$, mientras que los modelos realizados por medio de análisis multivariado, como el caso de modelo propuesto por Tunçsiper (2006), el cual analiza como variable de respuesta el NH_3^- por medio de análisis multifactorial obtiene una correlación de 0.90. El análisis multifactorial permite conocer qué factores inciden con mayor significancia sobre la variable de respuesta y de este modo evaluar como inciden las interacciones y efectos directos sobre el proceso a estudiar, sin embargo no permiten realizar simulaciones sobre dichos procesos puesto que, de cierta manera son rígidos al proceso para el que fueron desarrollados. Los análisis por medio de redes neuronales permiten establecer modelos con una buena correlación como es el modelo propuesto por Akrotos (2009), el cual presentó una $r^2= 0.53$ esta correlación es baja en comparación a las obtenidas en modelo multivariados debido a que los modelos de red neuronal permiten proyectar las interacciones entre los parámetros estudiados, sin embargo no permiten evaluar de forma estadísticamente cuantitativa que factores inciden con mayor significancia sobre la variable de respuesta. Por tal motivo las correlaciones encontradas para estos modelos son bajas. Los modelos que combinan el análisis multifactorial y los modelos de red neuronal son los que presentan correlaciones altas y por lo tanto una mejor representatividad de los fenómenos, ya que permiten medir de forma cuantitativa los factores inciden con mayor significancia sobre la variable de respuesta y proyectar los resultados para realizar simulaciones, tal es el caso de Ouyang (2010), el cual reporto $r^2=0.90$ para la degradación del NT, NH_4^+ y NO_3^- , mostrando coincidencias con el modelo propuesto en la presente investigación el cual presentó $r^2=0.91$. Otra ventaja de este tipo de modelos es que son modulares, es decir se pueden complementar entre otros modelos realizados para diferentes tipos de contaminantes como son el C y PO_4 o cualquier otro parámetro que sea modelado

por medio de este tipo de estructura, incrementado así los alcances de la modelación y simulación con el fin de entender de forma más integral los procesos transformación que se realizan en los HA.

Tabla 34. Modelos de nitrificación en HA

Autor	Variables	Tipo de modelo		Correlación (r^2)
Liu <i>et al.</i> , 2005	N-org	Balance de masa con reacción cinética de primer orden para reactores agitados en serie		0.53
	NH ₃ ⁻			0.30
	NO ₃ ⁻			0.31
Mayo y Bigambo, 2005	N-org NH ₃ ⁻ NO ₃ ⁻ N-sustrato N-componente vegetal	Balance de masas para reactor de flujo pistón		0.61
McGehan <i>et al.</i> , 2005	N-org NH ₃ ⁻ NO ₂ ⁻ NO ₃ ⁻	Balance de masa para reactor de flujo pistón con reacción de primer orden		N.D.
Tunçsiper <i>et al.</i> , 2006	N-org	Modelo de regresión multivariable cinética de primer orden		0.67
	NH ₃ ⁻			0.73
	NO ₃ ⁻			0.84
Chan <i>et al.</i> , 2008	NH ₃ ⁻	Modelo de regresión multivariable Cinética de primer orden, Balance de masa para reactor por lotes		0.74
				0.79
Akratos <i>et al.</i> , 2009	NT	Red neuronal artificial		0.53
	NT	Ecuación de diseño		0.69
	NH ₃ ⁻	Ecuación de diseño		0.47
Wang <i>et al.</i> , 2009	N-org NH ₃ ⁻ NO ₃ ⁻ N-sustrato vegetal	Sistema no lineal de cuatro ecuaciones		N.D. N.D. N.D. N.D.
Sklarz <i>et al.</i> , 2010	N-org	Balance de masa para reactor completamente agitado		0.50
	NH ₃ ⁻			N.D.
	NO ₃ ⁻			0.59
	S.S.T. DBO ₅ l			0.45 0.38
Ouyang <i>et al.</i> , 2010	NT NH ₄ ⁺ NO ₃ ⁻	Red artificia neuronal con ecuaciones de primer orden		0.90
ModeloPropuesto2011	NH ₄ ⁺	Modelo lineal generalizado multivariado	Oxidación deNH ₄ ⁺ Transformación de NO ₂ ⁻ Transformación de NO ₃ ⁻	0.84
	NO ₂ ⁻			0.99
	NO ₃ ⁻			0.92
	pH O.D. Temperatura D.Q.O. UFC	Red artificia neuronal con ecuaciones de primer orden		0.91

5.6 Integración

Los resultados obtenidos en la presente investigación permitieron analizar el proceso de la nitrificación en sistemas de humedales artificiales en sus tres componentes fundamentales, material de empaque, microorganismos y componente vegetal.

El material de empaque seleccionado para los sistemas permitió el desarrollo de los organismos nitrificantes, ya que al estar compuesto en 80 % SiO_2 es apropiado para el desarrollo y establecimiento de los organismos nitrificantes, pues no contiene metales tales como Zn (II), Pb (II), Cd (II) y Cu (II), cuya concentración mayor o igual a 0.5 mg/L en los influentes de sistemas de tipo HA, afectan el proceso de oxidación del amonio en bacterias Nitritantes (Lim, 2002). Las bajas concentraciones de N y P que presento el material de empaque, permiten emplearlo sin riesgo de que este aporte concentraciones significativas de estos compuestos al efluente del sistema, permitiendo así el impacto negativo vía eutrofización en los cuerpos acuíferos receptores y el subsecuente decremento en la biodiversidad y la calidad del agua (Ramírez, 2003). El pH del material se mantiene muy cercano al valor neutro, permite el adecuado establecimiento de las bacterias nitrificantes (pH entre 7 y 8.5, Crites, 2005). La dureza del material le confiere ventajas sobre otros materiales de empaque pues evita el desmoronamiento o compactación que se observa en la grava de origen ígneo como el basalto o tezontle, lo que impide con ello la presencia permanente de cortos circuitos hidráulicos. El tamaño de partícula seleccionada permitió obtener una mayor superficie para el establecimiento de los organismos en relación con el área disponible que proporcionan los sistemas aeróbicos de tratamiento convencional. En cuanto al componente vegetal evaluado, resultó no tener una influencia significativa en el aporte de O.D. en el proceso de nitrificación. Sin embargo, se registro algún tipo de influencia del componente vegetal sobre la degradación de los NO_3^- , debido a que disminuyo la tasa de degradación de este compuesto debido posiblemente a causa del efecto inhibitorio de las plantas sobre la comunidad de bacterias desnitrificantes aerobias. Lo anterior a su vez se reflejo en el aumento de la materia orgánica disuelta y una acumulación de NO_3^- en los SEHA.

El análisis del componente microbiano permitió aislar e identificar a *Nitrosomonas europaea* como una de las principales bacterias responsables de la transformación del amonio en los SEHA. Así mismo se observó que el tiempo de desarrollo de los organismos nitrificantes es muy lento en comparación con el de las bacterias como las heterótrofas, ya que se registró una tasa de 2.54 generaciones por día. Esto explica la lentitud para lograr la estabilización de sistemas de tratamiento biológico para la depuración de nitrógeno, el cual puede tardar hasta seis meses (Crites, 2005). El estudio de las comunidades bacterianas permitió conocer las dinámicas poblacionales y su influencia en las cinéticas de degradación y transformación de los compuestos nitrogenados que intervienen en la nitrificación.

Los resultados analíticos obtenidos durante la experimentación previa y en los SEHA, fueron evaluados por medio de análisis estadístico empleando los GLM para determinar los efectos directos e interacciones que intervienen significativamente en el proceso de nitrificación. Este análisis permitió establecer la fuerte relación que existe entre la degradación del amonio con el descenso del pH, esto como consecuencia de la generación de ácido nítrico procedente de la transformación del amonio a nitritos por las bacterias nitrificantes. El modelo estadístico estableció que la producción de nitritos es inversamente proporcional con la degradación de amonio y es modificada directamente por la cantidad de microorganismos nitrificantes, los cuales a su vez se ven fuertemente influenciados en sus dinámicas poblacionales por la relación de las concentraciones amonio-nitritos y el oxígeno disuelto en el sistema. Por otra parte el modelo señala que las dinámicas del pH y el oxígeno disuelto afectan significativamente las dinámicas de nitrificación debido al impacto que tienen estos parámetros sobre las poblaciones de bacterias heterótrofas aerobias nitrificantes.

Las dinámicas observadas en el modelo estadístico fueron empleadas para realizar el modelo de simulación para el proceso de nitrificación el cual describió de una forma muy congruente las dinámicas observadas durante la experimentación con una correlación del 95 % para las dinámicas del amonio, nitritos, O.D. y pH. El modelo de simulación permitió predecir adecuadamente las dinámicas de la nitrificación dentro de los SEHA y mostró que la densidad poblacional de bacterias nitrificantes, necesaria

para degradar las concentraciones de nitrógeno encontradas en los sistemas de HA, es mucho mayor a lo reportado por autores como Kern (2003) y Bahgat (1999) (Tabla 4). Los cuales estiman una población de 2.4×10^4 bacterias nitrificantes por mL, mientras que para el presente trabajo de investigación se encontró que al menos se necesita 1×10^{19} UFC por mL para lograr las constantes de degradación del NH_4^+ que se registraron en los SEHA. El modelo permitió confirmar los planteamientos del modelo estadístico al reproducir las dinámicas observadas en los SEHA, por tal motivo el modelo puede ser empleado para describir las dinámicas de la nitrificación en sistemas de humedales artificiales así como las dinámicas poblacionales de las bacterias quimiolitótrofas encargadas de transformar el amonio a nitratos.

Los resultados de la presente investigación aportan datos para ser considerados en el diseño y operación de sistemas de tipo HA, con fin de obtener una reducción del aporte de N y C de aguas residuales de tipo doméstico a los cuerpos de agua, de tal manera que se reduzca el riesgo de eutrofización. Tal es el caso del pH, el cual puede ser estabilizado por medio de un material de empaque de piedra caliza compuesta por de 60 % de CaCO_3 , el cual además de servir como amortiguador del pH en valores cercanos a la neutralidad, es capaz de adsorber PO_3 hasta en un 60% (Ramírez, 2003). En cuanto al O.D. es recomendable mantener valores superiores a 4 mg/L, debido a que a esta concentración permite el desarrollo de los organismos nitrificantes y permite obtener porcentajes de remoción de hasta 90 % en aguas residuales con concentraciones de 60 mg/L de NH_4^+ , manteniendo constante la tasa de nitrificación en los sistemas de tipo HA. La temperatura es un factor importante en el desarrollo de los microorganismos depuradores en los HA (Kadleck, 2009). Sin embargo, en regiones donde la temperatura del agua no desciende por debajo de 15°C el proceso de nitrificación no se ve afectado (Tanner (2002), Schmidt (2003), Vimazal (2009)).

El uso de modelos de análisis multivariado, permite mejorar el planteamiento de modelos predictivos o de simulación, ya que facilita el planteamiento de efectos y variables que modifican de forma estadísticamente significativa la variable o variables de respuesta a analizar, permitiendo una mayor integración y comprensión de este tipo de modelos.

