



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

ESTUDIO DE LOS ECOSISTEMAS BACTERIANOS MESÓFILOS CULTIVABLES DURANTE LA FORMACIÓN DE LA BIOPELÍCULA EN UN REACTOR DE DISCOS ROTATORIOS QUE TRATA AGUAS RESIDUALES DE LA INDUSTRIA DEL PAPEL

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Biotecnología

PRESENTA:  
BARRIOS MARTÍNEZ MARÍA DEL CARMEN SOCORRO

TUTOR PRINCIPAL  
DRA.-ING. MA DEL CARMEN DURÁN DOMÍNGUEZ  
FACULTAD DE QUÍMICA DE LA UNAM

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

Dra.-Ing. Ma del Carmen Durán Domínguez	Facultad de Química, UNAM
Dr. Adalberto Noyola	Instituto de Ingeniería, UNAM
Dra. Susana Saval Bohórquez	Instituto de Ingeniería, UNAM
M. en C. Pablo Pérez Gavilán	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

MÉXICO, D. F. junio, 2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó en el período de 1990 a 1992, bajo la dirección de la Dra. Ing.-Ma del Carmen Durán Domínguez en los Laboratorios de Tratamiento de Aguas Residuales, del entonces Programa de Ingeniería Química Ambiental y de Química Ambiental de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Se reconoce la colaboración del M. en C Pablo Pérez Gavilán, del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos de enriquecimiento e identificación de bacterias celulolíticas.

Se reconoce la asesoría académica de la Dra. Susana Saval Bohórquez en los experimentos de enriquecimiento bacteriano y determinación de celulosa.

Durante los estudios de maestría gocé de una beca otorgada por el CONACYT (1990 a 1992).

Las aguas residuales empleadas en esta investigación eran originalmente de la Planta de Peña Pobre, la cual fue posteriormente trasladada al estado de Tlaxcala (PAMOSAS).

Esta tesis fue defendida en examen de grado presentado el día

El Jurado del Examen de Maestría estuvo constituido por:

Presidente     Dr. Rafael Vázquez Duhalt             Instituto de Biotecnología, UNAM

Vocal             Dr. Leobardo Serrano Carreón             Instituto de Biotecnología, UNAM

Secretario     Dra. Susana Saval Bohórquez             Instituto de Ingeniería, UNAM

Suplente         Dra. Maricarmen Quirasco Baruch         Facultad de Química, UNAM

Suplente         Dr. Adalberto Noyola Robles             Instituto de Ingeniería, UNAM

Sustentante:

MARÍA DEL CARMEN SOCORRO BARRIOS MARTÍNEZ

\_\_\_\_\_

Tutor:

DRA.-ING. MARÍA DEL CARMEN DURÁN DOMÍNGUEZ

\_\_\_\_\_

## **AGRADECIMIENTOS**

Esta tesis se la dedico a mis hijas Carla Estefanía e  
Irene Petlascalco Barrios

También agradezco a mis padres y hermanos por todo el apoyo  
que me han brindado a lo largo de la vida.

## ÍNDICE

	Pág.
Reconocimientos	1
Resumen/ Abstract	9
Glosario	11
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 La celulosa y el papel en México	16
1.2 Objetivos generales	23
2. CONCEPTOS FUNDAMENTALES	
2.1. Biodegradación de la celulosa	25
2.2. Formación de la biopelícula	30
2.2.1. Transporte y adsorción de moléculas orgánicas: Acondicionamiento del soporte	33
2.2.2. Transporte de células microbianas al soporte	35
2.2.3. Adsorción de células al soporte	35
2.2.4. Procesos de transformación	36
2.2.5. Cinética de crecimiento de biopelículas	36
2.2.6. Metodología para el estudio de biopelículas	38
2.3. Reactor biológico rotatorio (Biodisco ®)	39
2.3.1. Microbiología	41
2.3.2. Factores que afectan la eficiencia del tratamiento de aguas residuales en el biodisco	42
2.4. Identificación de bacterias	44
3. MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1. Puesta en marcha del reactor	49
3.2. Estudio fisicoquímico del reactor	51
3.3. Estudios microbiológicos	52
3.3.1. Aislamiento de bacterias mesófilas cultivables aerobias durante la formación de la biopelícula en un reactor de discos rotatorios, durante la primera corrida experimental	53
3.3.2. Identificación de bacterias mesófilas cultivables aerobias de la muestra del cultivo enriquecido a partir de biopelícula del reactor de discos rotatorios	53
3.4. Análisis estadísticos de los datos experimentales	54
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1. Primera corrida experimental en el reactor de discos rotatorios	56
4.2. Segunda corrida experimental en el reactor de discos rotatorios	76

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	85
BIBLIOGRAFÍA	90
APÉNDICE I. Datos experimentales de las dos corridas realizadas	102
APÉNDICE II. Estudios microbiológicos	113
APÉNDICE III. Técnica de cultivo de enriquecimiento	120
APÉNDICE IV. Descripción de los géneros aislados	122
APÉNDICE V. Memoria fotográfica	126
APÉNDICE VI. Análisis estadísticos	130
APÉNDICE VII. Propiedades y composición de la biopelícula	159
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	
Tabla 1.1. Uso neto de agua durante la manufactura de productos de pulpa y papel	17
Tabla 1.2. Norma Oficial Mexicana NOM-002-SEMARNAT-1996.	21
Tabla 2.1. Contenido de celulosa de diferentes materiales	25
Tabla 2.2. Variables importantes en la adhesión de las células y la formación de la biopelícula	32
Tabla 2.3. Intervalos típicos de las principales características del efluente para la remoción del sustrato carbonoso en un RBR	40
Tabla 2.4. Comunidades que proliferan en reactores de biodisco	42
Tabla 3.1. Características del reactor de biodisco usado	49
Tabla 3.2. Técnicas empleadas en el análisis fisicoquímico de las aguas residuales	51
Tabla 4.1. Características fisicoquímicas del agua residual usada durante los primeros cuarenta días del experimento	59

Tabla 4.2. Concentración de celulosa y azúcares libres en el agua residual	63
Tabla 4.3. Velocidad específica de crecimiento de las biopelículas de los reactores A y B	65
Tabla 4.4. Géneros bacterianos y sus frecuencias, aisladas de un cultivo enriquecido de la primera biopelícula tomada del RBR	68
Tabla 4.5. Relación de las cepas aisladas y su identificación hasta género	77
Tabla 4.6. Pruebas bioquímicas para identificación de bacterias	77
Tabla 4.7. Características fisicoquímicas del agua residual usada en la segunda corrida experimental	80
Figura 1.1. Agua consumida por tonelada de papel producido, en $m^3 T^{-1}$	18
Figura 1.2. Proceso de producción de papel a partir de papel reciclado	20
Figura 2.1. Biopelícula de <i>Staphylococcus</i> tomada en microscopio electrónico de barrido, observándose polímeros extracelulares que unen las células a la superficie y unas a otras	31
Figura 2.2. La acumulación de la biopelícula frecuentemente toma la forma de una curva sigmoideal	33
Figura 2.3. Desarrollo de la biopelícula en organismos Gram negativos	34
Figura 2.4. Curva de crecimiento sigmoideal graficada contra el tiempo	37
Figura 2.5. Reactor de discos rotatorios	40
Figura 2.6. Diagrama de bloques del tratamiento de aguas residuales fácilmente biodegradables	41
Figura 2.7. Reactor de discos rotatorios a escala de laboratorio	43
Figura 2.8. Acercamiento de uno de los discos de un reactor de discos rotatorios	44

Figura 2.9. Curvas de corrección para RBR para temperaturas por debajo de los 13°C (55°F)	44
Figura 3.1.a. Reactor experimental de discos rotatorios	50
Figura 3.1.b. Detalle de la división del reactor en dos iguales, operando en paralelo y cuyos efluentes se envían a un sedimentador	50
Figura 4.1. Variación de la demanda química de oxígeno en los reactores A y B, durante la primera corrida experimental	56
Figura 4.2. Eficiencias de remoción de DQO en el RBR	57
Figura 4.3. Variación de la demanda bioquímica de oxígeno en los reactores A y B, durante la primera corrida experimental	58
Figura 4.4. Eficiencias de remoción de DQO en el RBR, para ambos reactores	58
Figura 4.5. Concentración de celulosa y azúcares libres en el agua residual utilizada, en $\mu\text{g mL}^{-1}$	60
Figura 4.6. Concentración de oxígeno disuelto en el agua residual y licor mezclado de los reactores A y B	61
Figura 4.7. Biomasa medida como masa seca de las biopelículas muestreadas en la primera corrida experimental	62
Figura 4.8. Biomasa medida como conteo celular (UFC/área muestreada en los discos del reactor biológico rotatorio)	64
Figura 4.9. Logaritmo de la biomasa medida como masa seca de las biopelículas muestreadas en la primera corrida experimental	64
Figura 4.10. Logaritmo natural de la biomasa medida como conteo celular (UFC/área muestreada en los discos del reactor biológico rotatorio) durante la primera corrida experimental	65
Figura 4.11. Variación de la demanda química de oxígeno en los reactores A y B, durante la segunda corrida experimental	80
Figura 4.12. Eficiencias de remoción de DQO en el RBR en un lapso de 7 días	81

Figura 4.13. Biomasa medida como conteo celular (UFC/área muestreada en los discos del reactor biológico rotatorio) en el tiempo 82

Figura 4.14. Logaritmo de la biomasa medida como conteo celular (UFC/ área muestreada en los discos del reactor biológico rotatorio) en el tiempo 82

## Resumen

Una de las limitaciones del tratamiento de aguas residuales en un reactor biológico rotatorio es el tiempo en el que se obtiene una biopelícula funcional, motivo por el cual en los años de 1990 a 1992 se realizaron dos corridas experimentales en un reactor biológico rotatorio, RBR, dividido en dos sub-reactores de 20 litros cada uno, usando agua residual de la industria del papel de reciclaje (agua blanca), con el objetivo de diseñar un inóculo bacteriano con el cual se pudiera reducir el tiempo de aclimatación (fase *lag*) del reactor. Las bacterias identificadas fueron aisladas de un cultivo enriquecido en celulosa, de la biopelícula tomada del RBR a los 7 días después de haberse iniciado la primera corrida. Ocho de los once géneros aislados fueron Proteobacterias, dos fueron Firmicutes y uno fue Flavobacteria. El inóculo propuesto para acelerar el arranque del tratamiento en un reactor biológico rotatorio estuvo formado por los siguientes géneros *Eikenella*, *Aeromonas*, *Yersinia* y *Cellulomonas*. El resto de los géneros aislados no se incluyeron en el inóculo debido a su escasa capacidad para adherirse a superficies y / o por ser parásitos del hombre. También, se analizó el efecto de la concentración de la materia orgánica soluble medida como demanda química de oxígeno, DQO, sobre la velocidad específica de proliferación o crecimiento de las bacterias mesófilas cultivables y la relación entre el conteo de células viables y la concentración de azúcares libres, durante la formación de la biopelícula. El valor promedio encontrado para la velocidad específica de crecimiento de la biopelícula fue de  $2.12 \text{ h}^{-1}$ , para las cámaras 1 de ambos reactores y de  $1.24 \text{ h}^{-1}$  para las cámaras 3 de los reactores. No se pudo establecer una relación directa entre la velocidad específica de crecimiento de las bacterias mesófilas cultivables de la biopelícula y la concentración de DQO soluble. En cambio, sí se encontró una relación directa entre la concentración de azúcares libres en el licor mezclado, el conteo de células viables en la biopelícula y el incremento en la eficiencia en la remoción de la materia orgánica soluble medida como demanda bioquímica de oxígeno, DBO<sub>5</sub>.

Palabras clave: Ecosistemas bacterianos celulolíticos, biopelícula, velocidad específica de crecimiento, reactor biológico rotatorio, aguas residuales de la industria del papel

## Abstract

Two experiments were carried out in between 1990 and 1992 in a rotating biological reactor divided into two reactors, each with 20 liters of working volume, using residual liquid effluents of a paper industry (known as white water). The purpose of this study was to design a bacterial inoculum with which the lag phase (acclimation time) of a reactor can be reduced for rapidly reaching a maximum activity. The identified bacteria were isolated of a cellulose enriched culture coming from the RBR 7 days after the first run was started. Eight of the eleven isolated genus were Proteobacteria, two were Firmicutes and one was Flavobacteria. The proposed inoculum was Eikenella, Aeromonas, Yersinia y Cellulomona. The rest of the isolated geni were not included in the inoculum due to their limited capacity to adhere to surfaces and / or for being men's parasites. It was also analyzed the effect of dissolved organic matter measured as chemical oxygen demand (COD) over the ratio of viable cells count and the concentration of free sugars, during the formation of the film. The mean value found for the biofilm's specific growth rates was 2.12 h<sup>-1</sup>, for the chambers 1 of both reactors and 1.24 h<sup>-1</sup> for chambers 3 in both reactors. It was not possible to establish a direct relationship between the biofilm specific rate of growth of the cultivable mesophilic bacteria and the chemical oxygen demand concentration. On the other hand, a direct relationship between the free sugars concentration in the mixed liquor, the feasible cells counting in the biofilm, and the increase in the removal efficiency of the soluble organic matter measured as BOD<sub>5</sub> was found.

Ecosistemas bacterianos celulolíticos, biopelícula, velocidad específica de crecimiento, reactor biológico rotatorio, aguas residuales de la industria del papel

Key Words: Cellulolytic bacterial ecosystems, biofilm, specific growth rate, rotating biological contactor, paper industry waste waters

## Glosario

**ADN.** Siglas para el ácido desoxirribonucleico.

**Agua residual.** Se define agua residual o agua servida como "una combinación de los líquidos y residuos arrastrados por el agua proveniente de casas, edificios comerciales, fábricas e instituciones, junto con cualquier agua subterránea, superficial o pluvial que pueda estar presente" (Ramalho, 1991). Las cuatro principales fuentes de aguas residuales son: 1. Aguas domésticas o urbanas, 2. Aguas residuales industriales, 3. Aguas de usos agrícolas, 4. Aguas pluviales o de escorrentías (Ramalho, 1991).

**Biomasa.** Masa biológica, cantidad de materia viva producida en un área determinada de la superficie terrestre o por organismos de un tipo específico. Las mediciones de la biomasa aplicadas a microorganismos que se usan más frecuentemente son la densidad óptica, la masa seca y el contenido de proteína celular, como nitrógeno Kjeldahl, aunque éste último también mide fuentes de nitrógeno inorgánico.

**Biopelícula.** Una película microbiana representa un ecosistema heterogéneo cuyos productos finales son el resultado del desarrollo en tiempo y espacio de una comunidad de especies microbianas.

**CBH.** Celobiohidrolasas

**Celulosa.** La celulosa es un polímero lineal de la D-glucosa que posee enlaces glucosídicos  $\beta$  (1-4). Esta molécula es un polisacárido estructural, constituyente de la pared celular de las plantas, es el compuesto orgánico más abundante sobre la Tierra.

**Celulosoma.** Los celulosomas son complejos multienzimáticos cuyos componentes actúan de manera sinérgica para hidrolizar a la celulosa y se localizan fuera de la célula bacteriana.

**Crc.** Siglas en inglés para el gen que codifica para la proteína represora por catabolito. También, recientemente se ha mostrado que Crc regula la biosíntesis de Pili A y Pili B.

**D.E.** Desviación estándar.

**DGGE.** Siglas en inglés para la electroforesis en gradiente de gel desnaturizante.

**Demanda química de oxígeno, DQO, en mg L<sup>-1</sup>.** La demanda química de oxígeno es una variable que se usa para medir el contenido de materia orgánica de las aguas residuales y las aguas naturales. El "oxígeno equivalente" para la

oxidación de la materia orgánica se mide con el uso de un oxidante químico fuerte, en un medio ácido. La prueba debe realizarse a altas temperaturas. Se requiere un catalizador (sulfato de plata) para acelerar la descomposición. Para eliminar iones inorgánicos por precipitación se usa el sulfato de mercurio.

**Demanda bioquímica de oxígeno soluble, DBO<sub>s</sub>, en mg L<sup>-1</sup>.** Es el parámetro más ampliamente usado para determinar la posible contaminación por materiales orgánicos biodegradables, tanto de aguas de suministro como de aguas residuales es la DBO. Esta determinación incluye la medición del oxígeno disuelto usado por los microorganismos en la oxidación bioquímica de la materia orgánica. La DBO es una determinación muy usada debido a: (1) da una idea de los requerimientos de oxígeno para estabilizar biológicamente la materia orgánica presente, (2) para determinar el dimensionamiento de las plantas de tratamiento de aguas residuales biodegradables, (3) para determinar la eficiencia de los procesos de tratamiento de las aguas residuales y (4) para determinar el cumplimiento de la normativa<sup>1</sup> ambiental.

**EG.** Endoglucanasas.

**Eh.** Potencial eléctrico: Es el trabajo realizado para trasladar una carga eléctrica unitaria q, desde el punto B hasta el punto A, en Joule, Culombio o Volt.

**EPS.** Exopolisacárido.

**Guayacoles.** Los guayacoles junto con los catecoles son fitoquímicos del grupo de los fenoles.

**Lagunas de oxidación o de estabilización.** Las lagunas de oxidación son sistemas para tratar aguas residuales biodegradables. Consisten de un canal circular u ovalado y están equipadas con aireadores mecánicos. El agua residual entra a la laguna, donde es aireada y circula a 0.25 a 0.35 ms<sup>-1</sup>. Las lagunas de oxidación generalmente operan con tiempos de residencia largos (Metcalf y Eddy, 1991).

**Lodos activados.** Es un proceso para el tratamiento de las aguas residuales y su nombre se debe a que durante el tratamiento se produce una masa activa de microorganismos capaces de estabilizar aerobiamente un desecho. La materia orgánica disuelta o suspendida en el agua se alimenta a un reactor donde un cultivo de bacterias aerobias que se mantiene en suspensión la degrada. Al contenido del reactor se le conoce como licor mezclado (Metcalf y Eddy, 1991).

---

<sup>1</sup> Normativa: Conjunto de normas aplicables a una determinada materia o actividad. La palabra *normatividad* no está en el Diccionario

**LPS.** Lipopolisacárido, componente importante de la membrana externa bacteriana que juega un importante papel en la unión superficial inicial de las bacterias al soporte.