Capítulo 6

Conclusiones y recomendaciones

6 CONCLUSIONES

- La construcción y diseño de los sistemas experimentales a escala laboratorio que simulan a un humedal artificial fue el adecuado y permitió el análisis bajo condiciones controladas del proceso de la nitrificación.
- El material de empaque gravilla de SiO₂ con diámetro entre 1 y 2 mm presentó características que permitieron el establecimiento y el desarrollo de las bacterias nitrificantes capaces de llevar a cabo la nitrificación.
- Las pruebas bioquímicas realizadas permitieron la identificación a nivel género de las bacterias *Flavobacterium*, *Aeromonas schubertii*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Alcaligenes*, *Moraxella*, *Agrobacterium* dentro de los SEHA.
- Las pruebas genéticas de PCR y electroforesis permitieron realizar la identificación a nivel especie de la bacteria oxidadora de amonio *Nitrosomonas europaea* en el inóculo empleado en los SEHA, aislado a partir de la muestra ambiental
- El balance de masa indica que 80 % de la degradación del amonio es realizada por la actividad metabólica de bacterias oxidadoras de amonio, el 15 % se volatiliza y el 5% queda adsorbido en el material de empaque.
- El descenso del pH se encuentra fuertemente asociado a la degradación del amonio debida a la actividad microbológica.
- La presencia de nitritos en el sistema es debida a la transformación del amonio a nitritos por la comunidad de microorganismos nitritantes.
- Las concentraciones de nitritos pueden ser tóxicas para las bacterias oxidadoras de amonio cuando son mayores o iguales los 4 mg/L con base en el

descenso del número de bacterias y en la cinética de transformación del amonio encontrado en el presente estudio.

- La transformación de nitratos está fuertemente relacionada con los valores de pH y la concentración el oxígeno disuelto y principalmente con las fuentes de carbono necesarias para el de desarrollo de los microorganismos nitratantes con una $r^2=0.95$.
- La degradación de los nitratos es debida a bacterias heterótrofas y oligótrofas desnitrificantes.
- No se encontró diferencia significativa en las concentraciones de oxígeno disuelto en los diferentes estratos de los SEHA.
- El componente vegetal no influye de forma significativa en cuanto al aporte de oxígeno en el proceso de nitrificación.
- La temperatura al mantenerse constante en promedio de 25° C no influyó significativamente en el proceso de nitrificación.
- El modelo de simulación generado es representativo del proceso de nitrificación observado en los SEHA con una correlación $r^2=0.9030$ y permite estimar las dinámicas de la nitrificación así como el crecimiento de microorganismos nitrificantes, permitiendo usar el modelo en el estudio de sistemas de depuración bilógica de tipo HA o bien en cuerpos de agua que presenten dinámicas similares a los humedales artificiales.

6.1 Proyecciones y recomendaciones

- ✓ Si bien el presente estudio aporta información relevante sobre el proceso de nitrificación es recomendable profundizar en el estudio de la comunidad de microorganismos desnitrificantes heterótrofos aerobios, puesto que existe muy poca información sobre estos microorganismos en lo referente a este proceso.
- ✓ Es conveniente revisar y estandarizar las técnicas de muestreo ambiental para la evaluación de microorganismos nitrificantes, puesto que el modelo de simulación indica que las técnicas tradicionales como UFC y NMP subestiman hasta en un 99% la cantidad de organismos que se encuentran en este tipo de sistemas, empleando pruebas moleculares y genéticas como FISH (Fluorescencia por hibridación *in situ*) y DAPI (tinción fluorescente de 4'-6-diamidino-2-phenylindol).
- ✓ El modelo diseñado en la presente investigación es de tipo modular, por lo tanto es posible adicionarle bloques o submodelos sobre la degradación de los nitratos y de otros compuestos tales como el C y P, por lo cual se recomienda realizar estudios para desarrollar modelos que permitan la integración de dichos compuestos en un modelo más completo.
- ✓ En cuanto al diseño de sistemas de depuración del tipo humedal artificial, se recomienda utilizar el material de empaque de tipo gravilla de SiO₂ como alternativa para el establecimiento de microorganismos degradadores de amonio, ya que además de alargar el tiempo de vida útil del sistema, evita la compactación del material con la consecuente generación de zonas hidráulicas muertas.
- ✓ Es recomendable el uso de materiales en secciones, ricos en carbonatos de calcio con el fin mantener un pH neutro y de esta manera fomentar el proceso de degradación del amonio.

- ✓ En cuanto al tipo de alimentación en los sistemas HA, se recomienda el uso de tipo vertical para sistemas que contengan elevadas concentraciones de nitrógeno, pues este tipo de alimentación favorece la oxigenación en los sistemas.
- ✓ Es conveniente profundizar en el impacto del componente vegetal en cuanto a la retención y asimilación de nutrientes o bien como nichos de microcosmos en los sistemas de depuración biológica.
- ✓ Se sugiere realizar investigaciones sobre especies vegetales nativas de México para su empleo en sistemas de HA con el fin de evitar el uso de especies introducidas.
- ✓ Es importante realizar estudios sobre el papel que juegan las comunidades de algas y hongos en cuanto a la degradación de contaminantes en los sistemas de tipo HA.
- ✓ Se recomienda difundir el uso de los HA como sistemas de depuración biológica, ya que son amigables con el ambiente, pues no genera productos secundarios y reduce la carga de contaminantes aumentando la calidad del agua. Pueden ser contruidos con materiales de bajo costo y hacen de esta tecnología una opción viable para comunidades rurales o sin acceso a servicios de drenaje y alcantarillado.

Bibliografía

7 BIBLIOGRAFÍA

1. Akrotos C. S., Papaspyros N. E. J. y Tsihrintzis V. A. 2009. **Total nitrogen and ammonia removal prediction in horizontal subsurface flow constructed wetlands: Use of artificial neural networks and development of a design equation.** *Bioresource Technol*100, 586–596.
2. Arheimer B. y Wittgren H. 2002. **Modelling nitrogen removal in potential wetlands at the catchment scale.** *Ecol Eng*19, 63–80.
3. Arp, D.J y. Bottomley P.J. 2006. **Nitrifiers: more than 100 years from isolation to genome sequences.** *Microbe* 1, 229-234.
4. Atlas M. Roland. 2005. **Handbook of media for environmental microbiology.** 2^{da} Edición Editorial CRC. Florida E:U.A. 673 pp.
5. Atlas R.M., Bartha R. 2001. **Ecología microbiana y microbiología ambiental.** 4^{ta} Edición Edit. Addison Wesley. España. 696 pp.
6. Bajaj M. Gallert C., Winter J. 2008. **Biodegradation of high phenol containing synthetic wastewater by an aerobic fixed bed reactor.** *Bioresource Technol* 99, 8376–8381.
7. Balows A. 1991. **Manual of clinical microbiology.** 5^a Edición. American Society for Microbiology. Washington E.U.A. 1364 pp.
8. Bayley M.L., Davison L. y Headley T.R. 2003. **Nitrogen removal from domestic effluent using subsurface flow constructed wetlands: influence of depth, hydraulic residence time and pre-nitrification.** *Water Sci Technol*48(5), 175-182.
9. Beavers P.D. y Tully I.K. 2005. **Nutrient reduction evaluation of sewage effluent treatment options for small communities.** *Water Sci Technol*55(10), 221-229.
10. Beccari M., Di Pinto A. C., Ramadori R., Tomei m. C. 1999. **Effects of dissolved oxygen and diffusion resistances on nitrification kinetics.** *Water Res* 26(8)1099-1104.
11. Białowieca A., Janczukowicz W., Randerson P. 2011. **Nitrogen removal from wastewater in vertical flow constructed wetlands.** *Ecol Eng* 37, 897–902
12. Braskerud B.C. 2002. **Factors affecting nitrogen retention in small constructed wetlands treating agricultural non-point source pollution.** *Ecol Eng*18, 351-370.

13. Brix. H. 1990. **Gas exchange through the soil-atmosphere interphase and through dead culms of *Phragmites australis* in a constructed reed bed receiving domestic sewage.** *Water Res* 24(2), 259–266
14. Brix. H., Schierup, H. y Arias, C.A. 2008. **Twenty years experience with constructed wetland systems in Denmark – what did we learn?** *Water Sci Technol* 56(3), 63–68.
15. Byström O., Andersson H. y Gren I. M. 2000. **Economic criteria for using wetlands as nitrogen sinks under uncertainty.** *Ecol Econ* 35, 35-45.
16. 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.
17. Chan S.Y., Tsang Y.F., Cui L.H. y Chua H. 2008. **Domestic wastewater treatment using batch-fed wetland and predictive model development for NH₃-N removal.** *Process Biochem.* 43, 297-305
18. Chang C, Tanong K., Xu J.; Shon H. 2011. **Microbial community analysis of an aerobic nitrifying-denitrifying MBR treating ABS resin wastewater.** *Bioresource Technol* 102, 5337–5344
19. Cho Y, G. Bae H., Yoon H., Park Y., Lee J., Lee S. 2002. **Isolation and characterization of a novel *Pseudomonas* sp., strain YG1, capable of degrading pyrrolidine under denitrifying conditions.** *FEMS Microbiol Lett* 21,111-115
20. Clesceri. L.S., Franson M. A. H. 1998. **Standard methods for examination of water and wastewater.** Edit Water Works Association and water Environment Federation. Estados Unidos de Norte América. 1220 pp.
21. Colleen J., Howell, Crohn M. David y Omary M. 2005. **Simulating nutrient cycling and removal through treatment wetlands in arid/semiarid environments.** *Ecol Eng* 25, 25–39.
22. Comisión Nacional del Agua, 2011. **Estadísticas del Agua en México 2011.** Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.
23. Crawley J. M. 2003. *An Introduction to Data Analysis Using S-plus.* Edit. Wiley. p. 761

24. Crites J. y Tchobanoglous E. 2005. **Tratamiento de aguas residuales en pequeñas poblaciones.** McGraw Hill. México, D.F. 756 pp.
25. DEPA. 2003. **Short-rotation willow biomass plantations irrigated and fertilized with wastewaters.** Danish Ministry of Environment
26. Drizo A., Frost A., Grace J. y Smith K. 2000. **Phosphate and ammonium distribution in a pilot-scale constructed wetland with horizontal subsurface flow using shale as a substrate.** *Water Res* 34(9), 2483-2490.
27. EEA. 2000. **Nutrients in European ecosystems. Environmental Assessment Report No 4.** European Environment Agency, Copenhagen, Denmark.
28. Faulter.L.A., Gagnonb V., Sundelrbeg C, hazarenc F. Burr. 2009. **Microbial processes influencing performance of treatment wetlands: A review.** *Ecol Eng* 35, 987–1004.
29. García C.A. 2007. **Determinación de la capacidad máxima de degradación de materia orgánica disuelta empleando reactores empacados experimentales.** Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 91 pp.
30. Gerke S. y Xu Y. 2001. **Nitrogen transformations in a wetland receiving lagoon effluent: Sequential model and implications for water reuse.** *Water Res* 16(35), 3857–3866.
31. Gervin L. y Brix H. 2001. **Removal of nutrients from combined sewer overflows and lake water in a constructed wetland system.** *Water Sci Technol* 44(11-12), 171-176.
32. Gottschall N., Boutin, C., Crolla A., Kinsley C. y Champagne P. 2007. **The role of plants in the removal of nutrients at a constructed wetlands treating agricultural (dairy) wastewater, Ontario, Canada.** *Ecol Eng* 29, 154-163.
33. Grant E.W., Marín L.S., Pedersen K.E., 2001. **Ecología y manejo de recursos naturales: Análisis de sistemas y simulación.** Edit. Agroamericana. Costa Rica
34. Hafner S. D., Jewell W.J. 2006. **Predicting nitrogen and phosphorus removal in wetlands due to detritus accumulation: a simple mechanistic model.** *Ecol.Eng.* 27, 13-21
35. Hanaki K., Wantawin C. y Ohgaki S. 1990. **Effects of the activity of heterotrophs on nitrification in a suspended-growth reactor.** *Water Res* 24 (3), 289-296.