**Pili.** Velloidades presentes en la pared de las bacterias.

**PME.** Siglas en inglés (*outer membrane proteins*) para las proteínas de la membrana externa de las bacterias.

**Policelulosoma.** Unión de celulosomas que forman una protuberancia en el exterior de las células bacterianas y en los hongos (en bacterias anaerobias y en algunas aerobias y en algunos hongos). Ver celulosoma.

**Proceso con desarrollo de biomasa en suspensión.** Es el proceso de tratamiento biológico en el cual los microorganismos responsables de la conversión de la materia orgánica u otros constituyentes del agua residual a gases y material celular están en suspensión dentro del líquido.

**Proceso con desarrollo de biomasa adherida.** Es el proceso de tratamiento biológico en el cual los microorganismos responsables de la conversión de la materia orgánica u otros constituyentes del agua residual a gases y material celular están adheridos a un medio inerte, como rocas, cerámicas o plásticos. Los procesos con biomasa adherida se conocen como procesos de película fija o biopelícula.

**Pulpeo.** Palabra que no existe en el Diccionario de la Academia de la Lengua Española pero que viene de pulpa y es el término que se utiliza en la jerga de la industria de la celulosa y el papel para designar la operación unitaria donde las fibras de celulosa o de papel reciclado se mezclan con agua para formar una pulpa, llamada pulpa de papel.

**RBR.** Reactor biológico rotatorio.

**Re.** Número de Reynolds. Número adimensional utilizado en mecánica de fluidos para caracterizar el movimiento de un fluido.

**Remoción de DBO carbonoso.** Es la conversión biológica de la materia orgánica que contiene carbono, presente en el agua residual, a tejidos celulares, gases y otros productos finales disueltos en el agua.

**S.** Sustrato, cantidad de sustrato hidrolizado.

**SUC.** Sitio de unión de la celulosa (CBD, Cellulose binding domain)

**Sólidos disueltos totales, SDT.** Son los sólidos que se separan pasando a través de un filtro de fibra de vidrio con poros de 1.2 micrómetros. Los sólidos filtrables consisten de coloides y sólidos disueltos.

**Sólidos suspendidos totales, SST.** Son los sólidos que no son filtrables cuando se pasan a través de un filtro de fibra de vidrio con un poro de 1.2 micrómetros (Metcalf y Eddy, 1991).

**Sólidos sedimentables, SS.** Son los sólidos que se sedimentan en el fondo de una probeta o en un cono Imhoff, en un período de 60 minutos. Los sólidos sedimentables son una medida aproximada de la cantidad de material sedimentable que pueden removerse durante un tratamiento real, en la operación unitaria de sedimentación (Metcalf y Eddy, 1991).

**Sólidos totales, ST.** Es toda la materia que permanece como residuo después de la evaporación del agua a 103°C. La materia que tiene una presión de vapor lo suficientemente alta a esta temperatura se pierde durante la evaporación y no se define como sólido (Metcalf y Eddy, 1991).

**t. Tiempo de contacto.** Tiempo requerido para que un compuesto o elemento ejerza su acción.

**X.** Concentración de bacterias en suspensión en el fluido.

Símbolos griegos

$\mu$ . Velocidad específica de crecimiento, en  $h^{-1}$

$\mu_{max}$ . Velocidad específica de crecimiento máxima, en  $h^{-1}$

# **1. INTRODUCCIÓN**

## 1.1 La celulosa y el papel en México

El agua residual se define como una combinación de desechos líquidos provenientes de casas habitación, instituciones diversas, como universidades y hospitales, comercios y establecimientos industriales (Metcalf y Eddy, 1991). Dependiendo de la fuente, las aguas residuales tienen diversas características físicas y químicas; así, por ejemplo, el agua residual de la industria azucarera presenta valores altos de DBO y DQO (Durán-de-Bazúa, 1994).

México produce el 20% del consumo nacional promedio de celulosa, que asciende a 1,200,000 toneladas. El restante 80% se importa básicamente de Estados Unidos (Cámara Nacional de las Industrias de la Celulosa y del Papel, 2008).

La verificación ambiental de la industria de la celulosa y de papel es de jurisdicción federal. Este giro cuenta con 474 establecimientos (PROFEPA, 2010) Durante las verificaciones realizadas por la PROFEPA se aplica el marco jurídico en cuanto al Reglamento de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección del Ambiente en materia de Prevención y Control de la Contaminación de la Atmósfera. Específicamente, se revisan los parámetros contemplados en la NOM-085-SEMARNAT-1994, que establece los niveles máximos permisibles de emisión a la atmósfera de contaminantes emitidos por fuentes fijas que utilizan combustibles fósiles (DOF, 1997) tales como humos, partículas suspendidas totales, bióxido de azufre y óxidos de nitrógeno.

La Comisión Nacional del Agua funge como autoridad en materia de la cantidad y de la calidad de las aguas y su gestión en el Territorio Nacional, dentro del ámbito de la competencia federal, con apego a la descentralización del sector agua (Anónimo, 2013a).

Actualmente la industria de la celulosa y el papel en México genera alrededor del 0.4 % del producto interno bruto, PIB. Es un sector que de 2003 a 2008 ha crecido anualmente 3.5%. El 85% de la materia prima proviene de fibras secundarias, es decir de papel y cartón reciclado, el restante 15% de fibras vírgenes, principalmente de la madera (Anónimo, 2013c).

La producción de celulosa y papel demanda grandes cantidades de agua a través de sus diferentes procesos, destacando en la producción de celulosa las operaciones de: lavado y cribado, blanqueado y cribado y secado con el 67.4% de la demanda. Durante el proceso, el agua se usa como vehículo de sustancias y fibras (Nalco, 1989). En la Tabla 1.1 se muestran los volúmenes de agua usados en la manufactura de los productos de pulpa y papel.

Tabla 1.1. Uso neto de agua durante la manufactura de productos de pulpa y papel (Nalco, 1989)

<b>Proceso</b>	<b>Típico x 10<sup>3</sup>, m<sup>3</sup> Mg<sup>-1</sup></b>	<b>Plantas nuevas x 10<sup>3</sup>, m<sup>3</sup> Mg<sup>-1</sup></b>
<b>Kraft sin blanquear</b>	<b>56.78-151.41</b>	<b>75.70</b>
<b>Blanqueado de kraft</b>	<b>56.78-132.48</b>	<b>75.70</b>
<b>Sulfito sin blanquear</b>	<b>56.78-189.27</b>	<b>94.63</b>
<b>Blanqueado de sulfito</b>	<b>113.56-189.27</b>	<b>151.41</b>
<b>Semiquímico</b>	<b>30.28-151.41</b>	<b>94.63</b>
<b>Madera molida</b>	<b>11.35-181.69</b>	<b>15.14</b>
<b>Pulpa de sosa</b>	<b>227.12-302.83</b>	<b>246.05</b>
<b>Papel fino</b>	<b>30.28-151.41</b>	<b>37.85</b>
<b>Grados para libros o publicaciones</b>	<b>37.85-132.48</b>	<b>45.42</b>
<b>Papel de seda</b>	<b>26.49-170.32</b>	<b>56.78</b>
<b>Papeles kraft</b>	<b>7.57-37.85</b>	<b>18.92</b>
<b>Cartón</b>	<b>7.57-56.78</b>	<b>30.28</b>

Como se puede observar en la Tabla 1.1 existe un ahorro en promedio de 50% en el uso del agua en las plantas con tecnología nueva, lo cual es atribuible a la política mundial de reducir, cambiar y hacer eficiente el uso de los diferentes insumos que son necesarios para la producción, es decir, trabajar bajo un esquema de producción más limpia.

Smurfit Cellulose Dupin, una empresa productora de celulosa, afirma que durante los últimos 40 años el consumo de agua por tonelada de papel producida se ha reducido 9 veces. En la Figura 1.1 (Anónimo, 2006), se observa la reducción en el consumo de agua de esa empresa.

Volumen de agua consumida por tonelada métrica de papel producido, m<sup>3</sup>/t

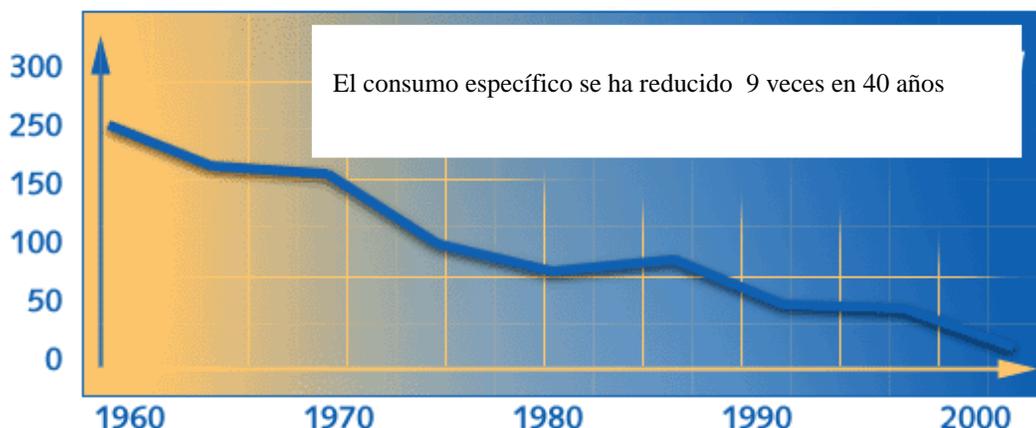


Figura 1.1. Agua consumida por tonelada de papel producida, en m<sup>3</sup> T<sup>-1</sup> (Anónimo, 2006)

Aparejado a la reducción en el consumo de agua durante el proceso de producción del papel, también durante los últimos 30 años se ha mejorado la calidad de los efluentes. La cantidad de contaminantes, medidos como demanda química de oxígeno, DQO, se ha reducido en 62%, medida como demanda bioquímica de oxígeno, DBO, en 45% y los sólidos suspendidos, SS, en un 83% (Salomé y Goikoetxea, 2006).

En general, la producción de papel reciclado es como sigue: la materia prima, que en este caso es papel de desecho, se reduce a “lechada” o pulpa por agitación con agua caliente en un tanque de mezclado (“hidropulpeo”). Las grapas y otros materiales metálicos se separan en este punto. Si el material está impreso y si el producto lo requiere, se destinta por medio de un calentamiento del material a 65.5°C (150°F), con la adición de agentes químicos que liberan la tinta de la fibra. El agua generada en esta etapa puede contener, entre otros, compuestos orgánicos volátiles, tintas para impresión y gomas. Es importante señalar que las fibras de celulosa están cargadas negativamente, debido a la presencia de grupos ionizados y a la lignina residual presente en la superficie de las fibras, lo que provoca que entre las fibras exista repulsión. Por lo anterior, en este punto del proceso se suele agregar alguna sustancia floculante, la que disminuirá la repulsión entre las cargas y, por tanto, entre las fibras. Una vez que se agrega el catión, que en el caso del proceso analizado fueron almidones, se provoca que puedan formarse interacciones electrostáticas entre las fibras, en la forma de puentes de hidrógeno. Al mismo tiempo que se le da consistencia y firmeza al producto de papel deseado y al retenerse más materiales finos, se tiene una disminución en los valores de DQO y la DBO del agua residual (Nachtergaele, 1989; Vázquez-García y col., 1990).

Después, el material es tamizado y lavado. Esta fibra de pulpa puede usarse para obtener diferentes productos, tales como papel para escribir, periódico, pañuelos desechables, pañales y toallas desechables. La pulpa terminada se manda a un equipo conocido como máquina de papel, en el cual es convertida en papel o cartón. En ella se elimina el agua y si es necesario se agregan agentes químicos acondicionadores, para producir ciertas cualidades deseadas en la hoja. La hoja que sale de la máquina pasa por rodillos prensadores y rodillos secadores, con lo cual el producto tiene un contenido de humedad de menos del 6% (Nalco, 1989). En la Figura 1.2 se describe el proceso de fabricación del papel a partir de papel reciclado, así como los puntos en los cuales se producen las aguas residuales.

El agua residual producida por una fábrica de papel que utiliza papel de desperdicio, puede contener caseína, almidón, aceites solubles en agua, minerales, celulosa (como fibras o sólidos suspendidos), hipoclorito de sodio, hidróxido de sodio, restos de lignina, fenoles clorados, microbicidas, catecoles y guayacoles (Luonsi, 1999).

Los límites máximos de las descargas de las aguas residuales están indicados en las NOM-001-SEMARNAT-1996, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales (DOF, 1997) y la NOM-002-SEMARNAT-1996, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a los sistemas de alcantarillado (DOF, 1998). Para el caso del agua residual utilizada en el presente estudio se aplica la Norma Oficial 002, debido a que las descargas fueron al alcantarillado (Tabla 1.2).

Con el fin de minimizar los daños que se ocasionan con la disposición de las aguas residuales a los cuerpos de agua receptores y al ambiente en general, es necesario seleccionar el tren de tratamiento más apropiado para el efluente contaminado. El primer paso en la depuración del agua blanca (nombre común que reciben las aguas residuales de la industria del papel), consiste generalmente de un tratamiento preliminar, donde se realizan operaciones físicas para la eliminación de sólidos de gran tamaño, sólidos suspendidos. Con respecto a los materiales disueltos y coloides biodegradables se tienen las opciones de tratamiento biológico o tratamiento químico para su eliminación. El primero de ellos es mucho más económico que el segundo (Brindis-Olvera y col., 1993). Aunado a lo anterior, se observa que el agua residual de la industria de la celulosa y el papel causa efectos crónicos de toxicidad en peces, mismos que se pueden reducir con el tratamiento biológico y/o químico del agua y principalmente reduciendo o sustituyendo el uso de compuestos clorados. Al respecto se pueden usar enzimas, como la xilanasas termoestable, para blanquear la pulpa, lo que a la vez de reducir el costo del blanqueo (que es la operación más costosa durante el pulpeo kraft) reduce la concentración de compuestos tóxicos en las aguas residuales de esta industria (Gavrilescu y Chisti, 2005).

Figura 1.2 Proceso de producción de papel a partir de papel reciclado

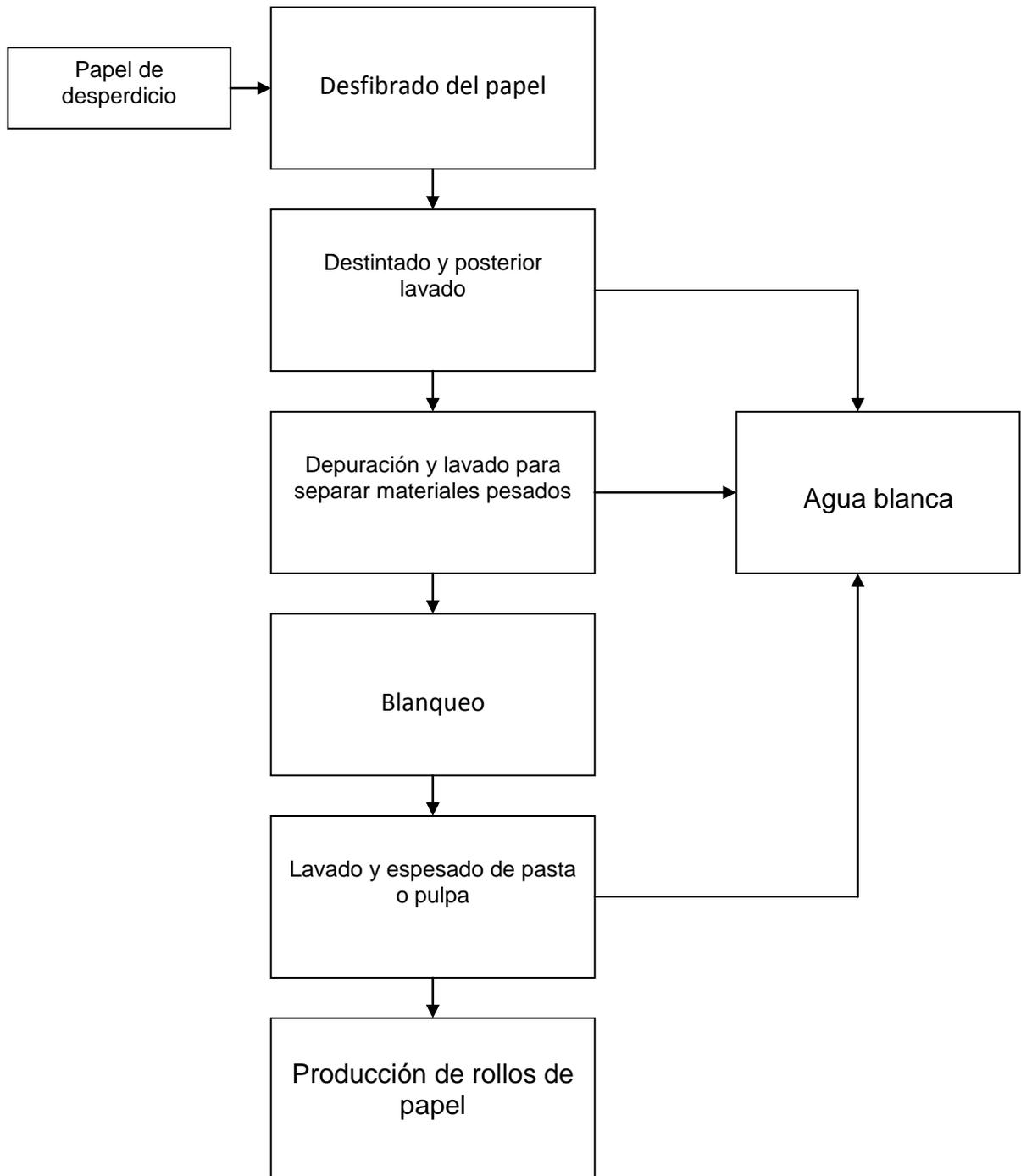


Tabla 1.2. Norma Oficial Mexicana NOM-002-SEMARNAT-1996

Parámetros	NOM-002-SEMARNAT-1996 Límites máximos permisibles	
	Prom. Mensual	Instantáneo
pH (unidades de pH)	5.5-10.0	5.5-10.0
Demanda bioquímica de oxígeno (mg/L)	30.0-200.0	30.0-200.0
Sólidos suspendidos totales (mg/L)	40-200.0	40.0-200.0
Sólidos sedimentables (mg/L)	5.0	10.0
Grasas y aceites (mg/L)	50.0	100.0

Existen diversos tratamientos biológicos aplicables a las aguas blancas, los cuales se pueden clasificar con base en la forma en que proliferan los microorganismos, homogéneamente suspendidos o adheridos a un material inerte. Dentro del tratamiento en reactores perfectamente mezclados (entendiéndose como aquellos en los que los microorganismos viven libres en el líquido), se pueden mencionar las lagunas de oxidación, con tiempos de residencia hidráulica de 20 a 60 días; las lagunas aireadas de estabilización, con tiempos de residencia de 5 a 10 días; los sistemas de lodos activados, con tiempos de residencia de 4 a 12 horas, dependiendo de la carga orgánica. De los anteriores tres procesos, el área requerida para su construcción disminuye del primero hacia el de los lodos activados y, tanto el costo de operación como la eficiencia, aumentan en el mismo sentido. Con respecto a los tratamientos en reactores de flujo pistón, con microorganismos que proliferan adheridos a soportes de diversos materiales, se tiene a los reactores empacados de lecho fijo, conocidos con el nombre de filtros percoladores, con tiempos de residencia de alrededor de 12 horas y eficiencias de 50% para los aerobios y de 60-70% para los anaerobios y a los reactores biológicos rotatorios, con tiempos de residencia de 6 a 24 h y eficiencias que van del 70 al 90% (Durán-de-Bazúa, 1994).