36. Headley T.R., Huett D.O. y Davison L. 2001. **The removal of nutrients from plant nursery irrigation runoff in subsurface horizontal-flow wetlands.** *Water Sci Technol* 44(11-12), 159-167.
37. Hibiya K., Terada A., Tsuneda S. y Hirata A. 2003. **Simultaneous nitrification by controlling vertical and horizontal microenvironment in a membrane aerated biofilm reactor.** *J Biotechnol* 100, 23-32.
38. Holt J. 1999. **Bergey's Manual of systematic bacteriology.** Vol 3. Baltimore, Maryland. 1808-1034.
39. Howell C.J., Crohn D.M. y Mohammad O. 2005. **Simulating nutrient cycling and removal through treatment wetlands in arid/semiarid environments.** *Ecol Eng.* 25, 25-39
40. Hsua C., Hsieh H., Yang L., Wua S., Chang J., Hsiao S., Sue H., Yehe C., Hof Y., Lina H. 2011. **Biodiversity of constructed wetlands for wastewater treatment.** *Ecol Eng* 37, 1533– 1545
41. Hunt P.G., Poach M.E. 2001. **State of the art for animal wastewater treatment in constructed wetlands.** *Water Sci Technol* 44(11-12): 19–25.
42. Hunt P.G., Poach M.E., Szögi A.A., Reddy G.B., Humenik F.J. 2002. **Treatment of swine wastewater in constructed wetlands.** In: **Treatment Wetlands for Water Quality Improvement**, Pries J.H. Ed. Pandora Press: Ontario, Canada
43. Isees Systems. 2007. **STELLA.** Versión 9.0.2.
44. Kadlec H.R. 2003. **Effects of pollutant speciation in treatment wetlands.** *Ecol Eng* 20, 1-16.
45. Kadlec R.H. 2008. **The effects of wetland vegetation and morphology on nitrogen processing.** *Ecol Eng* 33, 126–141.
46. Kadlec R.H., Wallace D. S., 2009. **Treatment Wetlands.** Segunda Edición. Edit. CRC Press.
47. Koops, H.-P., Boöttcher, B., Moller, U.C., Pommerening-Roö ser, A. and Stehr, G. 1990. **Description of a new species of Nitrosococcus.** *Arch Microbiol* 154, 244-248.
48. Koops, H.-P., Boöttcher, B., Moöller, U.C., Pommerening-Roö ser, A and Stehr, G. 1991. **Classification of eight new species of ammonia-oxidizing bacteria, Nitrosomonas communis sp. nov., Nitrosomonas ureae sp. nov.,**

- Nitrosomonas aestuarii sp. nov., Nitrosomonas marina sp. nov., Nitrosomonas nitrosa sp. nov., Nitrosomonas eutropha sp. nov., Nitrosomonas oligotropha sp. nov. and Nitrosomonas halophila sp. nov.*** *Microbiology* 7 137, 1689-1699.
49. Krasnits E., Friedler E., Sabbah I., Beliavski M., Tarre S., Green M., 2009. **Spatial distribution of major microbial groups in a well established constructed wetland treating municipal wastewater.** *Ecol Eng* 35, 1085–1089
50. Langergraber G., Giraldi D., Mena J.I., Meyer D., Peña M., Toscano A., Brovelli A. y Korkusuz A. 2009. **Recent developments in numerical modelling of subsurface flow constructed wetlands.** *Sci Total Environ* 407, 3931–3943.
51. Lim P.E., Tay M.G., Mak K.Y., Mohamed N. 2003. **The effect of heavy metals on nitrogen and oxygen demand removal in constructed wetlands.** *Sci Tot Enviro* 301, 13–21
52. Lin Y.F., Ping S.R. y Wang T.W. 2001. **Effects of macrophytes and external carbon sources on nitrate removal from groundwater in constructed wetlands.** *Environ Pollut* 119, 413–420.
53. Liu. W.M., Dahab. F. M. Surampali. Y. R. 2005. **Nitrogen transformations modeling in subsurface-flow constructed wetlands.** *Water Environ Res* 77, 3; .246-258
54. Luna-Pabello V.M., Durán de Bazúa C, Ramírez-Carrillo H, Fenoglio-Limón F. y Sánchez-García H. 1997b. **Sistemas de tratamiento de aguas residuales a base de humedales artificiales. Una tecnología alterna para la protección del equilibrio ecológico en zonas urbanas.** En Memorias de las III Jornadas Panamericanas. Medio Ambiente y Vivienda. Zacatecas, México. pp. 78-83.
55. MacRare Software. 1999. **S-plus 2000 Professional.** Segunda revisión. MathSoft
56. Mayo A.W. y Bigambo T. 2005. **Nitrogen transformation in horizontal subsurface flow constructed wetlands I: Model development.** *Phys Chem Earth* 30 658-667.
57. McBride G.B. y Tanner C.C. 2000. **Modelling biofilm nitrogen transformations in constructed wetland microcosms with fluctuating water levels.** *Ecol Eng* 14, 93–106.
58. McGechan M. B., Moir S. E., Sym G. y Castle K. 2005. **Estimating inorganic and organic nitrogen transformation rates in a model of a constructed wetland purification system for dilute farm effluents.** *Biosystems Eng* 91(1), 61-75

59. Morris M. y Hebert R. 1996. **The design and performance of vertical flow reed bed for the treatment of high ammonia / low suspended solid organic effluents.** 5th International Conference on Wetland systems for Water Pollution Control. Austria. pp. IV5 a IV5-8.
60. Oblinger J., Koburger L. 1975. **"Understanding and Teaching the Most Probable Number Technique."** *J Milk Food Technol* 540-545.
61. Ouyang Y., Luo S.M., Cui L.H. 2011. **Estimation of nitrogen dynamics in a vertical-flow constructed wetland.** *Ecol Eng* 37, 453-459
62. Park S., Bae W. 2009. **Modeling kinetics of ammonium oxidation and nitrite oxidation under simultaneous inhibition by free ammonia and free nitrous acid.** *Process Biochem* 44, 631–640
63. Pauwels H. y Talbo H. 2004. **Nitrate concentration in wetlands: assessing the contribution of deeper groundwater from anions.** *Water Res* 38, 1019–1025.
64. Pommerening-Roöser, A., Rath, G. and Koops, H.-P. 1996. **Phylogenetic diversity within the genus Nitrosomonas.** *Syst Appl Microbiol* 19, 344-351
65. Ramírez Carrillo H.F. 2003. **Evaluación de la remoción biótica y abiótica de ortofosfatos en reactores empacados con diferentes materiales de uso potencial en humedales artificiales.** Tesis de maestría. Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 74 pp.
66. Ramírez Gama, *et al.* 2008. **Manual de prácticas de microbiología general. Laboratorio de microbiología experimental.** 5^a edición. Facultad de Química Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F.
67. Rodríguez Rodríguez R. 2004. **Estudio de la actividad bacteriana nitrificante en solución acuosa y su reconocimiento "in situ":** Tesis de maestría. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 66 pp.
68. Rosado Lozano L.E. 2010. **Modelos de remoción y transformación de compuestos nitrogenados en humedales artificiales de flujo subsuperficial: panorama actual y propuesta para generar nuevos modelos.** Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 75 pp.
69. Rousseau D. P., Vanrolleghem P. A. y De Pauw N. 2004. **Model-based design of subsurface flow constructed wetlands: a review.** *Water Res* 38, 1484-1493.

70. Rousseau D. P.L., Vanrolleghem P.A., De Pauw N. 2004. **Model-based design of horizontal subsurface flow constructed treatment wetlands: a review.** *Water Res* 38; 1484–1493
71. Sasikala S., Tanaka N., Wah Wah H.S. y Jinadasa K.B.S.N. 2009. **Effects of water level fluctuation on radial oxygen loss, root porosity, and nitrogen removal in subsurface vertical flow wetland microcosms.** *Ecol Eng*35, 410–417.
72. Sawaitayothin V. y Polprasert C. 2007. **Nitrogen mass balance and microbial analysis of constructed wetlands treating municipal landfill leachate.** *Bioresource Technol*98, 565–570.
73. Schmidt I., Sliemers O., Schmid M., Bock E., Fuerst J., Kuenen J.G., Jetten M.S.M., Strous M. 2003. **New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewaters.** *FEMS Microbiol Rev* 27, 481-492.
74. Sklarz M.Y., Gross A., Soares M.I.M. y Yakirevich A. 2010. **Mathematical model analysis of recalculating vertical flow constructed wetlands.** *Water Res.* 44, 2010-2020
75. Sreekumar, Narayana, Prashant Hegde, Manjunatha, and Sarojini. 2003. **Determination of nitrite by simple diazotization method.** *Microchem J*27-32.
76. Stein O.R., Hook P.B., Biederman J.A. y Borden D.J. 2003. **Does batch operation enhance oxidation in subsurface constructed wetlands?** *Water Sci Technol*48(5), 149-156.
77. Tanner C. C., Kadlec R.H., Gibss M. M., Sukias J. y Nguyen M. L. 2003. **Nitrogen processing gradients in subsurface-flow treatment wetlands-influence of wastewater characteristics.** *Water Res*18, 499-520.
78. Truu M., Juhanson J. y Truu J. 2009. **Microbial biomass, activity and community composition in constructed wetlands.** *Sci Total Environ*407, 3958–3971.
79. Tunçsiper B., Ayaz S.Ç. y Akça L.2006. **Modelling and evaluation of nitrogen removal performance in subsurface flow and free water surface constructed wetlands.** *Water Sci Technol* 53(12), 11-120
80. Vymazal J. 2009. **The use constructed wetlands with horizontal sub-surface flow for various types of wastewater.** *Ecol Eng*35, 1–17.

81. Vymazal J. y Kröpfelová L. 2009. **Removal of organics in constructed wetlands with horizontal sub-surface flow: A review of the field experience.** *Sci Total Environ* 407, 3911–3922.
82. Wainwright J. y Mulligan M. 2004. **Environmental Modelling: Finding Simplicity in Complexity.** John Wiley & Sons. Londres, Reino Unido. 432 pp
83. Wang Y., Zhang J., Kong H., Inamori Y., Xu K., Inamori R., y Kondo T. 2009. **A simulation model of nitrogen transformation in reed constructed wetlands.** *Desalination* 235, 93-101
84. Wood A. 1995. **Constructed wetlands in water pollution control: Fundamentals to their understanding.** *Water Sci Technol* 32(3), 21-29.
85. Zhou Y., Oehmen A., Lim M., Vadivelu V., Jern Ng W. 2011. **The role of nitrite and free nitrous acid (FNA) in wastewater treatment plants.** *Water Res* 45, 4672-4682.