Las aguas residuales procedentes de la producción de celulosa presentan una demanda química de oxígeno relativamente alta, por lo que el tren de tratamiento recomendado incluye: tratamiento preliminar, un tratamiento biológico anaerobio y un tratamiento biológico aerobio, con lo cual se alcanzan eficiencias del 90% (Durán-de-Bazúa, 1994; Libernoche, 1983). Las aguas residuales procedentes de la producción de papel no tienen valores de DQO altas por lo que su tratamiento consiste de un

tratamiento preliminar y un tratamiento biológico aerobio, presentándose eficiencias del 70 al 90% dependiendo del tipo de tratamiento biológico empleado (Durán-de-Bazúa, 1994).

La Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, durante los años de 1980 a 1995, desarrolló un proyecto global de evaluación de diversas opciones de tratamiento para el agua residual procedente de plantas que producen papel a partir de fibras recicladas. Este proyecto incluyó el estudio en paralelo de sistemas anaerobios (lecho empacado y fluidificado) y aerobios (lodos activados, lagunas aeradas y discos rotatorios) y en serie con objeto de evaluar los sistemas que resultaran más promisorios. Con base en los resultados obtenidos se llegó a la conclusión de que del reactor de discos rotatorios, fue el tratamiento biológico más eficiente en la remoción de contaminantes de los sistemas aerobios probados.

El reactor de discos rotatorios consiste de una serie de discos construidos de un material inerte (por ejemplo poliuretano, acrílico o PVC) que giran sobre un eje y se encuentran sumergidos parcialmente en el agua residual a tratar (aproximadamente 40% del área superficial del disco) en tinas semicilíndricas. Una capa de 1 a 4 mm de biomasa se desarrolla sobre los discos (que puede ser equivalente a 2.5 a 10 g/L de biomasa en un sistema perfectamente mezclado). Conforme los discos giran, transportan una película de agua residual a través del aire, resultando en una transferencia de oxígeno y nutrientes. Fuerzas de corte causan que el exceso de biomasa se desprenda de la película y caiga en el líquido mezclado. Esta biomasa se recupera en un clarificador secundario. Las principales variables que afectan la eficiencia del tratamiento son (Durán-Domínguez-de-Bazúa, 1987; Eckenfelder, 1989): la velocidad rotacional, el tiempo de residencia hidráulica del agua residual, la puesta en marcha, la temperatura y el área del disco sumergida.

Como parámetros de diseño, frecuentemente se usan la carga orgánica, la carga hidráulica, la disponibilidad de sustrato limitante y el número mínimo de unidades o módulos a emplear (Álvarez y col., 1985).

### **Planteamiento del problema**

Uno de los pasos limitantes en el tratamiento del agua residual en los reactores de discos rotatorios es el tiempo en que se obtiene una biopelícula funcional, que es la responsable de llevar a cabo la depuración del agua residual. La principal característica de ella es que permanece inmovilizada de manera irreversible. Una biopelícula adherida de manera irreversible se logra mediante un proceso de aclimatación en el que inicialmente los microorganismos se adaptan a una vida sésil, por medio de cambios fenotípicos. En este punto, ellos se adhieren de manera reversible al soporte. Ésta adhesión es electrostática de baja energía, tal como los puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals. Es frecuente que cambios en el pH, fuerza iónica o temperatura provoquen la desadsorción al soporte (Casablanca, 1998), lo que retrasa la obtención de una película eficiente.

Se ha observado que la fase de aclimatación o lag ocurre previamente a un crecimiento máximo. Así que el estudio de diversos aspectos durante ambas etapas es importante en la optimización del funcionamiento del reactor de discos rotatorios (Kroukamp y col., 2010).

La identificación de las poblaciones bacterianas aerobias mesófilas cultivables durante la etapa exponencial, permitió diseñar un inóculo con el fin de que, posteriormente se investigue si el uso de éste tiene algún efecto sobre el tiempo de duración de la fase de aclimatación y por tanto en el logro de un reactor biológico rotatorio que trabaje de manera eficiente en un tiempo más corto.

Por tal motivo, la presente investigación tuvo los siguientes objetivos:

## **1.2 Objetivos generales**

- a) Diseñar un inóculo bacteriano, por medio de la identificación de las poblaciones aerobias mesófilas cultivables de una biopelícula tomada durante la fase de crecimiento exponencial en un reactor biológico rotatorio que trata aguas blancas de la industria del papel reciclado
- b) Analizar el efecto de la concentración de DQO soluble en la velocidad específica de crecimiento de las comunidades bacterianas aerobias mesófilas cultivables de la biopelícula de las cámaras 1 y 3 de un reactor biológico rotatorio, alimentado con aguas residuales de la industria del papel reciclado, por medio del análisis del crecimiento de las mismas en la fase exponencial.
- c) Estudiar el efecto de la concentración de los azúcares libres en el licor mezclado, en la densidad de bacterias aerobias mesófilas cultivables durante el crecimiento de la biopelícula, mediante el recuento de células viables.

Como parámetro de seguimiento se cuantificaron las concentraciones de:

- Celulosa y azúcares libres
- Demanda química de oxígeno soluble

## **2. CONCEPTOS FUNDAMENTALES**

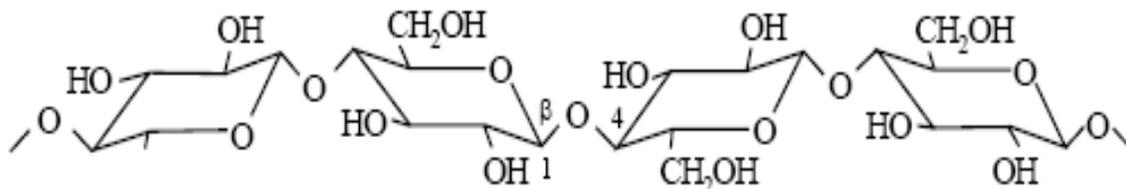
## 2.1. Biodegradación de la celulosa

El polisacárido estructural y constituyente de la pared celular de las plantas es la celulosa y es el biopolímero más abundante sobre la tierra (Claus, 1989; Lynd y col., 2002). Este polímero es el reservorio renovable natural más importante proveniente de la energía solar. La fuente más importante de celulosa proviene de las plantas leñosas. La fracción de las fibras de celulosa en las plantas terrestres varía de especie a especie y entre las partes de una misma planta. Así, por ejemplo, la corteza de los árboles y algunos granos de cereales pueden contener menos del 15 al 20% de fibras mientras que la fracción fibrosa del algodón puede ser mayor al 96% del total de biomasa seca (Reese y col., 1972). En las paredes celulares de las plantas las fibrillas de celulosa están densamente empaquetadas y se encuentran aglutinadas por una matriz de otros tres polímeros, la hemicelulosa, la pectina y la extensina (Lehninger, 1982). Aunque la composición química de la celulosa no varía con la fuente, su estado físico sí puede ser muy diferente. Factores tales como el contenido de humedad, grado de cristalinidad de la celulosa y grado de polimerización de la molécula, así como su asociación con la lignina y la hemicelulosa, puede afectar mucho el valor y la utilidad de una fuente de celulosa (Delfín-Alcalá, 2002). En la Tabla 2.1 se muestra el contenido promedio de celulosa de diferentes materiales.

Tabla 2.1. Contenido de celulosa de diferentes materiales (Conner, 1995)

Material	Contenido promedio de celulosa (%)
Productos de madera	45
Pulpa de madera	95
Heno, todas las clases	35
Algodón	91

La celulosa es un polímero lineal de la D-glucosa que posee enlaces glucosídicos  $\beta(1-4)$ . Los enlaces glucosídicos actúan como grupos funcionales y los tres grupos OH juntos determinan las propiedades químicas de la celulosa. Cualquier reacción química ocurre en esos sitios:



El grado de polimerización de las cadenas individuales es de aproximadamente 1,500 a 15,000 monómeros, dando una masa molecular de  $2.5 \times 10^5$  a  $2.5 \times 10^6$  de una longitud probable de 7  $\mu\text{m}$ . La celulosa nativa tiene más de 10,000 residuos  $\beta$ -anhidro glucosas formando una larga cadena molecular. La longitud total de esta molécula es de aproximadamente de 5  $\mu\text{m}$  debido a que la longitud de cada unidad de anhidro glucosa es de 5.15 Å, mientras la  $\alpha$ -celulosa contiene de 10 a 15  $\times 10^3$  unidades de glucosa por molécula, la  $\gamma$ -celulosa contiene sólo menos de 10 unidades de glucosa. El agregado estructural más pequeño de las cadenas de celulosa es una fibra, llamada fibrilla elemental. Estas fibrillas tienen zonas cristalinas alternadas con zonas amorfas. En promedio, la zona cristalina mide  $1,000 \pm 200$  Å y la zona amorfa mide de 300 a 400 Å (Goksoyr y Eriksen, 1980).

La habilidad para degradar celulosa está ampliamente distribuida entre muchos géneros del dominio Bacteria y de hongos del dominio Eukarya y se tiene el reporte de la especie celulolítica *Methanobrevibacter* sp., en el dominio Archaea. Las bacterias celulolíticas se encuentran principalmente en el Phylum VIII: Firmucutes, de los órdenes I: Clostridiales, I: Bacillales y V: Actinomycetales (Lynd y col., 2002; Madigan y col., 2004). Los géneros y especies de bacterias que se han identificado con actividad celulolítica son (Lynd y col., 2002; Gupta y col., 2012; Gautam y col., 2012; Huang y col., 2012):

Phylum VIII Firmucutes del orden V Actinomycetales:

*Cellulomonas*, como *C. acidula*, *C. aurogena*, *C. biazotea*, *C. cellasea*, *C. fimi*, *C. flavigena*, *C. galba*, *C. gelida*, *C. pusilla* y *C. uda*, *Streptomyces cellulolyticus*, *Actinomyces* sp; dentro del orden I Clostridiales, se tienen a *Clostridium thermocellum*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Clostridium cellulovorans*, *Microbispora bispora*, *Thermomonospora* sp., *Thermobifida fusca*, *Thermobifida* sp y *Corynebacterium* sp.

Orden I Bacillales se tiene a *Bacillus* sp., y a *Bacillus subtilis*

Phylum VII Proteobacterias se tienen a las  $\alpha$ -Proteobacterias, tales como *Rhizobium*, *Ochrobactrum*, *Devosia* sp., *Ensifer* sp., *Labrys* sp. y *Paracoccus* sp.

$\beta$ -Proteobacterias, como *Variovorax* sp.

$\gamma$ -Proteobacterias, como *Cellvibrio*, *Vibrio* sp., *Acinetobacter anitratus*, *Moraxella (Branhamella)* sp., *Citrobacter* y *Pseudomonas* sp.

En el Phylum XI Fibrobacter, se tiene a: *Fibrobacter succinogenes*

El Phylum XII Bacteroides tiene a: *Acetivibrio cellulolyticus*, *Bacteroides succinogenes* y *Bacteroides cellulosolvens*

El Phylum XIII Flavobacterias tiene a: *Cytophaga hutchinsonii* y a *Sporocytophaga myxococcoides*. (Gottschalk, 1986; June y col., 2007; Lynd y col., 2002 y Rybeck y col., 1989).

Del Phylum XIV Sphingobacteria se tiene a *Cytophaga sp.*

*Cellfalcicula* también es citada como bacteria con actividad celulolítica. Dicha especie está en la Sección de las  $\gamma$ -Proteobacterias (Ioan-Valentin Moise y col., 2009); sin embargo, en el manual Bergey no se encuentra el género (Bergey y col., 1993).

Los hongos son los principales responsables de la descomposición de la celulosa en la naturaleza (Claus, 1989). Los que despliegan actividad bioquímica en la ruptura de sustancias celulósicas incluyen desde los hongos más primitivos, como las especies del grupo Chytridomicetes, hasta los del grupo de los Basidiomicetes. Los géneros encontrados con actividad celulolítica son: del grupo Chytridomicetes, *Neocallimastix*, *Piromyces*, *Caecomyces*, *Orpimomyces* y *Anaeromyces*; del grupo Zygomycetes, solo algunos miembros del género *Mucor*; del grupo Ascomycetes a *Bulgaria*, *Chaetomium* y *Helotium*; del grupo Basidiomicetes a *Coriolus*, *Phanerochaete*, *Poria*, *Schizophyllum* y *Serpula*; del grupo Deuteromicetes a *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Myrothecium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma koningii* y *Trichoderma reesei* (Lynd y col., 2002).

Lynd y col., (2002) afirman que las bacterias anaerobias que degradan celulosa tienen un sistema de enzimas, conocido como complejo multi enzimático, capaz de catalizar dos o más actividades enzimáticas (Kyte, 2007). Este complejo está contenido en los celulosomas, que son estructuras presentes fuera de la pared celular (Caspi y col., 2009). También, se ha encontrado que la principal diferencia entre las celulasas libres y los celulosomas es que éstos últimos contienen un dominio de anclaje que ayuda a la integración de la enzima dentro del complejo celulósico (Hernández y col., 1999). De forma diferente, las bacterias y hongos aerobios utilizan la celulosa por medio de la excreción de grandes cantidades de celulasas extracelulares, que en los casos de los hongos filamentosos y las actinobacterias son vertidos por medio de hifas en cavidades dentro de los materiales celulósicos. Ocasionalmente, también se pueden encontrar celulosomas en la superficie de la célula aerobia (Lynd y col., 2002).

La hidrólisis enzimática de la celulosa es lenta debido a la estructura compacta de la molécula, lo cual limita el acceso de las enzimas de gran tamaño. Al incrementarse el grado de porosidad de los materiales celulósicos se incrementa el acceso de las enzimas a la estructura de la celulosa (Jurasek, 1979). Las características estructurales de los materiales celulósicos que determinan la susceptibilidad a la degradación enzimática son:

- tamaño y difusividad de las moléculas enzimáticas en relación con el tamaño y propiedades superficiales de los capilares y el espacio entre microfibrillas y las moléculas de celulosa en la región amorfa,

- el grado de cristalinidad y grado de polimerización de la celulosa y
- la naturaleza de las sustancias con las cuales la celulosa se asocia.

Diversos estudios han revelado que la celulosa amorfa es degradada de 5 a 10 veces más rápido que la celulosa altamente cristalina, ya sea por enzimas de hongos o de bacterias del rumen (Lynd y col., 2002), debido a que dicha celulosa expone poros por los cuales las celulasas tienen acceso al sustrato. De manera contraria, en la celulosa cristalina, que no contiene poros o contiene muy pocos, el ingreso de las celulasas está muy limitado, por lo que la velocidad de reacción será casi igual a cero (op.cit).

Los sistemas enzimáticos que actúan sobre la celulosa, también lo hacen sobre la hemicelulosa y son coproducidos por los microorganismos celulolíticos. Se han encontrado tres principales tipos de actividades enzimáticas, que son:

- 1) Endoglucanasas: 1,4-β-D-glucan-4-glucanohidrolasas: es una enzima con una estricta especificidad por la ruptura de los enlaces β-1,4-glucosídicos y rinde cadenas de celulosa más cortas (Pham y col., 2011)
- 2) Exogluconasas: que incluyen 1,4-β-D- glucanglucanohidrolasas (celodextrinasas) y 1,4-β-D-glucan celobiohidrolasas (celobiohidrolasas), actúan en los extremos reductores y no reductores de las cadenas de celulosas, liberando como productos ya sea glucosas (celodextrinasas) o celobiosa (celobiohidrolasas) y
- 3) β-glucosidasas o β- 1,4-glucosidasa: hidroliza celodextrinas solubles y celobiosa a glucosa.

Una característica general, de la mayoría de las celulasas es que poseen una estructura modular que incluye un módulo catalítico y otro de anclaje al carbohidrato. La presencia del módulo de anclaje al carbohidrato es importante para la iniciación y procesamiento de las Exogluconasas (Lynd y col., 2002).

Con base en estudios enzimáticos de *T. viride* se propone el siguiente esquema de la degradación secuencial de la celulosa en glucosa (Gottschalk, 1986):

- 1) Celulosa nativa  $\xrightarrow{\text{Endo-}\beta\text{-1,4-glucanasas}}$  Celulosa a (2-2)
- 2) Celulosa a  $\xrightarrow{\text{Exogluconasas}}$  Celobiosa (2-3)
- 3) Celobiosa  $\xrightarrow{\beta\text{-glucosidasa}}$  2 Glucosas + celulosa nativa n –2 (2-4)

Las consideraciones básicas de este modelo son:

- 1) Las regiones de baja cristalinidad en la fibra de celulosa son atacadas por las endoglucanasas y se crean extremos de cadena libre.

- 2) Las exoglucanasas inician la degradación de los extremos de cadenas libres por remoción hidrolítica de unidades de celobiosa y celotriosa.
- 3) Las celobiosas y celotriosas son hidrolizadas a glucosa a través de la acción de una  $\beta$ -glucosidasa.

Las características de cada categoría de celulasa se resumen a continuación:

Endo- $\beta$ -1,4-glucanasas: actúa principalmente en la región amorfa de las fibras de celulosa. El efecto es un rápido descenso en el grado de polimerización. El aislado de la Endo- $\beta$ -1,4-glucanasas tiene propiedades comunes con las glucoproteínas y tiene un alto contenido de aminoácidos ácidos.

Exogluconasas (celodextrinasas y celobiohidrolasas): Esta categoría de enzimas remueve una unidad de glucosa del extremo no reductor de la cadena de celulosa. Su efecto es un rápido incremento en los azúcares reductores y un lento descenso en el grado de polimerización.

Las  $\beta$ -glucosidasas son enzimas cruciales que catalizan la hidrólisis de celobiosa a glucosa, en la biodegradación de materiales celulósicos. También actúan en cadenas cortas de celo-oligosacáridos para liberar glucosa. Sin embargo, la velocidad hidrolítica disminuye apreciablemente con un aumento en la longitud de la cadena de celulosa. La  $\beta$ -glucosidasa de *T. viride* tiene una masa molecular de 47,000 y no contiene carbohidratos.

Se ha encontrado que la regulación de la síntesis de celulasas se caracteriza por dos procesos: el primero es por medio de un sistema represor-inductor, controlado por un mecanismo de retroalimentación ("*feedback*") y el segundo es por represión por catabolito. En el primer caso, la concentración de la celobiosa puede inducir o reprimir la síntesis de celulasas y, en el segundo, la presencia de glucosa detendrá la producción de tales enzimas. Sin embargo, la inhibición por catabolito varía entre las especies de microorganismos, por ejemplo la glucosa inhibe la producción de  $\beta$ -glucosidasas en *T. ressei*, mientras que muchas especies de *Aspergillus* toleran mayores concentraciones de glucosa (Lynd y col., 2002). Mandels y Reese (1963) observaron que las celulasas se inhiben con la presencia de halógenos, metales pesados y detergentes.

El mantenimiento de un cultivo continuo celulolítico es difícil debido a que la velocidad de reacción disminuye paulatinamente conforme aumenta el porcentaje de celulosa cristalina, de difícil degradación (Mandels y col., 1975).

## 2.2. Formación de la biopelícula

“Un biopelícula representa una comunidad de microorganismos cuya existencia se basa en la interdependencia” (Davey y O’Toole, 2000) y consiste de células inmobilizadas en un soporte y frecuentemente embebidas en una matriz de polímeros orgánicos de origen microbiano (Characklis y Marshall, 1990; Golla y Overcamp, 1990; Loosdrecht y col., 2002). Son una familia importante de ecosistemas heterogéneos cuyos productos finales son el resultado del desarrollo en tiempo y espacio de una comunidad de especies microbianas (Wimpenny y col., 1984), donde su desarrollo es mediado por factores mecánicos, bioquímicos y genéticos (Sawhney y Berry, 2009). Por medio de la convivencia en una comunidad, los microorganismos obtienen un beneficio adicional de la versatilidad fenotípica de sus vecinos (Davey y O’Toole, 2000).

Las células de la biopelícula se diferencian de las suspendidas en el líquido (células planctónicas), en que excretan polímeros extracelulares, sus velocidades de crecimiento son reducidas y requieren la activación o inhibición de genes específicos durante la formación de la biopelícula (Fletcher y Loeb, 1979; Donlan, 2002; Figura 2.1).

El fenómeno de formación de una biopelícula depende de las interacciones físicas y químicas entre el soporte, la superficie de las bacterias y el polímero adhesivo. También intervienen factores tales como la concentración del cultivo y la movilidad bacteriana (Donlan, 2002). Molin y colaboradores (1982) afirman que la unión y el desarrollo de la biopelícula dependen en gran parte de las características genéticas de la cepa bacteriana. Sin embargo, también es importante el estatus fisiológico de la célula que, a su vez depende de parámetros ambientales, como por ejemplo, condiciones nutrimentales, concentración de cationes, pH y temperatura (Donlan, 2002; Fletcher, 1977; Wood, 1980). Algunas variables importantes en la unión de las células y la formación de la biopelícula se muestran en la Tabla 2.2.

Characklis y Marshall (1990) y Davey y O’Toole (2000) establecieron que la acumulación de la biopelícula es el resultado neto de los siguientes procesos físicos, químicos y biológicos (Figura 2.3.):

- 1) Las moléculas orgánicas se transportan del líquido al soporte, donde algunas de ellas se adsorben, considerándose así que el soporte está acondicionado.
- 2) Una fracción de células microbianas se transportan del líquido al soporte.
- 3) Una fracción de las células microbianas que llegaron al soporte se adsorben a él de una forma reversible.
- 4) La desorción puede ser el resultado de las fuerzas de corte del fluido, así como también de factores físicos, químicos o biológicos.
- 5) Una fracción de las células adsorbidas reversiblemente permanece inmobilizadas durante un período de tiempo más largo, quedando irreversiblemente adsorbidas.

En la adsorción inicial al soporte, dependiendo del organismo involucrado, existen tanto estructuras como moléculas involucradas, pudiendo ser: flagelos, pili y proteínas fuera de la membrana celular.

- 6) Las células adsorbidas irreversiblemente se desarrollan a expensas de los nutrientes del líquido, incrementándose sus poblaciones en la biopelícula. Inicialmente formando una monocapa y posteriormente formando micro colonias, que al madurar, aparecen envueltas en polímeros extracelulares. Entonces, la acumulación de la biopelícula aumenta debido al metabolismo microbiano a expensas de la energía de los nutrientes del líquido.
- 7) Una porción de la biopelícula se desune y reincorpora al líquido.

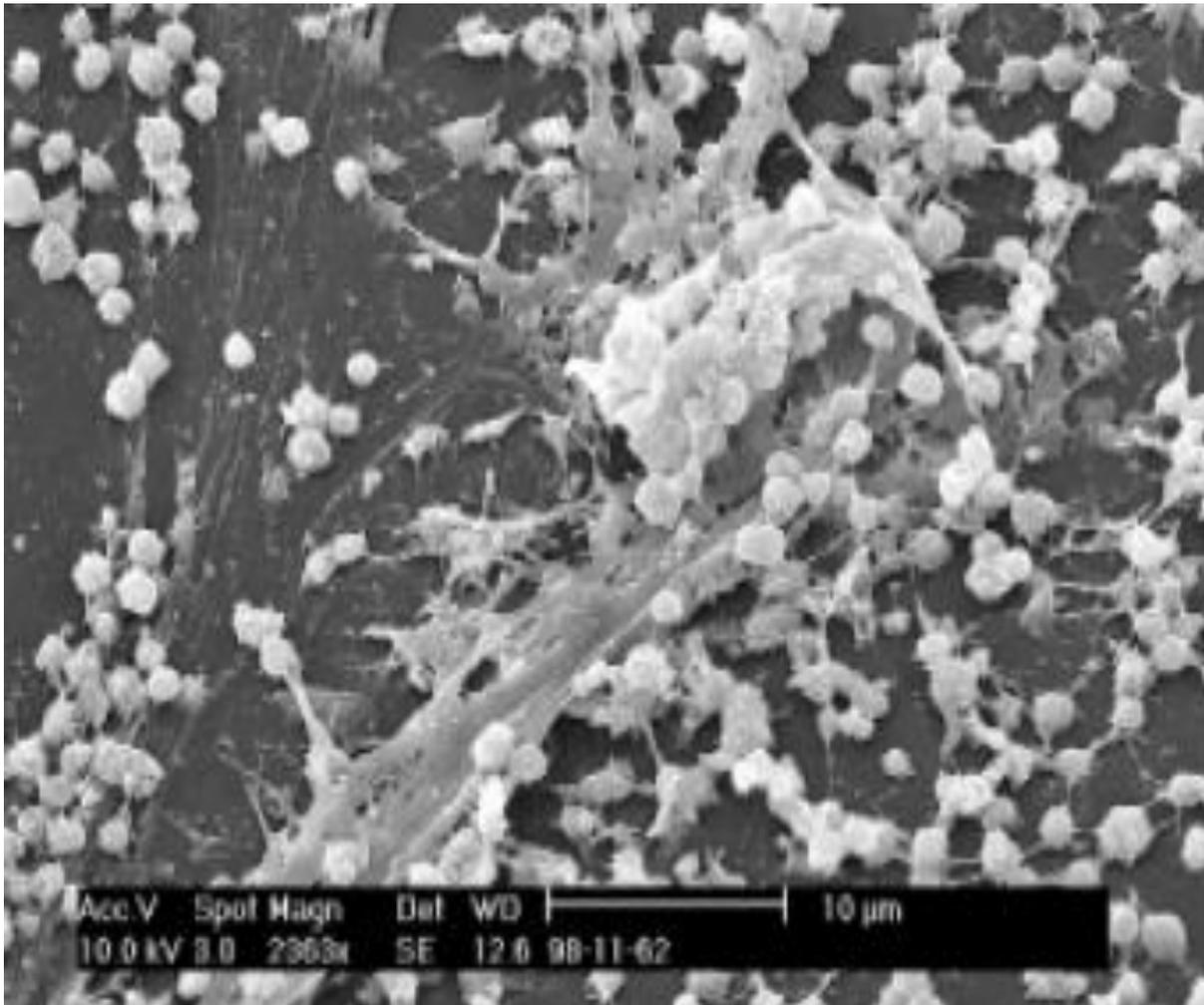


Figura 2.1. Biopelícula de *Staphylococcus* tomada en microscopio electrónico de barrido, observándose polímeros extracelulares que unen las células unas a otras y a la superficie (Donlan, 2002)

**Tabla 2.2. Variables importantes en la adhesión de las células y la formación de la biopelícula (Donlan, 2002; Sawhney y Berry, 2009; Toutain y col., 2004; Vejborg y Klemm, 2009)**

Propiedades del sustrato o soporte	Propiedades del líquido	Propiedades de la célula
Textura o rugosidad	Velocidad del flujo	Superficie celular hidrófoba
Soporte hidrófobo	pH	Fimbrias y sus diferentes tipos de adhesinas Pili y movilidad tipo deslizamiento por saltos (twitching motility)
Película acondicionada	Temperatura	Flagelos y habilidad para nadar (gliding)
Tipo de material: PVC, PE, acero inoxidable	Concentración de cationes	Excreción de polímeros extracelulares
	Presencia de agentes antimicrobianos	Tipos de proteínas de autotransporte

Según Schroll y col. (2010) la adhesión a las superficies es el primer paso esencial en la formación de la biopelícula y, posteriormente, las adhesinas de las fimbrias juegan un papel importante en los pasos subsiguientes de la formación de la biopelícula, por ejemplo promoviendo el contacto célula – célula.

En última instancia, son los parámetros ambientales los que las bacterias detectan y son los que activan la transición de una vida planctónica a una vida sobre una superficie. Esos parámetros ambientales (como la concentración de nutrientes, tipo de fuente de carbono disponible, osmolaridad, pH, disponibilidad de hierro, tensión del oxígeno y la temperatura) varían de organismo a organismo (Davey y O’Toole, 2000; O’Toole, 2003).

La formación de la biopelícula frecuentemente toma la forma de una curva sigmoidea (Bryers y Characklis, 1981; Figura 2.2), la cual se divide arbitrariamente en tres etapas: eventos iniciales o inducción, acumulación exponencial (o “logarítmica”) y estado estacionario. Los procesos individuales pueden ser agrupados en transporte, transferencia interfacial y procesos de transformación (Characklis y Marshall, 1990).

A continuación se mencionarán algunos conceptos básicos de dichos procesos.

### 2.2.1. Transporte y adsorción de moléculas orgánicas: Acondicionamiento del soporte

El transporte de moléculas y pequeñas partículas ( $< 0.01 - 0.1 \mu\text{m}$ ) en flujo laminar ocurre como un proceso de difusión molecular. En flujo turbulento, la ecuación debe ser modificada, para incluir transporte turbulento.

En comparación con el transporte de grandes partículas tales como las bacterias, el transporte de moléculas y pequeñas partículas es muy rápido. Consecuentemente, se considera que la adsorción de ellas en una película orgánica ocurre instantáneamente.

La adsorción de una película orgánica al soporte, causa cambios en las propiedades de este último, pudiendo ser: la hidrofobicidad, el potencial zeta, tensión superficial crítica, la carga neta y la energía superficial. Las propiedades del soporte también influyen en la velocidad de adsorción de la película orgánica. Entre estas propiedades se puede mencionar la absorción del agua, la tensión superficial, la movilidad electroforética y el tipo de material.

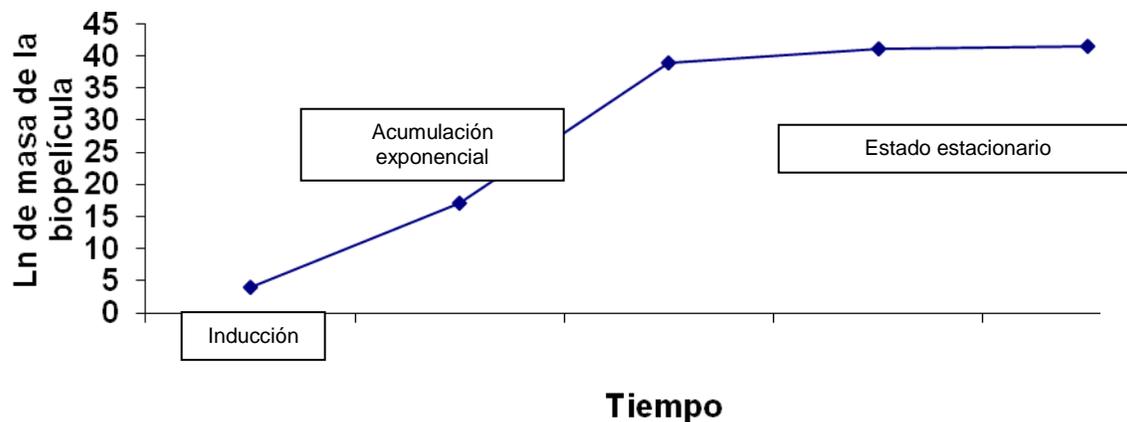


Fig. 2.2. La acumulación de la biopelícula frecuentemente toma la forma de una curva sigmoideal

La película orgánica que acondiciona al soporte, al parecer, está constituida de polisacáridos y glicoproteínas. Esta película orgánica no permanece ahí indefinidamente, ya que continuamente se están intercambiando por otras moléculas. Moléculas orgánicas con masas moleculares altas se adsorben más fuertemente al soporte, ya que cuentan con múltiples sitios de unión (Cohen-Stuart y col., 1980).

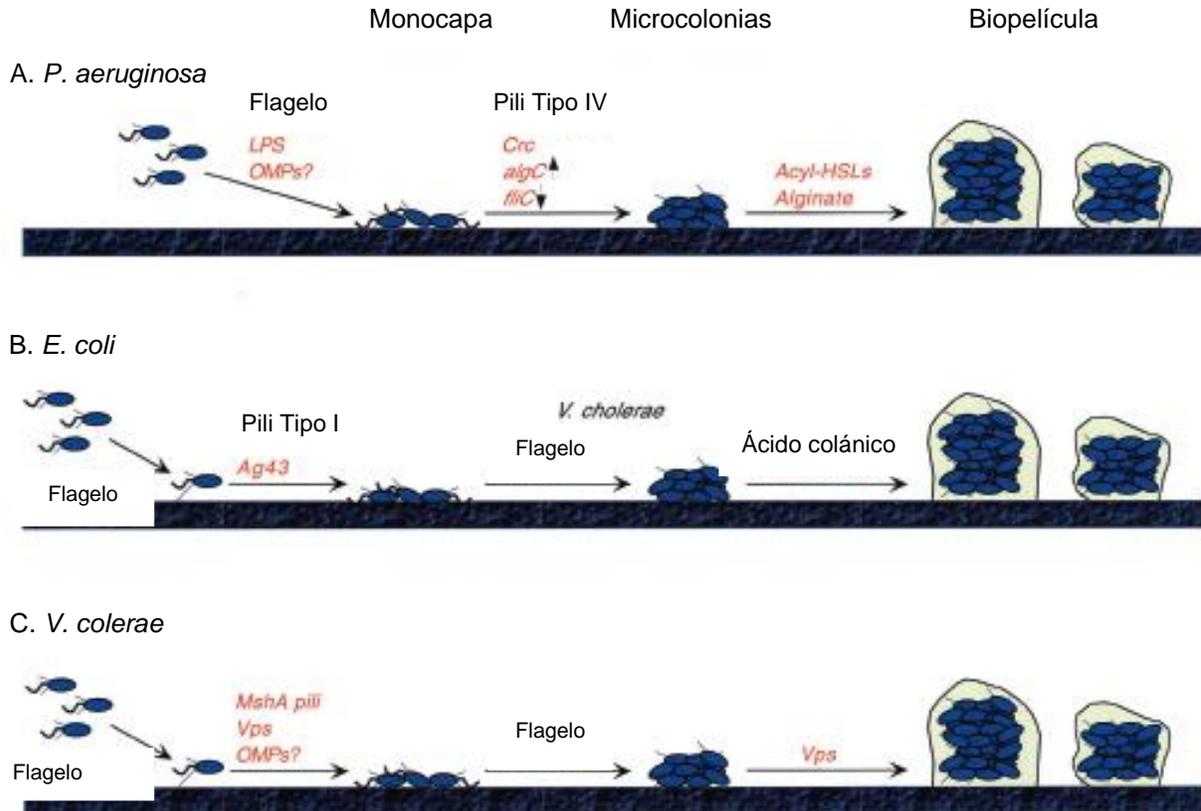


Figura 2.3. Desarrollo de biopelícula en organismos Gram-negativos (Tomado de Davey y O'Toole, 2000).

La Figura 2.3 representa tres modelos de las primeras etapas de la formación de la biopelícula en tres organismos, *P. aeruginosa*, *E. coli* y *V. cholerae*. A) En *P. aeruginosa* se requiere de flagelos para llevar a la bacteria a la proximidad de la superficie y de la interacción inicial mediada por LPS (componente importante de la membrana externa), con un posible papel para las proteínas de la membrana externa (PME). Una vez que las bacterias están en la superficie en una monocapa, se requiere de los Pili tipo IV, para llevar a cabo un movimiento brusco y agregarse en forma de micro colonias. La producción de Pili es mediada en parte por señales nutricionales vía Crc (gen que codifica para la proteína estructural de los Pili tipo IV y un factor accesorio requerido para el ensamblaje de los Pili en *P. aeruginosa*). En esta etapa existe un aumento en la regulación del gen que sintetiza alginato y una baja regulación del de la síntesis de flagelos. Para la formación de una biopelícula madura se requiere de la producción de moléculas que señalan el contacto célula célula (Acil-HSLs). También el alginato juega un papel en este proceso. B) En *E. coli* se requiere del movimiento mediado por flagelos tanto para aproximarse como para moverse a través de la superficie. Las interacciones de los organismos con las superficies requieren de los Pili Tipo I y de la proteína de la membrana externa Ag43. Finalmente, se requiere de EPS (exo polisacáridos), que se conoce como ácido colánico, para que *E. coli* desarrolle una biopelícula madura. C) *V. cholerae*, a semejanza de *E. coli*, utiliza flagelos para aproximarse a la superficie. Los pili MshA y posiblemente una o más proteínas de la membrana externa, se requieren para unirse a las superficies. Al parecer la unión inicial a la superficie es estabilizada por EPS. Vps se refiere a un EPS de *V. cholerae*.