ANEXOS

8 ANEXO I

8.1 Equipos

En la presente investigación se empleó el siguiente instrumental (Tabla 35) para realizar las diferentes técnicas de evaluación en los SEHA.

Tabla 35 Equipos empleados en esta investigación

Equipos	Modelos	Utilidad
Autoclave	Técnica Científica	Esterilización de material
Bomba de agua	Dolphin 502	Alimentación de reactores
Bomba de aire	Elete 802	Aireación
Electrodo medidor de pH	Oakton pH 110	Mediciones de pH
Cámara para electroforesis	Biorad	Electroforesis
Cámara UV	UVP M-20	Fotografía gel electroforesis
Centrifuga	Labnet 2400	Centrifugado
Contador de colonias	Spencer	Conteo de colonias bacterianas
Electrodo medidor de potencial redox	Oakton WD-35805-13	Mediciones de Potencial de Óxido-reducción
Electrodo medidor de temperatura	Orion 9107BNMD	Medición de temperatura
Electrodo medidor de Oxígeno Disuelto	Orion 080510MD	Medición de oxígeno disuelto
Equipo Medidor multiparámetros	Orion Five Star 1119001	Medición de los valores de electrodos
Espectrofotómetro UV	Pharma Biotec Ultrospec 300	DQO, NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^-
Conductímetro hidráulico	LMBE	Medición de la conductividad hidráulica

Equipos	Modelos	Utilidad
Incubadora con agitación	New Brunswick Scientific	Cultivo de microorganismos
Incubadora microbiológica	JMQTZ	Cultivo de microorganismos
Mufla	Robertshaw	Secado de muestras, digestiones para DQO
Microscopio Estereoscópico	Motic SMZ-168	Observación de microorganismos
Microscopio Óptico	Carl Zeiss K7	Observación de microorganismos
Microcentrífuga	Eppendorf 5424	Centrifugado de DNA
Termociclador	Eppendorf Mastercycler	PCR

8.2 Software

Se emplearon diversas herramientas informáticas durante el proceso de investigación las cuales se mencionan a continuación:

- ✓ Adobe Photoshop Procesador de imágenes
- ✓ Millenium CLS 2.3 Software para automatización
- ✓ Microsoft Access2007 Procesador de bases de datos
- ✓ Microsoft Excel 2007: Procesador de hojas de cálculo
- ✓ Microsoft Word 2007 Procesador de textos
- ✓ Microsoft Internet Explorer2007 Navegador de internet
- ✓ Microsoft Internet Visio 2007 Diseñador de esquemas
- ✓ Stella 9.0.2 Software para modelar y simular
- ✓ S-plus 2000 Software de análisis estadístico

9 ANEXO II

9.1 Medios de cultivo

Formula del agua enriquecida con amonio para una concentración de 60 mg/L de NH_4^+ modificada de Hanaki (1990) y Atlas (2005).

Tabla 36 Medio basal Nitrificantes

Compuesto	Concentración	
NaCl	0.30	g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.14	g/L
FeSO_4	0.13	g/L
KH_2PO_4	10.0	mL/L
	0.10	M
Sol. Micronutrientes	0.20	mL/L
Agua destilada	1,000	mL/L

Tabla 37 Solución de micro nutrientes

Compuesto	Concentración	
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.554	g/L
H_3BO_3	0.630	g/L
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.330	g/L
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.343	g/L
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}$	0.356	g/L

Tabla 38 Fuente de amonio para Nitrificantes

Compuesto	Concentración	
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.22	g/L
CaCO_3	3.3	g/L
$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	0.022	g/L

9.2 Determinaciones bioquímicas microbiológicas

Para determinar actividad degradadora de urea se utilizó el medio agar urea (Atlas, 2005).

Tabla 39 Agar Urea

Compuesto	Concentración	
(NH ₂) ₂ CO	20	g/L
Agar	15	g/L
NaCl	5.0	g/L
KH ₂ PO ₄	2.0	g/L
Peptona	1.0	g/L
Glucosa	1.0	g/L
Rojo de Fenol	0.012	g/L

pH 6.8 ± 0.2 at 25°C

Para determinar la oxidación de nitrógeno amoniacal a nitritos y/o nitratos de manera cualitativa se empleó la prueba de Griess (Ramírez, 2008)

Tabla 40 Reactivo de Griess

Reactivo A	
Compuesto	Cantidad
Ácido sultánico	0.5 G
Ácido acético glacial	30 ml
Agua destilada	120 ml
Reactivo B	
Compuesto	Cantidad
N-1-naftiletilamina	0.1 G
Ácido acético glacial	30 ml
Agua destilada	120 ml

Para realizar esta tinción es necesario adicionar al cultivo 4 gotas de la solución A y 4 de la solución B y hay que esperar unos segundos para ver si hay formación de color.

El desarrollo de color rojo a los 30 segundos indica la presencia de nitritos y presenta una prueba positiva de reducción de nitratos.

La ausencia de color puede indicar:

- Los nitratos no fueron reducidos (prueba negativa)
- Los nitratos fueron reducidos a productos diferentes a los nitritos, tales como amoníaco, óxido nítrico y óxido nitroso o nitrógeno molecular.

Dado que en esta prueba sólo se detectan nitritos, en este caso la ausencia de color podría ser una falsa negativa, por lo que resulta necesario añadir una pequeña cantidad de zinc para reducir los nitratos a nitritos. El desarrollo de un color rojo indicará la presencia de nitratos residuales, confirmándose de ese modo que la reacción negativa es verdadera.

Tinción de Gram

Para la tinción diferencial de Gram se emplearon los siguientes colorantes:

Tabla 41 Colorantes tinción de Gram

Compuesto	Preparación
A. Violeta de genciana	Diluir 10 ml de la solución stock en 90 ml de fenol. La solución stock consiste en disolver 10 g del cristal violeta en 90 ml de alcohol (96%).
B. Lugol	Disolver 3 g KI y un gramo de I ₂ en 300 ml de agua destilada.
C. Solución de Alcohol	Mezcle 800 ml de etanol con 200 ml de cetona.
D. Safranina	Disolver 0.25 g de colorante de Safranina en 10 ml de alcohol al 96% y agregar 100 ml de agua destilada.

Procedimiento:

Realizar preparaciones fijas de las bacterias a observar.

Añadir 1 ó 2 gotas de cristal violeta a la preparación, hasta cubrirla por completo y se dejar actuar el colorante durante 1 minuto.

Una vez transcurrido el tiempo, lavar la preparación con agua destilada.

Agregar 1 ó 2 gotas de solución de lugol y dejar actuar por 1 minuto, una vez transcurrido el tiempo la preparación se lava con el alcohol-acetona durante 10 segundos.

Finalmente se añade el colorante de contraste, safranina (1 ó 2 gotas) y se dejar actuar durante 30 segundos. Finalmente se lava con agua destilada. Una vez seca la tinción queda lista para observarse al microscopio.

Tinción de Nessler

La tinción de Nessler sirve para detectar la presencia de polifosfatos almacenados en las células bacterianas.

Tabla 42 Soluciones tinción de Nessler

Solución A		
Compuesto	Cantidad	
A. Azul de metileno	0.1	G
Ácido acético glacial	5	MI
Etanol al 96%	5	MI
Agua destilada	100	MI
Solución B		
Compuesto	Cantidad	
Cristal violeta 10% en etanol al 96%	3.3	MI
Etanol al 96%	5	ml
Agua destilada	100	MI
Solución C		
Compuesto	Cantidad	
Chrysoidin Y, solución acuosa al 1%	33.3	MI
Agua destilada	100	MI

Realizar una preparación fija de los microorganismos de interés:

Colocar una mezcla recién hecha de la solución A y B (1:1) sobre la preparación y dejar actuar 10 a 15 segundos, una vez transcurrido el tiempo, se escurre el exceso del colorante.

Posteriormente se agrega la solución C por un período de contacto de 45 segundos.

Finalmente se enjuaga la preparación con agua destilada por medio de goteo indirecto y una vez seca queda lista para observarse al microscopio.

Tinción de Sudan IV

Es empleada para la tinción de gránulos metacromatinianos y almacenamiento de lípidos.

Tabla 43 Colorantes Sudan IV

Compuesto	Cantidad	
Alcohol etílico al 95%	73.5	mL
Colorante Sudan	0.5	g
Agua destilada	≈100	mL

Para preparar el colorante es necesario calentar el alcohol etílico en baño María para disolver el colorante, posteriormente se agrega agua destilada a 75°C y se afora a 100ml, una vez frío se le agregan 25 ml de agua destilada y se agita. Finalmente se filtra con papel Whatman No.1 y se conserva en frasco de vidrio ámbar.

9.3 Técnicas de siembra microbiológica

Las técnicas empleadas para el aislamiento de microorganismos en el presente trabajo se explican en los siguientes puntos:

Siembra por estría

Este método se considera, en general, como el método más fácil para sembrar en placa. El asa de cultivo estéril se introduce en la suplección de microorganismos y se empiezan a dibujar una serie de estrías paralelas sobre la placa de agar con cuidado de no tocar las zonas anteriores ni perforar el agar, las estrías no deben quedar

superpuestas. Con ello el inóculo se va diluyendo progresivamente con cada estría sucesiva, de tal manera que si las estrías iniciales proporcionan un crecimiento confluyente, en las ultimas estrías se pueden apreciar colonias bien aisladas.

Siembra por estría cruzada

En esta técnica las estrías se trazan en 4 cuadrantes. Las placas se pueden inocular con una gota, y con un asa de nicromo estéril. Las primeras estrías se cruzan sobre el inóculo (cuadrante 1), para trazar el segundo cuadrante el asa se vuelve a esterilizar el asa a flama directa y una vez estéril se cruza un par de veces con el primer cuadrante, este procedimiento se vuelve a repetir para el cuadrante 3 y para el cuarto cuadrante se utiliza el asa sin esterilizar sólo que ahora ya no se cruza con ninguno de los cuadrantes.

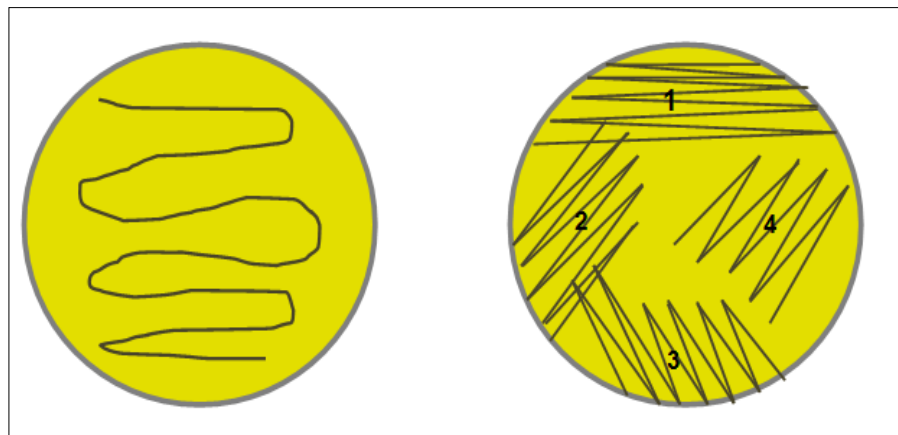


Figura 84. Tipos de estría en cultivos en placa: A) estría normal B) estría cruzada por agotamiento

9.4 Técnicas de conteo de microorganismos

Número más probable (NMP)

A partir de los cultivos aislados se realizaron 7 diluciones de 10^{-1} hasta 10^{-7} , estas diluciones se hicieron en solución fisiológica al 0.85% de NaCl y se inocularon en medio de cultivo líquido para nitrificantes, con una concentración de 40 mg/L esta pruebas se hicieron por duplicado, se incubaron por 7, 14, 21 y días. A estas muestras se les realizó la prueba de Griess para medir la actividad nitrificante.