### **2.2.2. Transporte de células microbianas al soporte**

En líquidos donde las concentraciones de moléculas orgánicas, nutrientes y células bacterianas son bajas, el transporte de células microbianas al soporte puede ser el paso que controle la velocidad de acumulación de la biopelícula.

El transporte de las células microbianas está influido por el régimen del flujo del fluido. En un flujo laminar, el transporte de las bacterias se da por fuerzas gravitacionales (sedimentación), por difusión browniana o por el movimiento de ellas mismas. La movilidad es el proceso más importante en microorganismos pequeños (1-4  $\mu\text{m}$ ). La difusión de las células bacterianas en un flujo laminar se describe por la primera ley de Fick. Esta ley propone que el flujo difusivo es proporcional al gradiente de concentración y es aplicable a compuestos solubles, grandes moléculas o pequeñas partículas, tales como las células microbianas (Characklis, 1984).

Finalmente, no se tienen evidencias absolutas en lo relativo al tiempo en que ocurren los procesos de adsorción de moléculas y de células microbianas, pero al parecer, estas últimas se adsorben más fácilmente a un soporte acondicionado (Characklis, 1984).

Dentro de un régimen turbulento, las grandes partículas suspendidas en el líquido se transportan al soporte, principalmente por las fuerzas dinámicas del fluido. El flujo de las partículas a la superficie aumenta con un incremento en la concentración de partículas. Sin embargo, el flujo de la partícula también depende de sus propiedades físicas, como el tamaño, la forma y la densidad y se ve influenciado por otras fuerzas conforme la partícula se acerca al soporte.

### **2.2.3. Adsorción de células al soporte**

La adsorción de células al soporte es un proceso de transferencia interfacial y ocurre en dos etapas: 1) Adsorción reversible seguida por 2) Adsorción irreversible. La adsorción reversible es una interacción rápida inicial de las células con el soporte. En este estado, las células aún pueden mostrar movimiento browniano. La interacción incluye fuerzas entre el soporte y las células, tales como, fuerzas de London-van der Waals, interacciones electrostáticas e interacciones estéricas. Estas fuerzas son característicamente de baja energía de adsorción, con un rango de valores de 0.4 a 40  $\text{kJ mol}^{-1}$ . Los flagelos y "Pili" favorecen la adsorción de las células al soporte, sobre todo a soportes de hidrocarburos (hidrofóbicos). Por último, la reversibilidad también puede reflejar una baja especificidad entre el soporte y las células (Characklis, 1984).

Por otro lado, se considera que la adsorción irreversible es una unión permanente al soporte, frecuentemente mediada por polímeros extracelulares. Se caracteriza por un alto calor de adsorción del orden de 40 a 400  $\text{kJ mol}^{-1}$ , incluye interacciones dipolo-dipolo, dipolo-dipolo inducido, ion-dipolo, puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. Al parecer, los polímeros extracelulares juegan un papel importante en

la adsorción irreversible, aunque tales sustancias no son indispensables para que ocurra el fenómeno. Entre estas sustancias están los polisacáridos, los lípidos y las proteínas (Characklis, 1984).

La velocidad de adsorción se incrementa con aumentos en la concentración de las células en el líquido y en la velocidad del fluido debido a la cada vez más grande velocidad de transporte celular hacia el soporte. Por otro lado, la velocidad de desorción está muy relacionada a la velocidad de adsorción, a las fuerzas hidrodinámicas del fluido y a la movilidad de las células (Powell y Slater, 1982).

#### **2.2.4. Procesos de transformación**

Los procesos de transformación son aquellos en los que ocurren reacciones químicas o bioquímicas. Después de que las células se adsorben al soporte, los procesos metabólicos son importantes y así sobreviene la colonización.

Se pueden identificar cuatro procesos fundamentales que son: 1) Multiplicación celular, 2) Formación de productos, 3) Mantenimiento y/o decaimiento endógeno, y 4) Muerte y/o lisis. Cualquiera de ellos puede ocurrir en la biopelícula a cualquier tiempo.

Seis procesos gobiernan el estado estacionario de una biopelícula, mismos que se nombran a continuación (tomado de Golla y Overcamp, 1990):

1. La difusión del sustrato del líquido a la superficie de la biopelícula,
2. La utilización del sustrato,
3. Difusión del sustrato dentro de la biopelícula,
4. Multiplicación de las bacterias,
5. Pérdida de biomasa debido al decaimiento y fuerzas de corte, y
6. Transporte de sustrato dentro del reactor.

Dentro de la pérdida de la biomasa debido al decaimiento y fuerzas de corte, Bryers (1988) identificó 5 categorías que explican las pérdidas, que son: erosión, descamación (*sloughing*), intervención humana, depredación (*grazing*) y abrasión. Mencionando que ellos son los principales mecanismos para balancear el crecimiento de la biopelícula, lo que permite que el grosor de la biopelícula alcance un estado pseudo – estacionario (Rittmann y col., 1992).

En el Apéndice VII se presenta información adicional relativa a las propiedades y composición de la biopelícula.

#### **2.2.5. Cinética de crecimiento de biopelículas**

La velocidad de formación de una biopelícula depende de la disponibilidad de los nutrimentos para los microorganismos, lo cual depende a su vez de la velocidad a la que son transportados a través de la estructura porosa y canales dentro de ella.

Estas estructuras dentro de la biopelícula dependen de las condiciones en las cuales se formó, como por ejemplo la velocidad del fluido o gasto, las fuerzas de corte, la carga orgánica, el tipo de reactor y de microorganismos. Muchos autores han propuesto que los sustratos son transportados a través de la película por medio de difusión molecular, mostrando una reacción de primer orden en una biopelícula en estado estacionario (Vieira y Melo, 1999).

El modelo primario que describe a una biopelícula es la curva de crecimiento sigmoideal y en ésta se observan cuatro parámetros (Figura 2.4.): la fase lag  $\lambda$  o de aclimatación, la velocidad de crecimiento exponencial  $\mu_{max}$  (fase log), la concentración de inóculo  $N_0$ , y la densidad celular máxima  $N_{max}$ . La velocidad de crecimiento exponencial se define como la tangente de la línea en la fase exponencial. La fase lag es el tiempo en el cual la línea extrapolada de la tangente máxima se cruza con la línea del nivel del inóculo (Devlieghere y col., 2009).

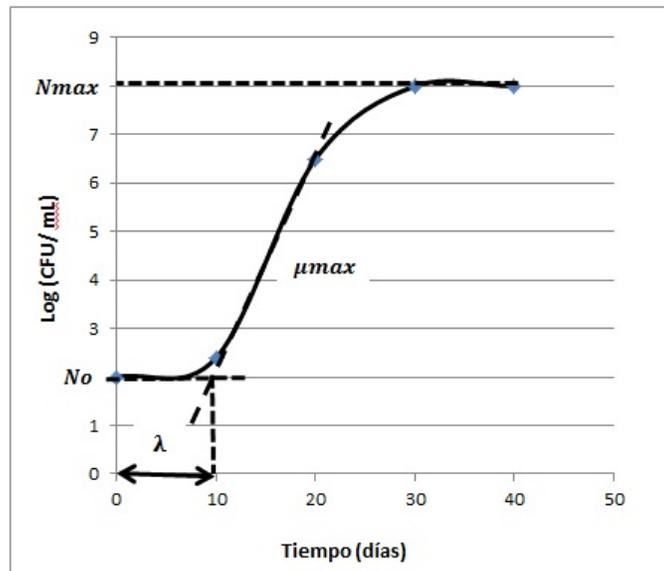


Figura 2.4. Curva de crecimiento sigmoideal graficada contra tiempo (diseño tomado de Devlieghere y col., 2009)

La velocidad de crecimiento de la biopelícula ( $\mu$  de la biopelícula) se obtiene determinando la pendiente de la línea que se obtiene al graficar el logaritmo natural de las unidades formadoras de colonias/ unidad de área, UFC, contra el tiempo, durante la etapa exponencial:

$$\mu = \frac{\ln X_{t2} - \ln X_{t1}}{t2 - t1}$$

donde  $X_{t2}$  es la producción de UFC por unidad de área en el tiempo  $t2$  y  $X_{t1}$  es la producción de UFC por unidad de área en el tiempo  $t1$ . La  $\mu$  de la biopelícula es la

velocidad de crecimiento neto que comprende la adsorción, el crecimiento celular y la pérdida de biomasa activa hacia el licor mezclado por medio de los procesos de desprendimiento y erosión (Kroukamp y col., 2010).

### **2.2.6. Metodología para el estudio de biopelículas**

Antes de 1994 las biopelículas sólo se podían estudiar usando microscopios ópticos y electrónicos y los resultados de esos estudios las mostraban como un agregado uniforme de células contenidas dentro de una matriz de polímeros extracelulares, interactuando con el líquido que las rodeaba. Actualmente, mediante la microscopía confocal y el uso de microsensores para medir el oxígeno disuelto, se ha obtenido una imagen diferente, considerándoseles como un conglomerado heterogéneo de estructuras organizadas en microcolonias, soportadas por una matriz de polímeros extracelulares, conectadas entre sí por canales ocupados por líquido en movimiento, que interactúa con el líquido que la rodea (González y López, 2007).

En general se emplean cuatro métodos para la observación directa de biopelículas: 1) visualización de cultivos por microscopía confocal, 2) cultivos estáticos en placas microtiter, 3) obtención de biopelículas flotantes en interfase líquido aire, y 4) visualización de la morfología de las colonias en la superficie de medios sólidos (Branda y col., 2005). También, se tienen los métodos de observación indirecta como la cuantificación bacteriana y el uso de indicadores del metabolismo (Donlan y Costerton, 2002).

La microscopía confocal al combinar el laser, las imágenes confocales, objetivos apocromáticos y el procesamiento de imágenes por ordenador, genera visualizaciones tridimensionales de lo observado, con lo que se puede analizar la arquitectura, las interacciones entre bacterias y se cuantifica el contenido de células viables, tanto de procariontas como de eucariotas (Faleiro, 2010; Martín-Cereceda y col., 2001). En la cuantificación de la formación de la biopelícula en placas microtiter se ha empleado mucho la tinción con cristal violeta como indicador de la biomasa total para distinguir entre diferentes cepas de *E. coli* y mutantes con adhesión alterada (Pitts y col., 2003).

Los métodos indirectos de cuantificación de microorganismos adheridos a superficies presentan etapas con rascados, agitación o sonicación de los soportes y su posterior dilución y recuento. Las principales limitaciones son que no se permite el estudio de la estructura de la biopelícula y que durante el raspado se pueden dañar las células viables. Por último, en este método existe un sesgo en el conteo de las células viables, debido a que no todos los microorganismos de la biopelícula son cultivables (Faleiro, 2010).

Un método indicador del metabolismo de la biopelícula usado por Kroukamp y col. (2010) fue el de la generación de CO<sub>2</sub> y encontraron que las ventajas de usar este método son que no destruye la biopelícula y que representa la actividad metabólica de ella en tiempo real.

### 2.3. Reactor biológico rotatorio (biodisco ®)

El reactor biológico rotatorio es usado para tratar aguas negras de ciudades de más de 5,000 habitantes y sus aplicaciones en el tratamiento de diversos efluentes industriales son muy amplias (Álvarez, 1986; Álvarez y col., 1985; Griffin y Findlay, 2000). Los intervalos típicos para las características del efluente a tratar en un reactor biológico rotatorio (RBR) se muestran en la Tabla 2.3. La biomasa se presenta simultáneamente en la forma de películas adheridas y de flóculos en suspensión (Metcalf y Eddy, 1991; Ramalho, 1991; Figura 2.5.). El biodisco consiste de una serie de discos circulares espaciados cuyo material puede ser el poliestireno, cloruro de polivinilo o acrílico, montados en un eje que gira dentro de una tina semicilíndrica donde está contenida el agua residual. Los discos, por lo general están sumergidos en el agua residual un 40% de su diámetro. Entonces, con el movimiento rotatorio aproximadamente el 95% de su área superficial está inmersa alternativamente en el agua y en el aire, lo que promueve la disponibilidad de nutrientes y la transferencia de oxígeno hacia los microorganismos que crecen adheridos a los discos (op.cit.). El eje gira continuamente a una velocidad comprendida entre 1 y 3 rpm. A partir de la puesta en marcha del reactor se van adsorbiendo numerosas colonias de microorganismos en el soporte, lo cual se observa que inicia desde el centro de los discos hacia la periferia. Asimismo, esta proliferación es más prominente en los primeros discos del reactor (lugar donde se alimenta el agua residual al reactor) que en los últimos, lo cual es fácil de explicar debido a que en las primeras cámaras del biodisco el sustrato carbonoso es abundante (reactor de flujo pistón). Cuando el biodisco llega a su máxima eficiencia de remoción, es decir, cuando se ha alcanzado el régimen permanente, la biopelícula ha alcanzado su mayor grosor, el cual puede llegar a ser de 4 mm, aproximadamente. El grosor de la película está determinado por varios factores, siendo uno de ellos la fuerza de corte que ejerce el líquido, cuando el disco entra en él. Se ha observado que a medida que se incrementa la fuerza de corte, la biopelícula se vuelve más compacta y un menor crecimiento ocurre en la película filamentosa externa y más en la base. Una biopelícula formada así presenta densidades más altas y se reduce el desprendimiento de ella, debido a que la biopelícula crece en una forma más espesa (Bishop y Kinner, 1986; Loosdrecht y col., 2002).

Un reactor biológico rotatorio bien diseñado es muy confiable debido a la gran cantidad de biomasa presente (bajo número de F/M), lo que permite resistir efectivamente cargas orgánicas e hidráulicas extraordinarias (Metcalf y Eddy, 1991).

**Tabla 2.3. Intervalos típicos de las principales características del efluente para la remoción del sustrato carbonoso en un RBR (Metcalf y Eddy, 1991)**

Parámetro	Intervalo
Carga hidráulica, m <sup>3</sup> /m <sup>2</sup> .d	0.08 – 0.16
Carga orgánica, kg DBO <sub>5</sub> sol/m <sup>2</sup> .d <sup>a</sup>	0.0036 – 0.0098
Máxima carga en la primera etapa, kg DBO <sub>5</sub> sol/m <sup>2</sup> .d <sup>a</sup>	0.0196 – 0.0294
DBO <sub>5</sub> del efluente, mg/L	15 - 30

<sup>a</sup> La temperatura del agua residual arriba de 13° C

El principal uso (75%) de los reactores biológicos rotatorios es para la remoción de la DBO carbonosa, en una menor proporción (aproximadamente 25%) son usados para una remoción combinada de DBO y nitrificación y 5% son usados para la nitrificación del efluente secundario (Durán-de-Bazúa, 1994; Metcalf y Eddy, 1991).



Figura 2.5. Reactor de discos rotatorios (de Envirex Inc., en Metcalf y Eddy, 1991)

Se considera que el reactor biológico rotatorio es una de las unidades biológicas que forman parte de una planta de tratamiento de aguas residuales, lo cual se esquematiza en la Figura 2.6.

Algunas de las ventajas de los reactores biológicos rotatorios sobre el proceso convencional de lodos activados son las siguientes (Eckenfelder, 1989):

1. Bajo consumo de energía y mantenimiento más sencillo; por ejemplo, un motor de 40 kW es suficiente para el funcionamiento de una unidad de 3.7 m de diámetro del disco por 7.6 m de largo. Dicha unidad contiene aproximadamente 10,000 m<sup>2</sup> de área superficial disponible para el desarrollo de la biopelícula.

2. Ya que es posible tener en cada etapa un cultivo biológico diferente, se cuenta con un grado adicional de flexibilidad en el proceso. Por ejemplo, puede lograrse un alto grado de nitrificación, desarrollando cultivos de bacterias nitrificantes selectivas en las últimas etapas.
3. La biomasa presenta, en general, buenas características de sedimentación, con lo cual se reducen los costos de la clarificación secundaria, y
4. No es necesario reciclar los lodos en forma de inóculo

Se tienen las siguientes desventajas:

1. Alto costo de capital y
2. Sensibilidad de las comunidades que forman la biopelícula a temperaturas bajas (a menos que estén cubiertos).

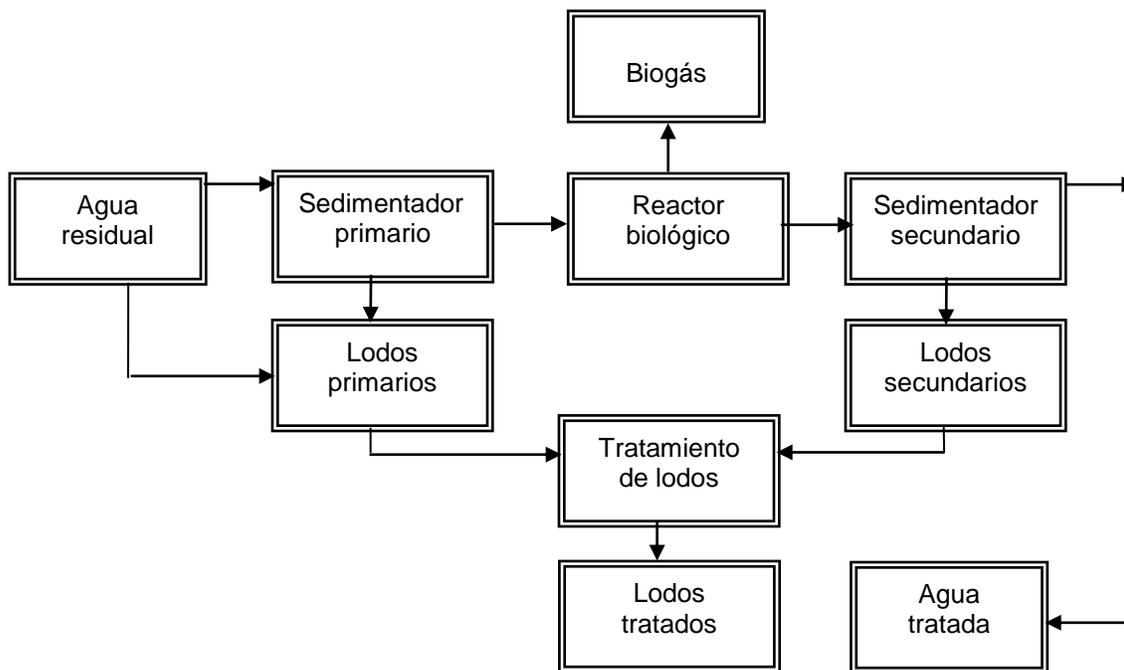


Figura 2.6. Diagrama de bloques del tratamiento de aguas residuales fácilmente biodegradables. El reactor biológico puede ser de biopelícula o de biomasa en suspensión, anaerobia o aerobia.