El número de tubos positivos, es decir los que reaccionan al reactivo según la metodología de Mc Crady (1969) es contrastado en tablas para NMP. Este valor debe ser ajustado por el factor de dilución y el volumen de inóculo es decir $n \cdot (1000 \times 100)$, que corresponde a $n \cdot (1000)$ microorganismos por 10 mL.

Unidades formadoras de colonias por microgoteo

La prueba de unidades formadores de colonias por microgoteo tiene el mismo principio de la técnica NMP, sin embargo se cultiva en medio sólido por medio de microgotas de 10 μ L por dilución y se observan la UFC por gota, este resultado se multiplica por el factor de dilución y por el volumen inoculado, en este trabajo de investigación se partió de cultivos aislados, de los cuales se tomó 1 mL y se realizaron 8 diluciones de 10^{-1} hasta 10^{-7} en solución fisiológica al 0.85% de NaCl, se inocularon 3 muestras de 10 μ L por cada dilución en medio de cultivo sólido para nitrificantes, la concentración del medio fue de 40 mg/L, se incubaron por 7, 14, 21 y días, al cabo de estos periodos se realizó el conteo de las colonias.

Identificación molecular

Secuencia, complemento reverso gen amoA

```
TGGGTTTTCTACTGTGGGGGGGTAATCCGGTCTGCTCAAGTGGCCAGCACTTGTC
CACCTGTATGCCAGTATTTGAGGTGCCGCAGAGGGTCATGGAGAGGGTCAATGG
GGTTTCTACTGGTGGTGGTCACCATGTCATTGGGGGACTCGAAAATGCATGTGGA
CCAATTGTATGGACCAGTTTTTCCGTTCCGCATCCAGAATCTTCTGAGATCGCATT
TCGTCTAGTCAGCCGGTTGGACATGACCAAGACTTCCCCTGTAATCCAACCGGTC
AAACCAACGGTAGCTCGAAAACGCAGCAAAGACCAAGCAAATTTGCACCGAAAC
GACAAACAAGGGCAAGTCCTGGTCAGCGGTCAAGGGATGAAAGGCAGAAAGAAC
GCATCGGAAGCGCGCTGGACGCCGAAGGGGGCAAACCGGCCGGACAAGCAGGC
CCGGCGCATGTTTCGAGTCCGCGCAAGGACACATGTCGT
```

10 ANEXO III

10.1 Determinaciones fisicoquímicas

Para llevar a cabo cualquiera de las técnicas para determinar nitrógeno o fósforo, es necesario lavar el material con un detergente libre de estos dos elementos en alguna de sus formas.

Después de lavar el material con este detergente, es importante enjuagarlo con agua corriente y agua destilada, después hacer un lavado con ácido clorhídrico o sulfhídrico con una concentración al 20%. Al finalizar debe enjuagarse el material con agua desionizada y dejarlo secar.

Algunas técnicas que se pueden llevar a cabo en el LMBE para cuantificar nitrógeno en alguna de sus formas se describen a continuación:

Nitratos (NO_3^-)

4500 - NO_3^- - B Método de espectrofotometría ultravioleta.

La técnica que se describe a continuación, funciona para agua con poca materia orgánica presente.

La determinación de nitratos debe procurarse poco tiempo después de haber tomado la muestra, de no ser posible, se recomienda almacenar la muestra a 4°C por un máximo de dos días. Para mayor tiempo de almacenaje de muestras que no contengan cloro, se pueden preservar con 2 mL de H_2SO_4 concentrado por litro de muestra a 4°C. Cuando las muestras son preservadas con ácido, ya no es posible determinar nitritos y nitratos como dos especies diferentes.

Tabla 44. Aparatos materiales y reactivos para la determinación de nitratos

Aparatos	Reactivos	Material
Espectrofotómetro con por lo menos una celda	Agua desionizada Ácido clorhídrico [1N]	Tubo Nessler con tapón Pipeta (1mL)

Verter en un tubo Nessler 50mL de muestra, filtrarla antes si hay presencia notable de materia en suspensión.

Agregar al tubo 1mL de HCl y agitarlo, inmediatamente medir la absorbancia a 220nm. La curva de calibración se puede preparar para las concentraciones comprendidas entre 0 y 7 mg NO₃⁻ - N/l, haciendo las diluciones necesarias a partir de una solución madre de nitratos, que se prepara como se indica a continuación:

Secar nitrato de potasio por 24 horas en el horno a 105°C.

Disolver 0.7218g del reactivo seco en 1 litro de agua desionizada para tener una concentración conocida de 1.0mL de solución patrón = 100.0µg NO₃⁻ - N.

Nota: Esta solución patrón puede ser preservada hasta por 6 meses agregando 2mL de CHCl₃/l.

Para conocer la interferencia que tiene la materia suspendida en el análisis, puede medirse la absorbancia de la muestra a 220nm y a 275nm, ya que el nitrato no absorbe la luz en la segunda longitud de onda.

El uso de ácido en esta técnica previene la interferencia de hidróxidos o carbonatos en concentraciones mayores a 1,000mg de CaCO₃/l.

El cloro presente en la muestra no afecta la determinación.

Sí causan interferencias en esta técnica la presencia de surfactantes, nitritos y Cr⁶⁺.

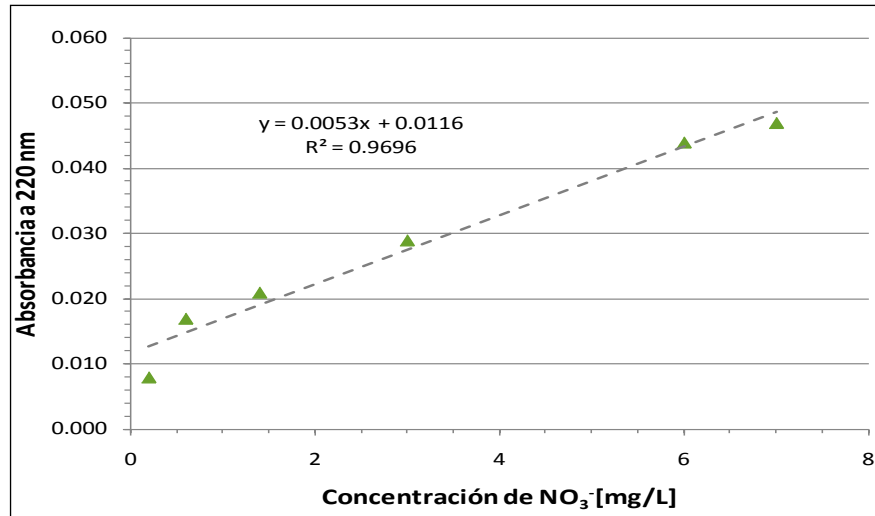


Figura 85 Curva patrón para la determinación de nitratos

Nitritos (NO₂⁻)

Método de determinación de nitrito por el método de diazotización simple.

La técnica que se enuncia a continuación se basa en las reacciones simples de diazotización que se llevan a cabo con la P – nitroanilina (PNA) con el acetoacetato de etilo (ACE).

Este método puede ser empleado para muestras de agua con concentraciones de nitrito entre 0.05 y 6.0 µg NO₂⁻ - N/l.

Tabla 45. Aparatos materiales y reactivos para la determinación de nitritos

Aparatos	Reactivos	Material
Espectrofotómetro con por lo menos una celda	Agua desionizada	Matraz aforado (10mL)
	Solución de p – nitroanilina (PNA)	1 Pipeta (5mL) 3 Pipetas (3mL)
	Solución de acetoacetato de etilo (ACE)	
	Solución de hidróxido de sodio [2M]	

Tabla 46. Soluciones para determinación de nitritos

Solución de p – nitroanilina (PNA)	Disolver 0.125g de PNA en 55.3mL de HCl. Aforar la solución a 250mL con agua destilada.
Solución de acetato de etilo (ACE)	Aforar 5mL de acetato de etilo a 100mL con alcohol.
Solución de hidróxido de sodio [2M]	Disolver 8g de NaOH en agua destilada y aforar a 100mL con este mismo solvente.

En un matraz aforado de 10mL, verter:

1. 5mL de muestra y 1mL de la solución de p – nitroanilina (PNA), agitar vigorosamente durante 2 minutos para que se complete la reacción de diazotización.
2. Agregar al matraz 1mL de acetoacetato de etilo (ACE) y 2mL de hidróxido de sodio 2M.
3. Aforar el matraz y después de 5 minutos medir la absorbancia a 507nm.
4. La curva de calibración se puede preparar para las concentraciones comprendidas entre 0.05 y 6.0 $\mu\text{g NO}_2^-$ - N/mL, haciendo las diluciones necesarias a partir de una solución madre de nitritos, que se prepara como se indica a continuación:
5. Disolver 0.150g de nitrato de sodio en 100mL de agua destilada. Esta solución, tiene una concentración conocida de 1,000 $\mu\text{g NO}_2^-$ N/mL
6. Se puede preservar con 2mL de cloroformo.

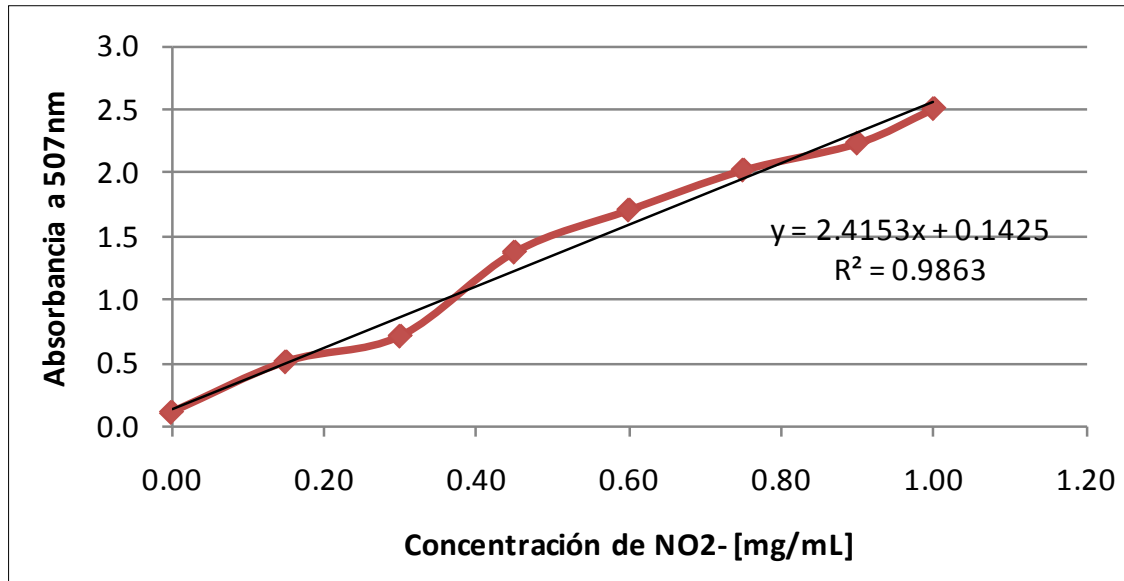


Figura 86 Curva patrón para determinación de nitritos

Nitrógeno amoniacal

Método de la nesslerización.

Los principales factores que afectan esta técnica son la concentración y la presencia de interferencias.

Se utiliza únicamente para aguas potables purificadas, si no se hace para este tipo de agua se puede hacer una destilación previa para eliminar turbidez, color, magnesio y calcio. Como una opción de la destilación se puede precipitar la materia presente en el agua con sulfato de zinc y álcali.

Debido a que la técnica sólo puede ser utilizada en bajas concentraciones de amonio ($20\mu\text{g NH}_3 - \text{N/L}$) se llevan a cabo los siguientes pasos para preparar una muestra antes del análisis:

Filtrar la muestra a través de un filtro de fibra de vidrio de 0.75micras, para eliminar la materia orgánica presente. Es importante que el filtro sea de este material para evitar la posible interferencia con la nitrocelulosa de los filtros de papel. Se realiza una dilución de la muestra tomando sólo 1mL de filtrado aforando con 9mL de agua desionizada. La dilución se lleva a cabo para evitar altas concentraciones de minerales

en la muestra que con la presencia del reactivo de Nessler puedan formar flóculos que interfieran en la medición de la absorbancia de la muestra.

Tabla 47. Aparatos materiales y reactivos para la determinación de Nitrógeno amoniacal

Aparatos	Reactivos	Material
Espectrofotómetro con por lo menos una celda	Agua desionizada Solución de EDTA Solución de Nessler	Tubo de Nessler (10mL) 1 Micropipeta (10µl) 1 Micropipeta (200µl)

Tabla 48. Soluciones para la determinación de Nitrógeno amoniacal

Solución de EDTA	Disolver 50g de tetraacetato de etilendiamina disódica dihidratada, en 60 mL de agua con 10 g de NaOH. Aforar la solución a 100mL.
Solución de Nessler	Disolver 100g de Hgl ₂ y 70g de KI en una pequeña cantidad de agua. Adicionar esta mezcla lentamente y con agitación a una solución fría de 160 g de NaOH en 500mL de agua. Aforar esta nueva solución a 1l. Esta solución debe ser almacenada en material de vidrio de borosilicato con tapón de goma y protegido de la luz solar, para mantener su estabilidad por 1 año. Se puede comprobar la efectividad del reactivo si produce color 10 minutos después de agregar 0.1mg de solución de NH ₃ - N/l y no forma un precipitado en las dos horas siguientes.

En el tubo Nessler verter los 10 mL de muestra diluida y agregar 1 gota (10 µl) de EDTA, agitar para homogeneizar. Agregar 200 µl de solución de Nessler y volver a agitar, se debe esperar por lo menos 15 minutos para que se efectúe la reacción y después medir la absorbancia a 420nm.

La curva de calibración se puede preparar para las concentraciones comprendidas entre 0.05 y 6.0 µg NO₂⁻ - N/mL, haciendo las diluciones necesarias a partir de una solución madre de nitritos, que se prepara como se indica a continuación:

Disolver 3.189 g de NH_4Cl anhidro, secado a 100°C en agua y aforarla a 1L.

Diluir 10 mL de esta solución en 1 litro de agua destilada. Esta solución tiene la siguiente concentración: $1.0\text{ mL} = 10.0\ \mu\text{gN} = 12\ \mu\text{h NH}_4 = 12.2\ \mu\text{g NH}_3$

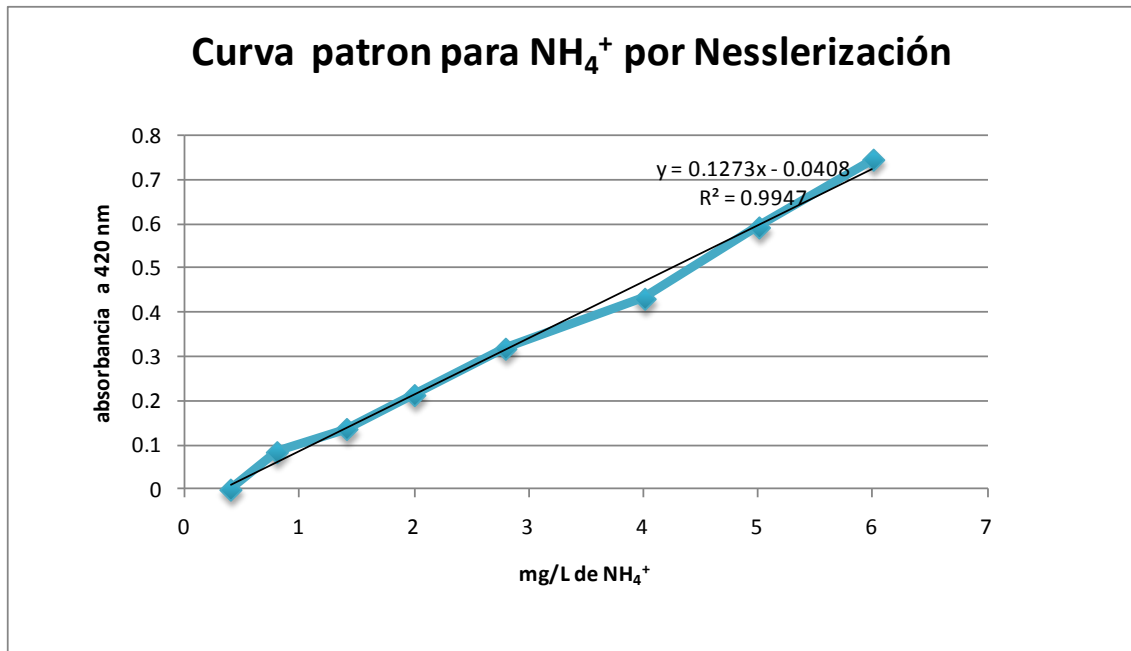


Figura 87 Curva patrón para la determinación de Nitrógeno amoniacal por el método de Nesslerización

Demanda Química del Oxígeno

5220 – C. Método trimétrico de reflujo cerrado

La DQO puede considerarse como una medida aproximada de la demanda teórica de oxígeno, es decir, determina la cantidad de oxígeno necesario para oxidar la materia orgánica presente en una muestra. La D.Q.O. se define como la cantidad de oxígeno que es equivalente a la cantidad de dicromato de potasio, el cual es consumido por las materias disueltas y en suspensión, cuando la muestra es tratada por dicho oxidante. Cuando la materia orgánica es oxidada (por el ión dicromato), el cromo cambia del estado hexavalente (VI) al estado trivalente (III). Ambas especies del cromo tienen una coloración y absorber en la región visible del espectro, por ejemplo, el ión dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) absorbe fuertemente en la región 400 nm, aquí la absorbencia del ión cromato (Cr^{3+}) es mucho menor, mientras que en la región de 600 nm, el ión cromato

absorbe fuertemente y la absorción del dicromato es cercana a cero. (Standard methods, 1998)

Tabla 49. Reactivos para solución digestora de D.Q.O.

Reactivo	Cantidad	Características
$K_2Cr_2O_7$	102.216 g	Secar a 150 °C por 2 horas
H_2SO_4	167 ml	
$HgSO_4$	33.3 g	
H_2O destilada	Aforar a 1 L	Disolver perfectamente

Tabla 50. Reactivo de ácido sulfúrico para la determinación de la D.Q.O.

Reactivo	Cantidad	Características
Ag_2SO_4	5.5 g	Esa cantidad es por cada kg de H_2SO_4 (98% de pureza) Se deja reposar de 1 a 2 días para que se disuelva y se mezcla perfectamente antes de utilizar.

Tabla 51. Reactivo para el estándar de biftalato de potasio para la determinación de la D.Q.O.

Reactivo	Cantidad	Observación
$HOOC C_6 H_4 COOK$ (KHP)	425 mg	Ligeramente triturar y secar a peso constante a 110 °C
H_2O destilada	Aforar a 1L	

Procedimiento

Curva de calibración, Los reactivos utilizados deben ser siempre los mismos.

1. Lavar los tubos de digestión (20X150 roscados) con H_2SO_4 al 20%.
2. Preparar las diluciones a con el reactivo KHP, en matraces volumétricos de 100 ml. Mezclar muy bien.

Tabla 52 Diluciones para preparar la curva de calibración para la determinación de D.Q.O.

Volumen de KHP (ml)	Volúmen de H_2O destilada (ml)
0	100
10	90
20	80
30	70
40	60
60	40
100	0

3. Por duplicado, adicionar 5 ml de cada dilución a los tubos de digestión. Para preparar el blanco, sólo adicionar 5 ml de agua destilada.

Nota: deben ser 4 blancos, 2 serán para la curva y los otros dos que no serán digeridos, para evaluar el estado de los reactivos, en teoría deben tener una absorbancia muy similar.

4. Adicionar 3 ml de solución de digestión a cada tubo de digestión.
5. Adicionar 7 ml de reactivo de ácido sulfúrico. Debe agregarse lentamente y por las paredes de tubo.
6. Cerrar bien los tubos y agitar con el vortex durante 15 segundos, hasta observar un color homogéneo en todo el tubo. Nota: los tubos deben tomarse con un trapo, pues al agitarlos se calientan.
7. Permitir la digestión en la estufa a 150 °C durante 2 horas, menos dos de los blancos.

8. Dejar enfriar a temperatura ambiente, de 3 horas o toda la noche.
9. Medir la absorbancia a 600nm.
10. Para calcular la DQO, se toma en cuenta que el KHP tiene una DTO de 1,176 mg O₂ /mg y siguiendo la siguiente ecuación.

$$DQO = \frac{(mg\ O_2)(1000)}{vol\ muestra}$$

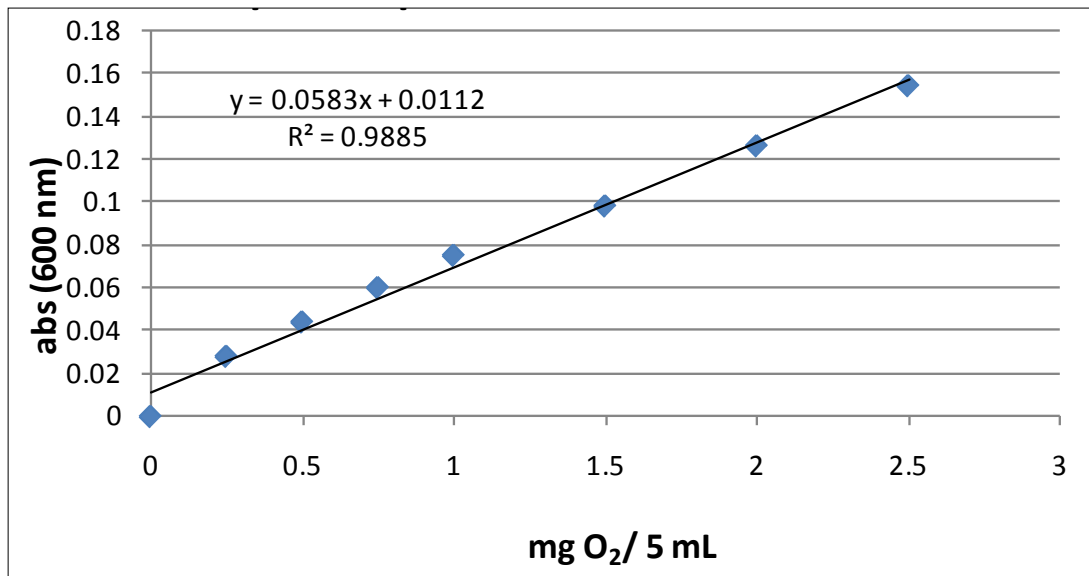


Figura 88 Curva patrón para la determinación de D.Q.O.