### 2.3.1. Microbiología

El número y diversidad de especies microbianas presentes en reactores de biodiscos depende del tipo y concentración del sustrato carbonoso y del tiempo de residencia hidráulica. La comunidad de microorganismos, en términos generales, está estratificada como se muestra en la siguiente tabla (Tabla 2.4).

**Tabla 2.4. Comunidades que proliferan en reactores de biodisco (Kinner y col., 1982)**

<b>A la entrada</b>	<b>Después de un tratamiento parcial</b>	<b>A la salida</b>
<b>Desarrollo filamentoso</b>	<b>Película dispersa</b>	<b>Película dispersa</b>
<b>Actividad heterotrófica</b>	<b>Actividad heterotrófica</b>	<b>Nitrificación</b>
<b><i>Sphaerotilus</i> spp. y otras especies Gram (-)</b>	<b>Bacterias Gram (-)</b>	<b>Depredación de película por rotíferos y nematodos</b>
<b>Protozoarios flagelados y amibas</b>	<b>Protozoarios ciliados y amibas</b>	<b>Rotíferos y nematodos</b>

El color y la densidad de la biopelícula varían a lo largo del reactor. Cuando se tratan aguas residuales domésticas, los primeros compartimientos contienen una película de color gris a blanca, que varía a oscura, café blanquizca. En las primeras etapas es gruesa, mientras que en los compartimientos finales es una película delgada debido a que la mayor parte de los compuestos “nutritivos” han sido transformados en biomasa y biogases. Asimismo, ese desarrollo más delgado y fragmentado se atribuye a la depredación por parte de los protozoarios y, como ya se mencionó, a concentraciones más bajas de sustratos orgánicos (Kinner y col., 1982; Luna-Pabello y col., 1994).

En la Tabla 2.4 se observa también que, conforme cambia la concentración de los sustratos biodegradables a lo largo del tratamiento, las afinidades de los organismos por el sustrato disponible y, por tanto, su diversidad también cambia.

### **2.3.2. Factores que afectan la eficiencia del tratamiento de aguas residuales en el biodisco**

#### Transferencia de oxígeno

Considerando que el sistema mecánico de rotación de un reactor de discos opera como un sistema de aeración indirecto, la aireación ocurre cuando la superficie líquida está en contacto con el aire. Los discos también sirven para mezclar el líquido. Se ha observado que, a la entrada del reactor, lugar por donde se alimenta el agua residual, existen condiciones anóxicas, ya que es el lugar donde se presentan las cargas orgánicas más altas y que la concentración del oxígeno disuelto se incrementa en las últimas etapas del reactor (Figuras 2.7.). Es obvio que la velocidad de tratamiento dependerá del área superficial de los discos por unidad de volumen

tratado ( $\text{m}^2 \text{ m}^{-3}$ ; Figura 2.8.), así como también de la velocidad de rotación de los discos (revoluciones por minuto).

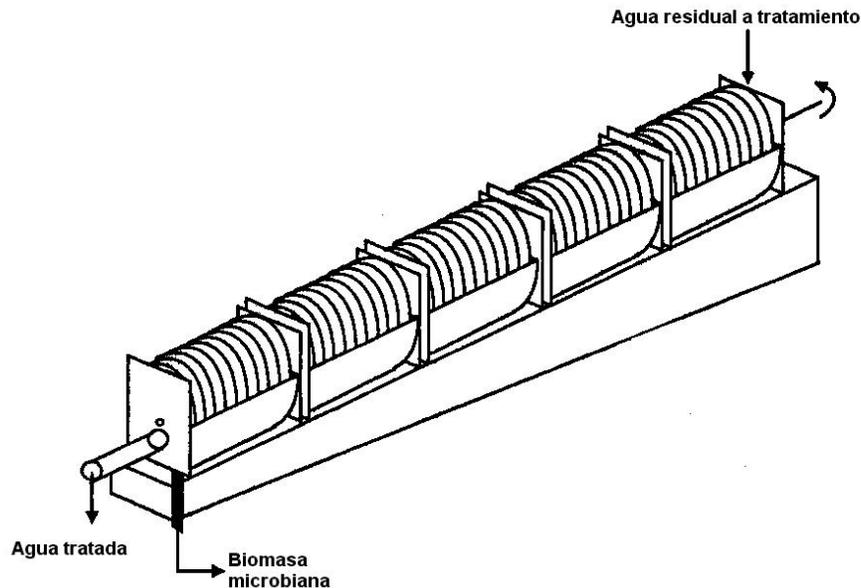


Figura 2.7. Reactor de discos rotatorios, escala laboratorio (Durán-Domínguez-de-Bazúa, 1987)

Una atmósfera de oxígeno en un reactor de discos rotatorios incrementa las eficiencias de remoción de la DBO, DQO y la nitrificación, con lo que se ha demostrado que puede existir una limitación en el oxígeno y que el principal sitio de tratamiento es la biopelícula de los discos.

Si la fuente de carbono y de otros nutrimentos no son limitantes para el crecimiento o desarrollo microbiano, los valores bajos de oxígeno disuelto pueden afectar la oxidación, de acuerdo con la cinética de Monod.

Se ha demostrado que la reacción de oxidación en un reactor de discos rotatorios sigue una cinética de orden 0.5 debido a las limitaciones en la difusión y que el oxígeno es usualmente el sustrato que domina la reacción (Fitch y Murphy, 1999).

### Temperatura

Con base en múltiples observaciones se ha demostrado que la temperatura del agua residual tiene relativamente poco impacto en la velocidad de remoción de la DBO, dentro de los intervalos de temperatura en que se trabajan ( $10$  a  $20^{\circ}\text{C}$ ). Sin embargo, Metcalf y Eddy (1991) reportaron que cuando la temperatura del agua residual cae por debajo de los  $13^{\circ}\text{C}$ , la velocidad de remoción de la DBO puede descender. Para compensar los efectos de la baja temperatura se debe incrementar el área superficial del RBR. En la Figura 2.9, se muestran las curvas de corrección del área de un RBR, para temperaturas por debajo de los  $13^{\circ}\text{C}$  ( $55^{\circ}\text{F}$ ).

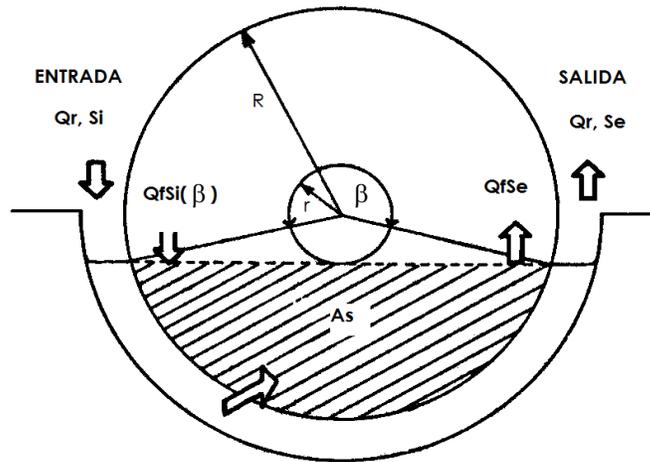


Figura 2.8. Corte de uno de los discos de un reactor de biodiscos (Durán-Domínguez-de-Bazúa, 1987)

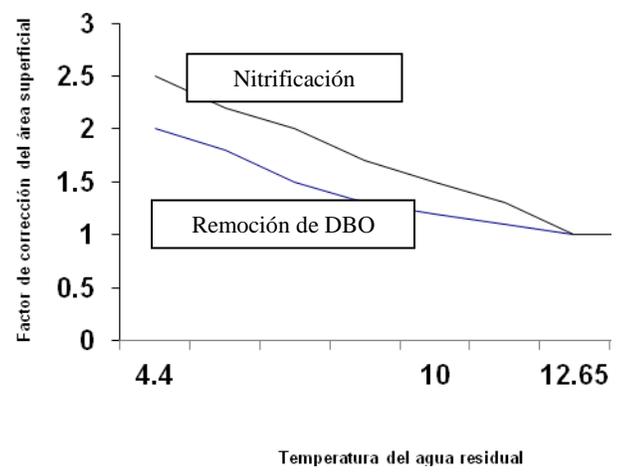


Figura 2.9. Curvas de corrección para RBR para temperaturas por debajo de los 13°C (55°F) (Metcalf y Eddy, 1991)

## 2.4. Identificación de bacterias

Aproximadamente el 1% de las poblaciones bacterianas del suelo pueden cultivarse con técnicas estándar de laboratorio y su identificación se basa en sus características fenotípicas, comprobadas por medio de pruebas bioquímicas. Sin embargo, se ha sugerido que al menos un 99% de las bacterias observadas en el microscopio no son cultivables por medio de las técnicas comunes (Kirk y col., 2004). Debido a los problemas asociados con la imposibilidad de cultivar a gran parte de las bacterias, se han desarrollado métodos para analizar a esos microorganismos basados en el DNA y RNA extraídos de las muestras a analizar (Deng y col., 2008;

Kirk y col., 2004; Díaz y Wachter, 2003; Torsvik y Ovreas, 2002; Friedrich y col., 1997). A continuación se describen las técnicas de identificación de bacterias basadas en las pruebas bioquímicas en microorganismos cultivados en el laboratorio y las técnicas moleculares, que no requieren el cultivo de ellos.

### **Análisis de las comunidades microbianas basadas en pruebas bioquímicas de microorganismos cultivados**

Este método es rápido, barato y puede brindar información de la diversidad y actividad de la comunidad. Las limitaciones incluyen la dificultad para separar a las bacterias y esporas de los materiales de la biopelícula, la selección del medio de cultivo, las condiciones de crecimiento (temperatura, pH, luz), la poca habilidad de los microorganismos para ser cultivados en el laboratorio y la inhibición potencial entre las colonias. Además, el crecimiento en placa favorece a aquellos microorganismos con velocidades altas de crecimiento. Todas esas limitaciones influirán en la aparente diversidad de la comunidad microbiana (Kirk y col., 2004).

La posterior identificación de las bacterias presentes en la muestra requiere de la obtención de cultivos puros de bacterias (cultivo axénico). Los cultivos puros se pueden obtener por siembra en estría en superficie, por siembra en profundidad y la dilución en líquido, repitiendo la técnica con una sola colonia se puede conseguir un cultivo puro (Madigan y col., 2004).

Algunas consideraciones a tomarse en cuenta en el aislamiento de microorganismos son:

1. Hacer una lista de los microorganismos que se podrían aislar.
2. Describir el hábitat de donde van a ser tomadas las muestras.
3. Hacer una lista de los parámetros ambientales que van a ser considerados y medidos, tales como el pH, la salinidad, el potencial eléctrico Eh y la temperatura.
4. Listar los sustratos naturales disponibles en el ecosistema, por ejemplo, quitina, celulosa, suelo forestal.
5. Diseñar la técnica de aislamiento con base en los datos obtenidos en los puntos del 1 al 4, por ejemplo: diluyentes, sustratos, extractos naturales y condiciones de incubación.
6. Emplear técnicas de enriquecimiento específicos para los grupos microbianos de interés (Claus, 1989).

Para aislar organismos que se encuentren en bajos números (como las bacterias celulolíticas) se utiliza la técnica del medio de enriquecimiento (Claus, 1989), misma que se detalla en el Apéndice III. Cabe aclarar que existe un sesgo en el cultivo de enriquecimiento, ya que los organismos más adaptados a las condiciones escogidas

pueden convertirse en la población dominante, pero pudo haber sido un componente minoritario en el ecosistema microbiano original (Madigan y col., 2004).

Durante la identificación de una cepa bacteriana, por medio de la taxonomía clásica, se deben determinar ciertas características morfológicas como: Reacción de Gram y la forma celular (por ejemplo, bacilo, coco, vibrioide, helicoidal u otro). Ciertas características morfológicas son de especial relevancia, como las endosporas, exosporas, cristales y apéndices. Tres exámenes fisiológicos son de gran relevancia: Estos miden oxidasas, catalasas y determinan si los monosacáridos se oxidan o se “fermentan”<sup>2</sup>.

Para los exámenes de caracterización de las cepas bacterianas es necesario trabajar con organismos en buenas condiciones fisiológicas. Los organismos se deben incubar en las mejores condiciones de temperatura, pH, condiciones de gases y condiciones iónicas (Gerhardt y col., 1981).

Después de enriquecer y aislar a las bacterias, se debe realizar una identificación, usando el Manual Bergey (Bergey y col., 1993). Actualmente se cuenta con un sistema de identificación conocida como API para la identificación de las bacterias (Anónimoc, 2013)

### **Identificación de bacterias no cultivables, por medio de métodos moleculares**

Si se desea evaluar la biodiversidad de un ecosistema microbiano, sin emplear técnicas de cultivo, ni observar células, se pueden usar genes específicos caracterizados, como medida de la biodiversidad de la comunidad microbiana. Debido a que los genes están relacionados con organismos específicos, al detectar el gen se infiere la presencia del organismo. Las principales técnicas para el análisis de comunidades microbianas es la reacción en cadena de la polimerasa (*PCR*, por sus siglas en inglés), la electroforesis en gradiente de gel desnaturizante (*DGGE*), la clonación molecular y la secuenciación y análisis del ADN (Madigan y col., 2004). La reacción en cadena de la polimerasa es una de las principales técnicas de la Biología molecular, por lo que se describirá a continuación:

#### Reacción en cadena de la polimerasa (*PCR*)

Mediante la técnica de *PCR* se amplifican fragmentos de ADN a partir de una mezcla de material iniciador llamado ADN plantilla. Se requiere del conocimiento de la secuencia de fragmentos aledaños al ADN a ser amplificado (DNA blanco). A partir de esta información se pueden sintetizar químicamente dos oligonucleótidos

---

<sup>2</sup> Louis Pasteur creó el término *fermentar* y lo aplicó exclusivamente a la reacción anaerobia de transformación de la glucosa en etanol y dióxido de carbono por *Saccharomyces cerevisiae*. Por ello, resulta inadecuado emplearlo para otras biotransformaciones. Desafortunadamente, su mal uso está muy extendido entre la comunidad científica y debe, poco a poco, irse desincentivando su uso para otras biorreacciones que no sean la verdadera fermentación

llamados *Primers*, por iniciadores en inglés, mismos que proveen un grupo 3' – hidroxilo para que pueda iniciar la ADN-polimerasa (Rapley, 2005).

El primer paso es la extracción y purificación del ADN de las muestras, directamente (extracción del ADN total de la muestra) o indirectamente (extracción de los microorganismos de la muestra, seguida de la extracción del ADN de éstos). Para la extracción del ADN de biopelículas se tiene la técnica de Lee y col. (1996) modificada por Lee y col., en el 2008. Posteriormente se amplifican por medio de *PCR*, ciertas regiones del gen ribosomal 16S. Se usan diversos cebadores desde los muy generales hasta los muy específicos. En el segundo paso se desnaturaliza el ADN, por medio de su calentamiento a 94°C, para hacer accesible la zona que se va a amplificar. Enseguida se enfría entre los 40 y 60°C. El siguiente paso es el recocido (*annealing*) que permite la hibridación de los dos oligonucleótidos *primers*, que están en exceso, que se unen a los sitios complementarios que flanquean al ADN blanco. La síntesis del ADN se le conoce como extensión y es llevada a cabo por una ADN polimerasa termoestable (polimerasa Taq ADN; op.cit.).

Para la separación del ADN ribosomal 16S amplificados es necesario construir bibliotecas de clonas de rADN 16S, cuya posterior secuenciación permite determinar la diversidad microbiana (Díaz y Wacher, 2003; Madigan y col., 2004). Actualmente las secuencias del 16S / 18S rRNA / rADN son más populares que las 23S / 28S rARN / rADN debido a que se han depositado muchas secuencias del 16S / 18S rRNA / rADN en *GenBank* (Benson y col., 2004). La desventaja de las técnicas de identificación por métodos moleculares es que se debe contar con suficiente información de las diversas secuencias de los ribosomas, de los microorganismos que se piensa van a ser identificados.

## **3.MATERIALES Y MÉTODOS**

### 3.1. Puesta en marcha del reactor

Equipo empleado: Reactor biológico rotatorio (RBR)

El reactor biológico rotatorio, cuyo esquema se presenta en la Figura 3.1a fue dividido en dos, mediante una mampara, con el objeto de hacer por duplicado cada corrida. Estuvo constituido por discos montados en una flecha horizontal colocada en un tanque de metal (Figura 3.1). El 40% del área superficial de los discos estuvo sumergida en el agua residual. Las características del reactor usado se presentan en la Tabla 3.1. Este reactor se ha descrito ampliamente en la literatura (Álvarez, 1986; Durán-de-Bazúa y Hartmann, 1980; 1981; Escárcega y Pulido, 1986; Norouzian y Deloya, 1984; Pedroza-de-Brenes y Durán-de-Bazúa, 1987).

Tabla 3.1. Características del reactor biológico rotatorio empleado

Material de construcción de los discos de cada reactor	Acrílico
Volumen de trabajo	0.020 m <sup>3</sup>
Número de cámaras	4
Número de discos	8 (2 por cada cámara)
Diámetro de los discos	0.24 m
Espesor de los discos	0.003 m
Longitud del reactor	0.28 m
Diámetro del reactor	0.34 m
Superficie total de contacto	0.73 m <sup>2</sup>
Relación área volumen	36 m <sup>2</sup> / m <sup>3</sup>
Velocidad rotacional	16 rpm
Tiempo de residencia hidráulico	1 día
Re (número de Reynolds)	3,082

Se realizaron dos corridas experimentales por duplicado, en el reactor mostrado en las Figuras 3.1.a y 3.1.b. Cada reactor contó con cuatro cámaras, dejando la quinta y décima cámaras como recolectoras del efluente tratado.

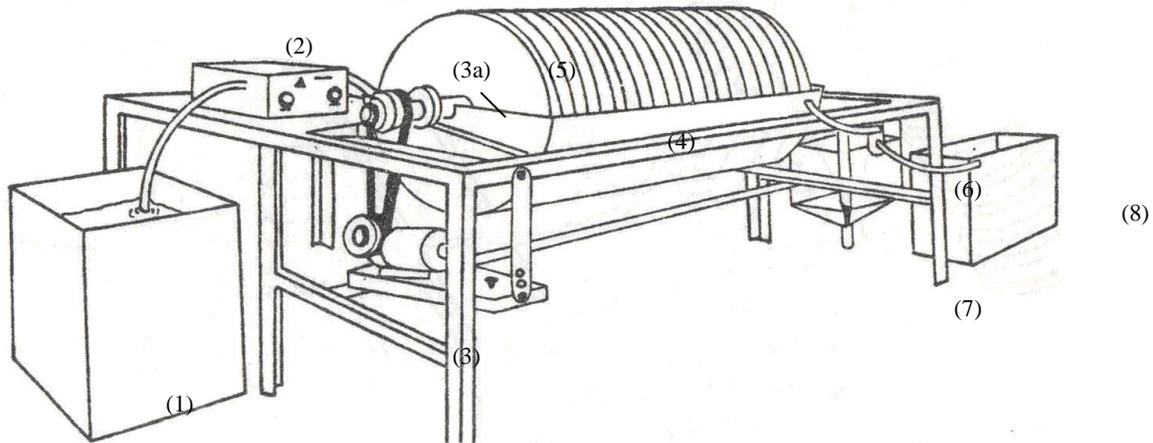


Figura 3.1a. Reactor experimental de discos rotatorios: (1) Tanque de almacenamiento del influente; (2) Bomba peristáltica de alimentación; (3) Moto-reductor para controlar la velocidad rotacional del tren de discos; (3a) Flecha de soporte de los discos conectada al moto-reductor; (4) Tanque semicilíndrico del reactor; (5) Tren de discos de material inerte; (6) Sedimentador para separar la biomasa del efluente tratado; (7) Salida para la biomasa sedimentada (válvula para controlar la salida de lodos); (8) Tanque recolector del efluente clarificado que sale del sedimentador (Luna-Pabello y col., 1994)

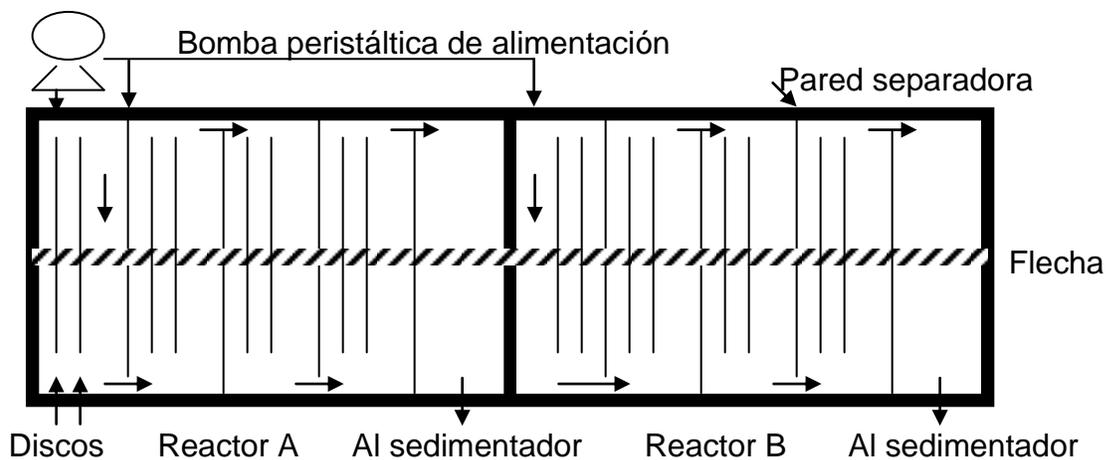


Figura 3.1b. Detalle de la división del reactor en dos reactores iguales operando en paralelo y cuyos efluentes se envían a un sedimentador

### 3.2. Estudio físico-químico del reactor

Se trabajó con agua residual procedente de una planta productora de papel que usa como materia prima, más del 60% de papel de desperdicio con bajo contenido de pulpa Kraft. El agua fue suministrada por la industria cada semana.

Se llevaron a cabo análisis fisicoquímicos de cada lote de agua blanca que se recibía, así como de muestras del reactor A y B. Para ello se siguieron las técnicas recomendadas por la APHA (APHA-AWWA-WPCF, 1985), que se presentan en la Tabla 3.2. Las muestras fueron analizadas por duplicado. Se hicieron los promedios y las desviaciones estándar (Montgomery y William, 1996)

Tabla 3.2. Técnicas empleadas en el análisis fisicoquímico de las aguas residuales (APHA-AWWA-WPCF, 1985)

Análisis	Técnica
Demanda química de oxígeno, mg/L	Reflujo, con dicromato de potasio
Demanda bioquímica de oxígeno soluble, mg/L*	Respirométrica (Voith, Heidenheim-RFA)*
Contenido de celulosa, µg/L	Técnica de Updegraff (1969), con el uso de la antrona
Azúcares libres, µg/L	Técnica de Updegraff (1969), con el uso de la antrona
Valor de pH	Potenciométrica (Orion, modelo 720A)
Oxígeno disuelto, ppm	Electrodo con membrana (Orion, modelo 720A)
Temperatura, °C	Termómetro
Sólidos sedimentables, mL/L	Cono Imhoff
Sólidos disueltos totales, mg/L	Crisol seco a 103°C
Sólidos suspendidos totales, mg/L	Filtración en fibra de vidrio y secado a 103°C

\*La DBO<sub>5</sub> se determinó semanalmente, durante 5 semanas, a partir del tiempo cero. Una muestra tomada en el tiempo 18 se dejó 24 días, con el objeto de determinar la DBO última

### 3.3. Estudios microbiológicos

#### Formación de la biopelícula en los discos del reactor biológico rotatorio

Primera corrida experimental (35 días)

En los 35 días, que fue el tiempo de duración de la primera corrida, se realizaron los análisis físico-químicos que aparecen en la Tabla 3.2 (por duplicado). Se siguió la formación de la biopelícula en los discos del RBR desde la puesta en marcha hasta que el reactor alcanzó el régimen pseudopermanente, considerado cuando la variación en las concentraciones de los efluentes, medidas como demanda química de oxígeno, tiene fluctuaciones de  $\pm 10\%$ . Para ello, se tomaron muestras de biopelícula en áreas radiales del primer disco ( $7 \text{ cm}^2$ ) de las cámaras 1 y 3 de ambos reactores, cada semana durante cinco semanas y se determinó la biomasa medida como masa seca (mg/área del disco/tiempo) y el recuento de células viables cultivables, para lo cual se hicieron diluciones de ella y siembra sobre agar nutritivo (UFC/área del disco/tiempo). Cada semana se tomó la muestra de biomasa de un sitio diferente de estos discos para realmente medir la acumulación a lo largo del tiempo. Debido al crecimiento exponencial de los microorganismos se aplicó el logaritmo natural a las UFC y se graficó con respecto al tiempo.

#### Medición de la velocidad de crecimiento de la biopelícula

La velocidad de crecimiento de la biopelícula ( *$\mu$  de la biopelícula*) se obtuvo mediante la determinación de la pendiente de la curva en la fase log, obtenida al graficar el logaritmo natural de las unidades formadoras de colonias por unidad de superficie ( $\ln \text{ UFC} / 7 \text{ cm}^2$ ) contra el tiempo.

Segunda corrida experimental (7 días)

Al observar la gráfica de la remoción de la DQO soluble contra el tiempo, del primer experimento, se notó que durante la primera semana se presentó la fase exponencial de crecimiento de la biopelícula, es por esa razón que se decidió hacer este segundo experimento. En éste, los discos de los reactores A y B se limpiaron completamente para eliminar toda la biopelícula que se había formado en la primera corrida. En el tiempo de duración de la segunda corrida, 168 horas, se realizaron, por duplicado los análisis físico-químicos que aparecen en la Tabla 3.2. Se siguió la formación de la biopelícula en los discos del RBR durante el tiempo de operación del reactor. En este experimento se tomaron muestras diarias de biopelícula de áreas radiales de los mismos discos de las cámaras 1 y 3 ( $7 \text{ cm}^2$ ), nuevamente cambiando el sitio de muestreo durante cada uno de los ocho días y se les determinó el recuento de células viables cultivables, de manera semejante a lo descrito en la primera corrida. No se midió la masa seca (mg/área del disco/tiempo) porque el desarrollo de la biopelícula dio cantidades muy pequeñas que no pudieron cuantificarse.

### **3.3.1. Aislamiento de bacterias mesófilas cultivables aerobias durante la formación de la biopelícula en un reactor de discos rotatorios, durante la primera corrida experimental**

Para conseguir esta meta, muestras de biopelícula tomadas a los siete días del inicio del experimento, se sometieron a un enriquecimiento para poder aislar a las bacterias. Se pusieron en matraces Erlenmeyer con agua que contuvo papel filtro (Whatman 1) al 1% (p/v) cortado en piezas de 0.5 cm<sup>2</sup> como única fuente de carbono y como fuente de nitrógeno se agregó NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub> al 1% (p/v). Se incubaron a 150 rpm a 29°C. Se realizaron cuatro transferencias a intervalos de 5-6 días. Posteriormente, se tomaron muestras del cultivo enriquecido y se realizaron diluciones adecuadas, mismas que se sembraron en placas con agar de cuenta estándar, para su posterior aislamiento e identificación de cada una de las poblaciones bacterianas.

### **3.3.2. Identificación de bacterias mesófilas cultivables aerobias de la muestra del cultivo enriquecido a partir de biopelícula del reactor de discos rotatorios**

Para aislar a las diferentes cepas bacterianas producto del enriquecimiento de la biopelícula, se realizaron diluciones y siembras en agar estándar hasta la adecuada separación entre colonias. A partir de estas placas se tomaron muestras de cada colonia y se resembraron en agar de cuenta estándar, con lo que se obtuvieron cultivos puros de cada colonia (Ver Apéndice III).

La identificación de las bacterias se inició con un cultivo axénico de cada colonia aislada. A partir de ello se llevaron a cabo los siguientes pasos (ver Apéndice II):

1. Tinción de Gram, por microscopía óptica, determinándose si eran Gram positivo o Gram negativo y descripción de la morfología de la cepa
2. Búsqueda de movilidad bacteriana en agar suave o semisólido (0.5% de agar)
3. Prueba de los requerimientos de oxígeno; aerobio o anaerobio
4. Prueba del catabolismo de la glucosa, oxidativo o “fermentativo”

Además, se realizaron las siguientes pruebas fisiológicas, usando las metodologías descritas en el Apéndice II:

Catalasa

Oxidasa

Glucosa-ácido

Carbohidratos (Hidratos de carbono)

Producción de H<sub>2</sub>S

Proliferación en agar MacConkey

Indol

Ureasa

Hidrólisis de gelatina

Los resultados de las pruebas bioquímicas se compararon en las tablas de pruebas bioquímicas de las especies de bacterias del Manual de Determinación Bacteriológica (Bergey y col., 1993).

El trabajo experimental se llevó a cabo dentro del período de 1990 a 1992

### **3.4. Análisis estadísticos de los datos experimentales**

Los análisis estadísticos de los datos experimentales se hicieron con ayuda de la hoja de cálculo Excel versión 2010.

## **4.RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## 4.1. Primera corrida experimental en el reactor de discos rotatorios

### Caracterización del agua residual utilizada

En la Tabla 4.1 se presentan las características físico-químicas encontradas en el agua residual. El listado completo de los datos experimentales de esta investigación y el análisis estadístico se presentan en los Apéndices I y VI.

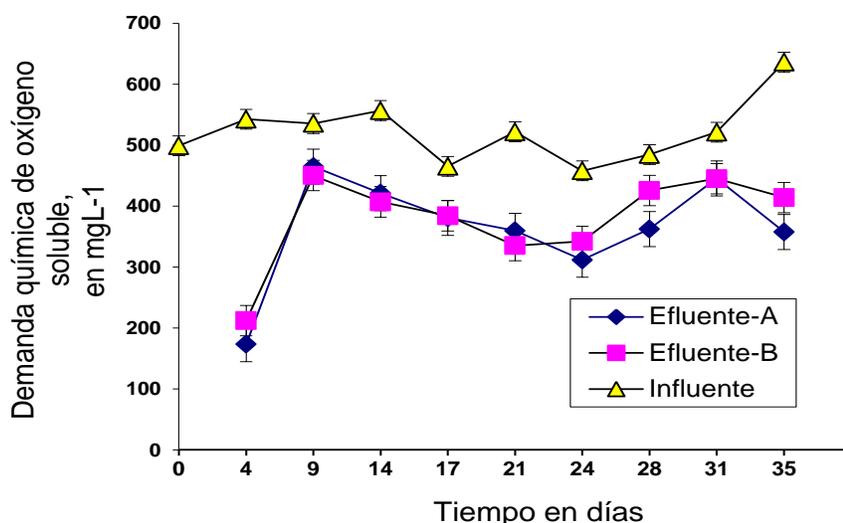


Figura 4.1. Variación de la demanda química de oxígeno en los reactores A y B, durante la primera corrida experimental<sup>3</sup>

### Demanda química de oxígeno y demanda bioquímica de oxígeno

En la Figura 4.1 se presenta la variación de la demanda química de oxígeno en los dos reactores, durante los 35 días del experimento. En la Figura 4.2 se observa que el porcentaje de remoción de la DQO varió de 13% en la primera semana, a 44% en el final de la corrida en el efluente del reactor A y de 16% en la primera semana, a 35% en el final de la corrida en el efluente del reactor B. En esta misma figura se observa que en el día 4 se presentó una máxima remoción en ambos reactores. Esa alta remoción de la DQO soluble se pudo atribuir a una gran actividad metabólica de los microorganismos, que mostraron un crecimiento exponencial. Sin embargo, dado que la inmovilización fue reversible durante la primera semana del experimento, en la segunda semana el número de UFC por unidad de área, decayó en un orden de 200 por ciento en el reactor A y de más de 5000 por ciento en el reactor B (Figura 4.10).

<sup>3</sup> La determinación de la DQO del licor mezclado de los reactores se inició en el día 4 de la corrida experimental

Los porcentajes de remoción estuvieron muy por debajo de lo que se ha reportado en la literatura, donde se presentan valores típicos del 70% al 90% de remoción de la DQO soluble (Kevin y col., 1999). Lo anterior pudo deberse a la presencia de sustancias tóxicas para las comunidades microbianas presentes en la película lo que provocó un constante desprendimiento de la biopelícula. Se debe destacar que el agua residual con la que se trabajó periódicamente tenía ácidos, álcalis y compuestos microbicidas, usados durante el mantenimiento rutinario que se les da a las máquinas de papel, que son tóxicos para las colonias microbianas. Por esta razón, las curvas de remoción, medidas como DQO no alcanzaron las eficiencias típicas descritas para un RBR de laboratorio (Martínez y Rodríguez, 2005; Márquez y Guevara, 2004.)

En las Figuras 4.3 y 4.4 se observan las variaciones de la concentración de contaminantes medida como demanda bioquímica de oxígeno en los dos reactores a lo largo de los 35 días de la primera corrida experimental. Se observa que la máxima eficiencia, que fue del 77% se alcanzó al finalizar la primera semana. Al finalizar la cuarta semana se presentó la mínima eficiencia, que fue de 53%, misma que aumentó a un 64% al finalizar el experimento. La eficiencia mínima en la remoción de la DBO del agua residual en la cuarta semana coincidió con concentraciones bajas de azúcares libres en el influente durante los días 25 y 28 y una gran reducción en el recuento de células viables en el día 28 (ver Figura 4.8). Estos valores de la eficiencia de la remoción son bajos según los reportes bibliográficos que señalan como una remoción del 80% en la DBO para este tipo de tratamiento (Metcalf y Eddy, 1996), lo cual se pudo deber al desprendimiento frecuente de pedazos de biopelícula que según Martínez y Rodríguez (2005), es la que lleva casi el 100% de la remoción de la carga orgánica biodegradable contenida en el agua residual.