10.2 Cálculos estequiométricos para determinar las concentraciones propuestas en medio enriquecido con amonio.

Cálculos para determinar la masa de $(NH_4)_2SO_4$ necesaria para alcanzar una concentración promedio de 60 mg/L de NH_4^+

$$0.124g \left[\frac{1 \text{ mol}[(NH_4)_2SO_4]}{132.14 \text{ g}} \right] \times \left[\frac{2 \text{ mol}[NH_4]}{1 \text{ mol}[(NH_4)_2SO_4]} \right] \times \left[\frac{32 \text{ g}}{1 \text{ mol}[NH_4]} \right] = \frac{64 \text{ g}}{132.14 \text{ g}} = [0.48] \times [0.12] \\ = 0.059.52 \text{ g/L de } NH_4^+$$

Cálculos para determinar la masa de $C_6H_{12}O_6$ y $(NH_4)_2SO_4$ necesaria para alcanzar la concentración de 70 mg/L de O_2 medida en D.Q.O.

Glucosa

$$0.040g \left[\frac{1 \text{ mol}[C_6H_{12}O_6]}{180 \text{ g}} \right] \times \left[\frac{6 \text{ mol}[O_2]}{1 \text{ mol}[C_6H_{12}O_6]} \right] = \frac{1.8 \text{ g}}{1 \text{ mol } O_2} = [0.060] \times [0.0024] = 0.00014 \text{ g/L}$$

Sulfato de amonio

$$0.060g \left[\frac{1 \text{ mol}[(NH_4)_2SO_4]}{132.14 \text{ g}} \right] \times \left[\frac{4 \text{ mol}[O_2]}{1 \text{ mol}[(NH_4)_2SO_4]} \right] \times \left[\frac{32 \text{ g}}{1 \text{ mol}[O_2]} \right] = \frac{128 \text{ g}}{132.14 \text{ g}} = [0.969] \times [0.060] \\ = 0.060 \text{ g/L}$$

Por lo tanto 0.00014 g/L de O_2 por aporte de la glucosa más 0.060 g/L de O_2 por aporte del $(NH_4)_2SO_4$ dan un total de 0.074/L g de O_2 medidos como D.Q.O.

11 ANEXOIV

11.1 Cálculos

Para el cálculo de las cinéticas bacterianas, se emplearon las siguientes fórmulas

A partir de los datos generados en los experimentos antes mencionados.

Tabla 53 Fórmulas empleadas para el cálculo de las cinéticas bacterianas

Estimador	Descripción	Fórmula
μ	Tasa de crecimiento específico balanceado en un medio no restringido. Donde N_0 =Concentración inicial de bacterias. N =Concentración final de bacterias. t_0 = tiempo inicial t =tiempo final	$\mu = \frac{\ln \frac{N}{N_0}}{t - t_0}$
μ_m	Tasa máxima de crecimiento bacteriano medio restringido μ_m =Tasa de máxima de crecimiento específico bacteriano. S =Concentración del sustrato limitante. K_s = Constante de degradación del sustrato	$\mu = \mu_m \left(\frac{S}{K_s + S} \right)$
N	Tasa de generación bacteriana M_0 =número inicial de células. M =Número final de células.	$n = \frac{\ln \frac{M}{M_0}}{\ln 2}$
Y	Velocidad de degradación Y_0 =concentración inicial del sustrato K = constante de degradación t =tiempo transcurrido	$Y = Y_0 e^{-kt}$
K_s	Constante de degradación o formación N = Concentración final N_0 = Concentración inicial t = Tiempo final t_0 = Tiempo inicial	$K_s = \frac{\ln \frac{N}{N_0}}{t - t_0}$

Calculo de la densidad aparente del material de empaque

La densidad aparente del material de empaque se determino siguiendo el método propuesto por UEX (2009), el cual consistió en los siguientes pasos:

Se tara una probeta graduada limpia de 100 mL, se consideró un volumen de 100 mL el cual se llenó con gravilla de óxido de sílice con un diámetro de 1 a 2 mm, se pesó la probeta y se registró el peso.

El cálculo de la densidad aparente se realizó con la siguiente ecuación:

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

Calculo de la densidad real del material de empaque

Se introdujo 100 mL de agua en una probeta graduada, a la cual se le añadieron 10 g de grava la densidad real fue calculada con la siguiente ecuación:

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

Determinación de la porosidad de la grava de dióxido de sílice

La porosidad es el espacio libre de la matriz del medio, conformado por los poros que quedan entre las partículas del medio la porosidad se calculó con la siguiente ecuación:

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

Las pruebas anteriores se realizaron con una n=10

De forma complementaria se realizó una difracción de rayos-x para conocer la composición y estructura cristalina de la grava de dióxido de sílice.

11.1.1.1 Determinación de la conductividad hidráulica

La conductividad hidráulica se define como la velocidad en que el agua que fluye en un medio poroso, la cual es directamente proporcional al gradiente hidráulico causado por el flujo (ley de Darcy 1856). Se evaluó como:

$$Q = K \times A \times \frac{h}{L}$$

Donde:

Q = caudal [m³/día]

K = conductividad hidráulica [m/d]

A = área [m²]

h= altura de agua [m]

L= largo de la muestra de suelo [m]

El método que se siguió fue el siguiente:

- 1.- Se colocó un volumen de material en el permeámetro de carga constante
- 2.- Se adicionó un gasto (Q) constante a la entrada
- 3.- Se colocó una probeta de 1 L y se midió el Q a la entrada del sistema, en el desvío y a la salida (balance de masa).
- 4.- Se registraron los tiempos requeridos en llenar el volumen de la probeta



Figura 89 Permeámetro

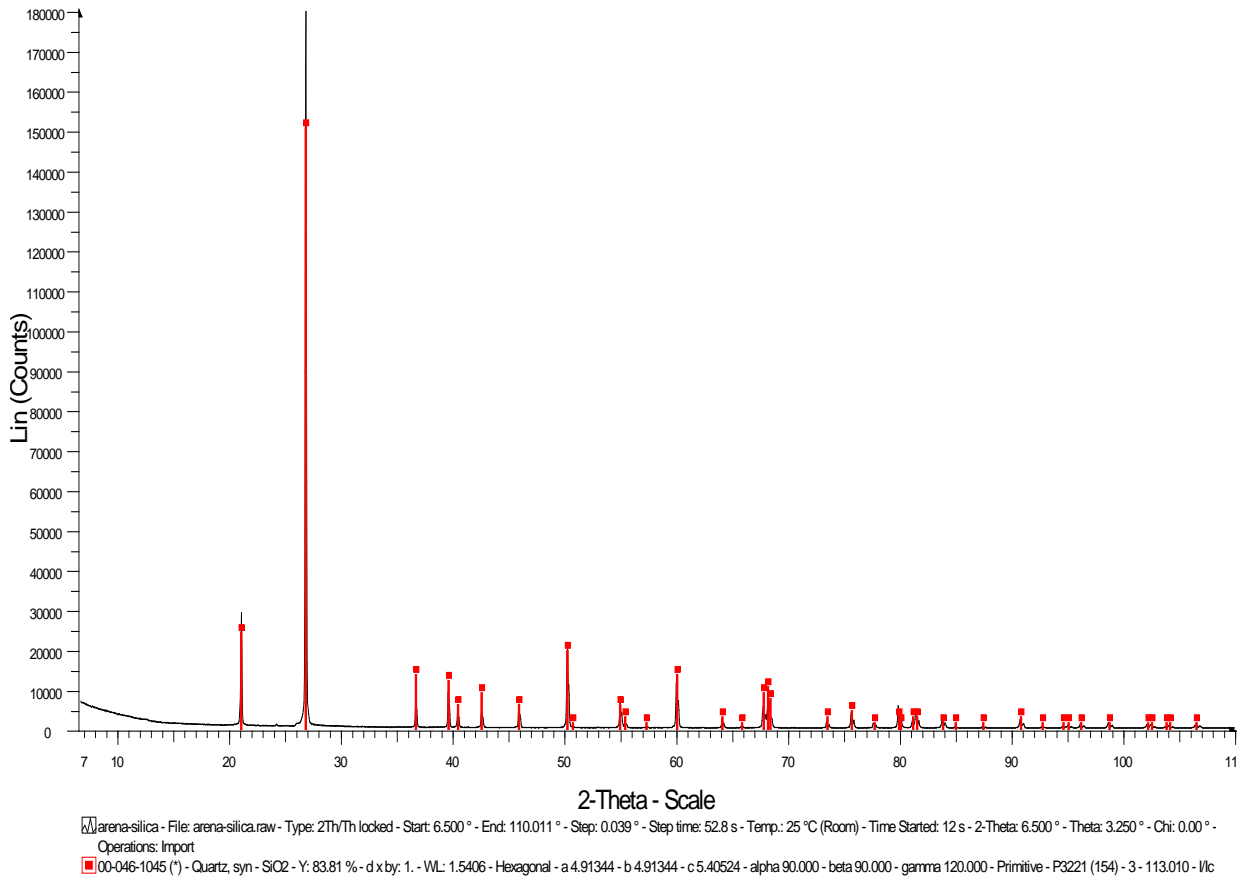


Figura 90 Difracción de rayos x de una muestra de grava sílica utilizada como material de empaque para los SEHA.

12 ANEXO V

Modelos generales de GLM planteados en la interfase de S-plus

GLM para la degradación del amonio

$$-\ln(\text{NH4D}) = a + \text{pH} + \text{OD} + \text{BM} + \text{TEMP} + \text{PR} + \text{NO2} + \text{NO3} + \text{pH} \times \text{OD} \times \text{BM} \\ \times \text{PR} + \text{TEMP} \times \text{OD} + \text{NO2} \times \text{pH} \times \text{OD} \times \text{BM} \times \text{PR} + \text{NO3} \times \text{pH} \times \text{OD} \times \text{BM} \times \text{PR} + e$$

- ◆ Variable de respuesta (RTNH4 tasa de transformación del de NH_4^+ en 7 días)
- ◆ Intercepto (constante)
- ◆ Efectos directos
- ◆ Interacciones
- ◆ Error (exponencial)

GLM para la transformación del amonio a nitritos

$$\ln(\text{NO2P}) = a + \text{pH} + \text{OD} + \text{BM} + \text{TEMP} + \text{PR} + \text{DQO} + \text{NH4} + \text{NO3} + \text{pH} \times \text{OD} \times \text{BM} \\ \times \text{PR} + \text{TEMP} \times \text{OD} + \text{NH4} \times \text{pH} \times \text{OD} \times \text{BM} \times \text{PR} + \text{NO3} \times \text{pH} \times \text{OD} \times \text{BM} \times \text{PR} + e$$

- ◆ Variable de respuesta (RTNH4 tasa de transformación del de NH_4^+ en 7 días)
- ◆ Intercepto (constante)
- ◆ Efectos directos
- ◆ Interacciones
- ◆ Error (exponencial)

GLM para la transformación de a nitritos a nitratos

$$-\ln(\text{NO2D}) = a + \text{pH} + \text{OD} + \text{BM} + \text{TEMP} + \text{PR} + \text{DQO} + \text{NO2} + \text{NO3} + \text{pH} \times \text{OD} \times \text{BM} \\ \times \text{PR} + \text{TEMP} \times \text{OD} + \text{NO2} \times \text{pH} \times \text{OD} \times \text{BM} \times \text{PR} + \text{NO3} \times \text{pH} \times \text{OD} \times \text{BM} \times \text{PR} + e$$

- ◆ Variable de respuesta (NH4 tasa de transformación del de NH_4^+ en 7 días)
- ◆ Intercepto (constante)
- ◆ Efectos directos
- ◆ Interacciones
- ◆ Error (exponencial)

Tablas ANOVA experimentación previa

12.1 Algoritmos del modelo de simulación

- $Amonio(t) = Amonio(t - dt) + (-degradacion_de_amonio) * dt$
 INIT Amonio = Inflow_amonio
 OUTFLOWS:
 -> $degradacion_de_amonio = Amonio * (EXP(Ksamonio * 7))$
 \TIMESTAMPED
- $balace_nitratos(t) = balace_nitratos(t - dt) + (produccion_nitratos - degradacion_nitratos) * dt$
 INIT balace_nitratos = produccion_nitratos
 INFLOWS:
 -> $produccion_nitratos = nitritos * (EXP(kDMASANITRITOS * 7) * nitritos / nitrobacter)$
 \TIMESTAMPED
 OUTFLOWS:
 -> $degradacion_nitratos = balace_nitratos - balace_nitratos * (EXP(KDNITRAOS * 7))$
 \TIMESTAMPED
- $balace_nitritos(t) = balace_nitritos(t - dt) + (produccion_nitritos - degradacion) * dt$
 INIT balace_nitritos = produccion_nitritos
 INFLOWS:
 -> $produccion_nitritos = nitritos_iniciales * (EXP(Ksnitritos * 7) * nitritos / Nitrosomonas)$
 \TIMESTAMPED
 OUTFLOWS:
 -> $degradacion = balace_nitritos - balace_nitritos * (EXP(kDMASANITRITOS * 7))$
 \TIMESTAMPED
- $DENITRIFICACION(t) = DENITRIFICACION(t - dt) + (DEGRADACION_Nitratos + inflow_nitratos) * dt$
 INIT DENITRIFICACION = DEGRADACION_Nitratos
 INFLOWS:
 -> $DEGRADACION_Nitratos = NITRATOS * EXP(KDNITRAOS * 7) * Oxigeno_disuelto$
 \TIMESTAMPED
 -> $inflow_nitratos = Stock_NITRATOS$
 \TIMESTAMPED
- $DQO(t) = DQO(t - dt) + (-consumo_de_DQO) * dt$
 INIT DQO = Inflow_DQO
 OUTFLOWS:
 -> $consumo_de_DQO = DQO - DQO * (EXP(KDQO * DEGRADACION_Nitratos))$
 \TIMESTAMPED
- $DQO_muerte_celular(t) = DQO_muerte_celular(t - dt) + (decaimiento_celular) * dt$
 INIT DQO_muerte_celular = decaimiento_celular
 INFLOWS:
 -> $decaimiento_celular = Inflow_DQO + (50 / decaimiento_nitrobacter + 50 / decaimiento) * 500$
- $Inoculo_inicial(t) = Inoculo_inicial(t - dt) + (-crecimiento_nitrosomona) * dt$
 INIT Inoculo_inicial = $2.15 * 10^5$
 OUTFLOWS:
 -> $crecimiento_nitrosomona = (Inoculo_inicial * (EXP(kcnitrosomonas * 7))) * (Amonio / kcnitrosomonas + Amonio)$
 \TIMESTAMPED
- $Inoculo_inicial_nitrobacter(t) = Inoculo_inicial_nitrobacter(t - dt) + (-crecimiento_nitrobacter) * dt$
 INIT Inoculo_inicial_nitrobacter = $1.32 * 10^{23}$
 OUTFLOWS:

- \rightarrow crecimiento_nitrobacter =
 (Inoculo_inicial_nitrobacter*(EXP(kcnitrobacter*7))^(nitritos/kDMASANITRITOS+nitritos))
 \TIMESTAMPED
- NITRATOS(t) = NITRATOS(t - dt) + (degradación_nitritos - DEGRADACIÓN_Nitratos) * dt
 INIT NITRATOS = degradación_nitritos
 INFLOWS:
 \rightarrow degradación_nitritos = nitritos/(EXP(kDMASANITRITOS*7))
 \TIMESTAMPED
 OUTFLOWS:
 \rightarrow DEGRADACIÓN_Nitratos = NITRATOS*EXP(KDNITRAOS*7)*Oxígeno_disuelto
 \TIMESTAMPED
- nitritos(t) = nitritos(t - dt) + (- produccion_nitratos) * dt
 INIT nitritos = 0.20
 OUTFLOWS:
 \rightarrow produccion_nitratos = nitritos*(EXP(kDMASANITRITOS*7)*nitritos/nitrobacter)
 \TIMESTAMPED
- nitritos(t) = nitritos(t - dt) + (degradacion_de_amonio + inflow_nitritos - degradación_nitritos) * dt
 INIT nitritos = degradacion_de_amonio
 INFLOWS:
 \rightarrow degradacion_de_amonio = Amonio*(EXP(Ksamonio*7))
 \TIMESTAMPED
 \rightarrow inflow_nitritos = Stock_NITRITOS
 \TIMESTAMPED
 OUTFLOWS:
 \rightarrow degradación_nitritos = nitritos/(EXP(kDMASANITRITOS*7))
 \TIMESTAMPED
- nitritos_iniciales(t) = nitritos_iniciales(t - dt) + (- produccion_nitritos) * dt
 INIT nitritos_iniciales = 0.003
 OUTFLOWS:
 \rightarrow produccion_nitritos = nitritos_iniciales*(EXP(Ksnitritos*7)*nitritos/Nitrosomonas)
 \TIMESTAMPED
- nitrobacter(t) = nitrobacter(t - dt) + (decaemiento_nitrobacter) * dt
 INIT nitrobacter = decaemiento_nitrobacter
 INFLOWS:
 \rightarrow decaemiento_nitrobacter =
 stock_crecimiento_nitrobacter-stock_crecimiento_nitrobacter*(EXP(Kdnitrobacter*7))
 \TIMESTAMPED
- Nitrosomonas(t) = Nitrosomonas(t - dt) + (decaemiento) * dt
 INIT Nitrosomonas = decaemiento
 INFLOWS:
 \rightarrow decaemiento = stock_crecimiento-stock_crecimiento*(EXP(Kdnitrosomonas*7))
 \TIMESTAMPED
- Oxígeno_disuelto(t) = Oxígeno_disuelto(t - dt) + (- consumo_de_OD) * dt
 INIT Oxígeno_disuelto = 5.95
 OUTFLOWS:
 \rightarrow consumo_de_OD = Oxígeno_disuelto*((KsOxígeno)-Oxígeno_disuelto)
 \TIMESTAMPED

- $K_{dnitrobacter} = -0.0025$
- $K_{dnitrosomonas} = -0.450$
- $K_{DQO} = -0.14$
- $K_{samonio} = -0.20$
- $K_{snitritos} = 0.80$
- $K_{sOxígeno} = -0.15$
- $K_{spH} = -0.04$
- $pH(t) = pH(t - dt) + (-perdida_de_pH) * dt$
 INIT pH = 8.43
 OUTFLOWS:
 ⇒ $perdida_de_pH = pH * EXP(K_{spH} * Amonio)$
 ↳TIMESTAMPED
- $stock_crecimiento(t) = stock_crecimiento(t - dt) + (crecimiento_nitrosomona - decaimiento) * dt$
 INIT stock_crecimiento = crecimiento_nitrosomona
 INFLOWS:
 ⇒ $crecimiento_nitrosomona =$
 $(Inoculo_inicial * (EXP(k_{cnitrosomonas} * 7))) * (Amonio / (k_{cnitrosomonas} + Amonio))$
 ↳TIMESTAMPED
 OUTFLOWS:
 ⇒ $decaimiento = stock_crecimiento - stock_crecimiento * (EXP(K_{dnitrosomonas} * 7))$
 ↳TIMESTAMPED
- $stock_crecimiento_nitrobacter(t) = stock_crecimiento_nitrobacter(t - dt) + (crecimiento_nitrobacter - decaimiento_nitrobacter) * dt$
 INIT stock_crecimiento_nitrobacter = crecimiento_nitrobacter
 INFLOWS:
 ⇒ $crecimiento_nitrobacter =$
 $(Inoculo_inicial_nitrobacter * (EXP(k_{cnitrobacter} * 7))) * (nitritos / (k_{DMASANITRITOS} + nitritos))$
 ↳TIMESTAMPED
 OUTFLOWS:
 ⇒ $decaimiento_nitrobacter =$
 $stock_crecimiento_nitrobacter - stock_crecimiento_nitrobacter * (EXP(K_{dnitrobacter} * 7))$
 ↳TIMESTAMPED
- $Stock_NITRATOS(t) = Stock_NITRATOS(t - dt) + (degradación_nitratos - inflow_nitratos) * dt$
 INIT Stock_NITRATOS = degradación_nitratos
 INFLOWS:
 ⇒ $degradación_nitratos = balace_nitratos - balace_nitratos * (EXP(K_{DNITRATOS} * 7))$
 ↳TIMESTAMPED
 OUTFLOWS:
 ⇒ $inflow_nitratos = Stock_NITRATOS$
 ↳TIMESTAMPED
- $Stock_NITRITOS(t) = Stock_NITRITOS(t - dt) + (degradación - inflow_nitritos) * dt$
 INIT Stock_NITRITOS = degradación
 INFLOWS:
 ⇒ $degradación = balace_nitritos - balace_nitritos * (EXP(k_{DMASANITRITOS} * 7))$
 ↳TIMESTAMPED
 OUTFLOWS:
 ⇒ $inflow_nitritos = Stock_NITRITOS$
 ↳TIMESTAMPED
- $Inflow_amonio = 56.74$
- $Inflow_DQO = 94.45$
- $k_{cnitrobacter} = 0.56$
- $k_{cnitrosomonas} = 0.225$
- $k_{DMASANITRITOS} = -1.41$
- $K_{DNITRATOS} = -0.0020$