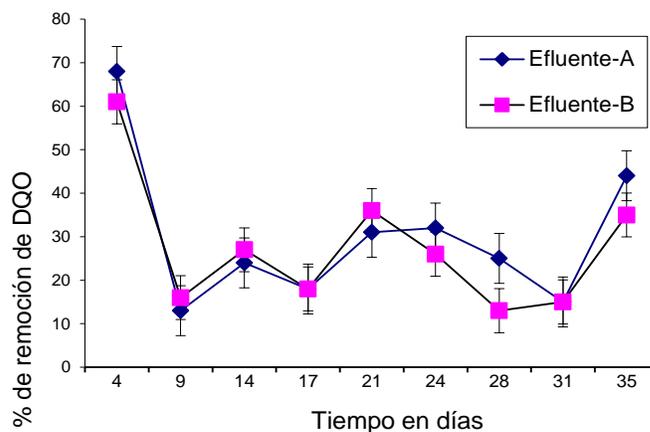


Figura 4.2. Eficiencias de remoción de DQO en el RBR

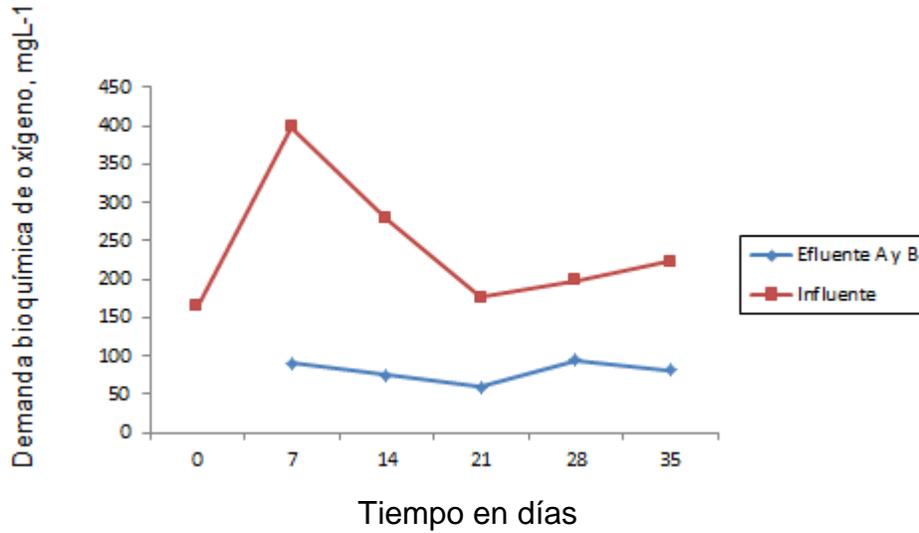


Figura 4.3. Variación de la DBO<sub>5</sub> en los reactores A y B, durante la primera corrida experimental (solamente se analizó una muestra para cada punto)

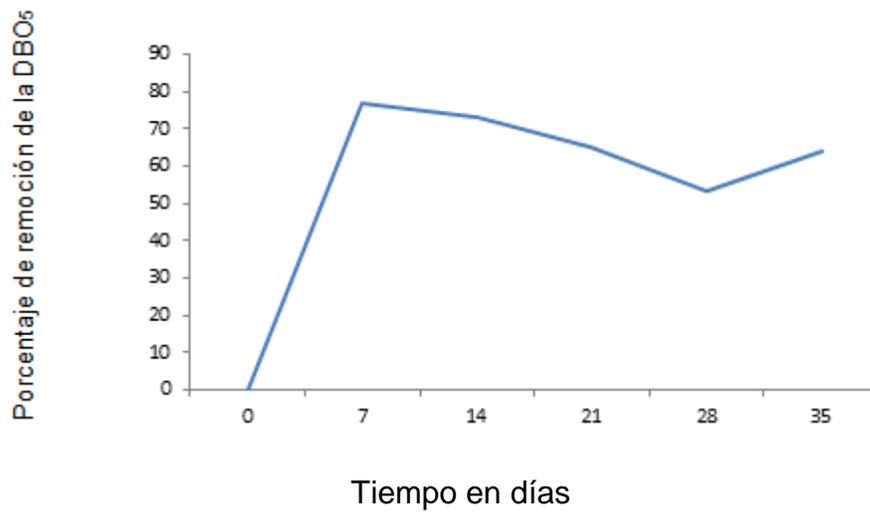


Figura 4.4. Eficiencias de remoción de DBO<sub>5</sub> en el RBR, para los reactores A y B<sup>4</sup>

<sup>4</sup> Estos datos corresponden a la DBO<sub>5</sub> de la muestra formada por la combinación del efluente del reactor A y del B, en cada tiempo. El valor de la DBO del día 21 se formó del promedio de los valores de las cámaras 3 de ambos reactores, debido a que no se determinaron los valores de los efluentes

## Celulosa y azúcar libre

La concentración de celulosa en el agua residual se presentó en un intervalo de 1.87 a 27.14  $\mu\text{gL}^{-1}$  (Tablas 4.1 y 4.2) y el del azúcar libre fue de 11.52 hasta 46.47  $\mu\text{gL}^{-1}$ .

Tabla 4.1. Características fisicoquímicas del agua residual usada durante los primeros treinta y cinco días del experimento

Parámetro	Media aritmética $\pm$ D.E.	Mediana	Número de muestras analizadas
Demanda química de oxígeno soluble, mg/L	526.13 $\pm$ 55.16	528.50	22
Demanda bioquímica de oxígeno soluble última (18 días), $\text{mgL}^{-1}$ (DBO <sub>18</sub> )	402.27	-	1
Promedio de valores de demanda bioquímica de oxígeno soluble, $\text{mgL}^{-1}$ (DBO <sub>5</sub> )	240.16	219.00	6
Relación de biodegradabilidad: Demanda bioquímica de oxígeno soluble última, $\text{mgL}^{-1}$ (DBO <sub>18</sub> )/ Demanda química de oxígeno soluble, $\text{mgL}^{-1}$	0.76	-	-
Contenido de celulosa, $\mu\text{g L}^{-1}$	17.14 $\pm$ 7.81	20.12	18
Azúcar libre, $\mu\text{g L}^{-1}$	25.79 $\pm$ 10.46	23.41	20
Valor de pH	8.55 $\pm$ 1.13	8.15	22
Oxígeno disuelto, ppm	0.16 $\pm$ 0.18	0.05	12
Temperatura, °C	19.76 $\pm$ 1.53	19.85	12

- , no procede

En la Figura 4.5 y en la Tabla 4.2 se puede observar que el azúcar libre presente en el influente tuvo variaciones de más del 100% (11.52 a 46.47  $\mu\text{gL}^{-1}$ ), en especial en el período del día 18 hasta el día 25. La máxima concentración de azúcares libres en el influente (ocurrió el día 21 con un valor de 46.47  $\mu\text{gL}^{-1}$ ), coincidió con una concentración máxima de células viables, medidas como UFC / 7  $\text{cm}^2$ , alcanzando los 52 millones en la cámara 1 del reactor A y 28 millones en la cámara 1 del reactor B (Figura 4.8). La reducción en la concentración de azúcares libres en el influente a partir del día 25, coincidió con la caída en el conteo de células viables (0.3 millones para la cámara 1 del reactor A y 0.55 millones para la cámara 1 del reactor B), a partir del día 28. Lo anterior puso en evidencia que existió una relación directa entre

disponibilidad de sustrato carbonoso de fácil degradación y la acumulación de la biopelícula.

La presencia de los azúcares libres en el influente se debe a la utilización de mezclas de almidones en el proceso de producción del papel (Nachtergaele, 1989; Anónimo, 2011), que se usan con el fin de aumentar la resistencia mecánica de la hoja de papel (Miranda, 2009). Es muy probable que los microorganismos usaran alternativamente a la glucosa y a la celulosa, como ha sido demostrado en estudios donde se agregan mezclas de sustratos para el crecimiento de *Escherichia coli*. En éstos, *E. coli* consume primero el sustrato de más fácil degradación o preferencial y posteriormente consume el segundo sustrato y su curva de crecimiento es “diáuxica” (del inglés: “*diauxic*”; Egli y col., 1993).

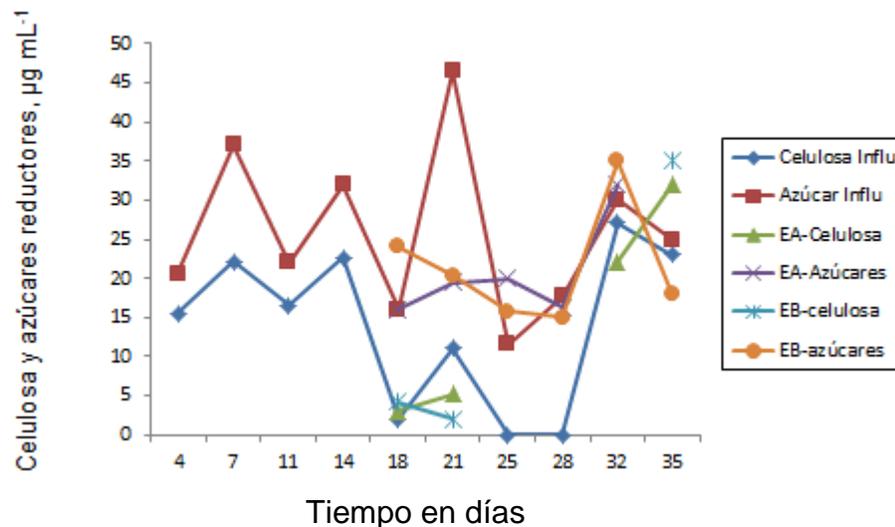


Figura 4.5. Concentración de celulosa y azúcares libres en el agua residual utilizada y en los efluentes de los reactores A y B

### Valores de pH, oxígeno disuelto y temperatura

Los valores de pH en las cuatro cámaras de ambos reactores tuvieron un valor en promedio, de 8.55. Hubo ocasiones en que el pH del influente fue de 11.20, lo que se pudo deber a la adición de hidróxido de sodio al agua de proceso, con el objeto de destintar el papel (Anónimo, 2011). Una vez que el agua residual ingresó a las cámaras del reactor, el valor de pH se hizo menos básico, debido a la acción amortiguadora de los carbonatos ( $\text{CO}_3^{2-}$ ), bicarbonatos ( $\text{HCO}_3^-$ ) y el ácido carbónico ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ), que se forman en el agua residual por la generación de  $\text{CO}_2$  por parte de los microorganismos. Esta generación de  $\text{CO}_2$  juega un papel muy importante en el equilibrio del pH del agua en tratamiento dentro del reactor (Kevin y col. 1999; Roussos y Perraud-Gaime, 1996; Sawyer y McCarty, 1978).

El oxígeno disuelto del influente siempre presentó valores menores a 1 ppm; sin embargo, al avanzar a lo largo de los reactores este valor aumentó hasta 7.98 ppm, en promedio. Este incremento en la concentración de oxígeno disuelto se debe al movimiento rotacional de los discos del reactor que ocasiona la aireación del agua residual (Figura 4.6).

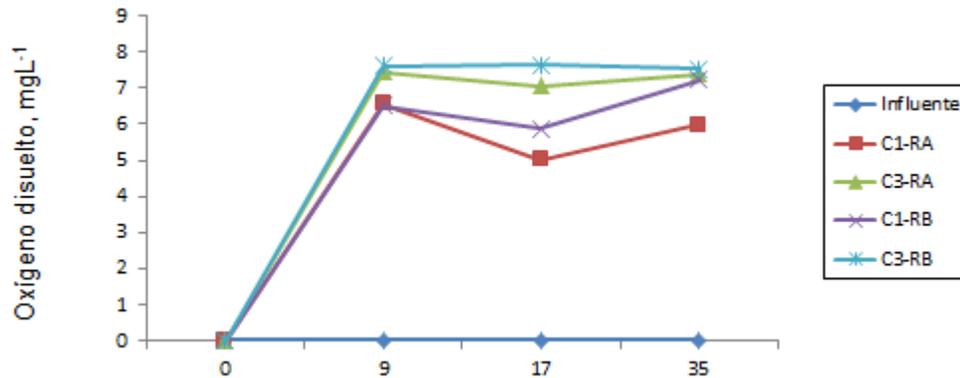


Figura 4.6. Concentración de oxígeno disuelto en el agua residual utilizada y la del licor mezclado de las cámaras 1 y 3 de los reactores A y B

En la Figura 4.6 se observa que el licor mezclado de las cámaras 3 de los reactores A y B presentó una mayor concentración de oxígeno disuelto que el de las cámaras 1 de los mismos, lo que se pudo deber a que la primera cámara recibió una mayor concentración de materiales que al ser degradados por los microorganismos consumieron el oxígeno disuelto.

La temperatura en los reactores estuvo entre los 16 y los 22°C. Estos tres parámetros analizados tuvieron valores para un adecuado desarrollo de los microorganismos y, por tanto, de la biopelícula en los reactores de discos rotatorios.

### Formación de la biopelícula

La formación de la biopelícula, con base en la masa seca y al recuento de células viables, mostró durante los primeros siete días del experimento las velocidades de crecimiento más altas, para ambos reactores (Figura 4.7 y 4.9), identificándose la fase exponencial en esta semana. Lo anterior se pudo explicar debido a que al inicio de la formación de la biopelícula, todas las microcolonias tuvieron acceso a los nutrientes contenidos en el agua residual y a los diversos nichos ecológicos y, por lo tanto, su velocidad de proliferación fue alta. Conforme se desarrollaron las microcolonias y formaron colonias grandes y una biopelícula con un mayor grosor, existió una mayor competencia por los nutrientes y los espacios. También, las colonias cercanas al soporte estuvieron expuestas a niveles bajos de oxígeno disuelto y, por tanto, las bacterias aerobias murieron (excepto las microaerófilas y anaerobias), con lo cual la velocidad de reproducción se redujo (Vanhooren, 2002; Martínez y Rodríguez, 2005; Welter y col., 2006).

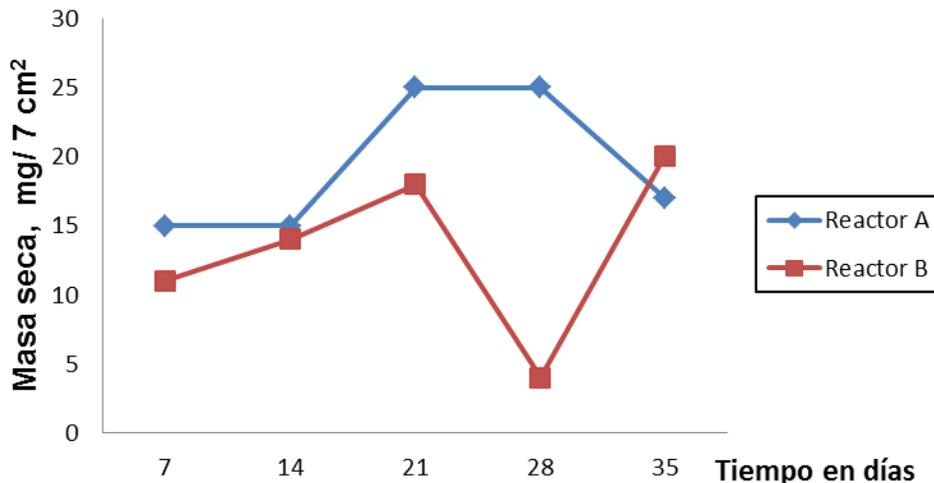


Figura 4.7. Biomasa medida como masa seca de las biopelículas muestreadas en la primera corrida experimental

A los treinta y cinco días del experimento, el conteo de las células viables no alcanzó un valor estable, para la biopelícula de las cámaras 1 de los reactores A y B. En cambio, el de las cámaras 3 de los reactores estudiados mostró una mayor estabilidad (Figura 4.10). Lo anterior se pudo deber a que la primera cámara estuvo expuesta a un influente más concentrado y que en ocasiones presentaba compuestos tóxicos. Aunado a lo anterior, también los siguientes factores pudieron ocasionar el desprendimiento: fuerzas de corte durante la rotación de los discos, erosión, formación de gases dentro de la película, cambios en la concentración de sustratos, lisis bacteriana por falta de nutrimentos, choques tóxicos ocasionados por la presencia de biocidas oxidantes y no oxidantes, hidróxido de sodio y ácido sulfúrico (González y López, 2007; Welter y col., 2006; Fundación ICA, A.C., 2003; Fernández-Villagómez, 1992; Quintanar-Ferriz, 1993; Vázquez-García, 1991; Martínez y Rodríguez, 2005). En esa misma figura se observó que de la primera a la segunda semana hubo una adsorción reversible de células al soporte, lo que se reflejó en una caída en el conteo de células viables por cada 7 cm<sup>2</sup> de área muestreada de biopelícula. Esto corresponde con la teoría expuesta por Charaklis (1989), en la que menciona que inicialmente en la formación de la biopelícula se da una adsorción reversible, seguida por una adsorción irreversible, misma que se evidenció durante la tercera semana (Figura 4.8). La caída en el recuento de células viables coincidió con la reducción en el porcentaje de remoción de la DQO y DBO solubles y concentración de azúcares libres (Figuras 4.2, 4.4 y 4.8).

Tabla 4.2. Concentración de celulosa y azúcares libres en el agua residual, en  $\mu\text{g mL}^{-1}$

Tiempo días	Influyente		Reactor A*		Reactor B*		Efluente reactor A		Efluente reactor B	
	Celulosa en sólidos	Azúcares libres								
0	20.40	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
4	15.54	20.55	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
7	22.19	37.02	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
11	16.51	22.02	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
14	22.66	32.20	22.1	16.97	22.61	13.54	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
18	1.87	15.5	4.27	19.22	2.33	22.85	2.93	15.90	4.17	23.57
21	10.81	46.47	2.09	23.14	1.86	19.18	5.24	19.46	2.06	20.30
25	N.D.	11.52	N.D.	21.15	N.D.	17.18	N.D.	19.52	N.D.	15.78
28	N.D.	17.74	N.D.	16.61	N.D.	17.45	N.D.	16.22	N.D.	15.04
32	27.14	29.77	6.053	36.14	16.56	42.25	22.15	31.95	N.D.	35.04
35	22.89	25.10	6.79	20.73	8.60	N.D.	31.88	N.D.	34.51	17.85

N.D.= no determinado. \* = la muestra fue el promedio de una alícuota de un mL de las cámaras 1 y 3 de cada reactor

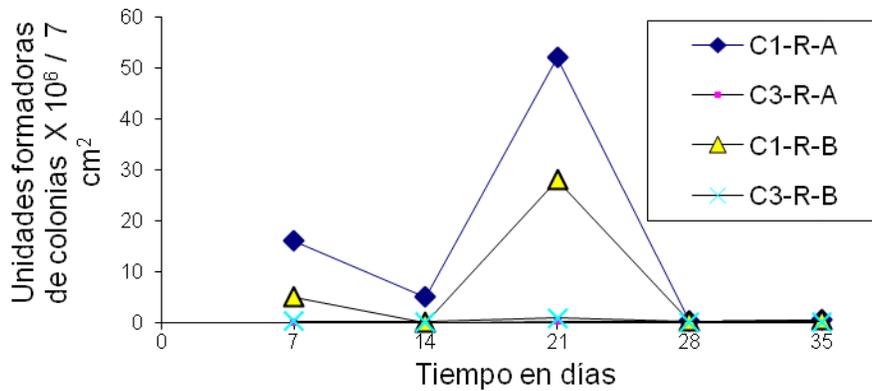


Figura 4.8. Conteo de células viables (UFC/ área muestreada en los discos del reactor biológico rotatorio)<sup>5</sup>

El valor de la biomasa medida como masa seca tuvo un error, no definido, mayor al 2%, ya que no se contó con un mínimo de biomasa de 50 mg, recomendado en la literatura para tener un error en la medición menor al 2% (Pirt, 1975). La Figura 4.9 muestra la gráfica semilogarítmica de la masa seca contra tiempo, la cual no reflejó los altibajos por los que atravesó la biopelícula.

Por lo anterior, el conteo de células viables (unidades formadoras de colonias UFC/ 7 cm<sup>2</sup>) fue el método que mostró con mayor eficacia el crecimiento de la biopelícula del reactor biológico rotatorio (Figura 4.10).

En las Figuras 4.9 y 4.10 se observa que la fase exponencial de crecimiento de la biopelícula ocurrió en la primera semana de iniciada la corrida experimental. Las dos curvas de crecimiento microbiano mostraron un comportamiento acorde con lo descrito para el desarrollo de biopelículas (Bryers y Characklis, 1982; Welter y col., 2006; Devlieghere y col., 2009).

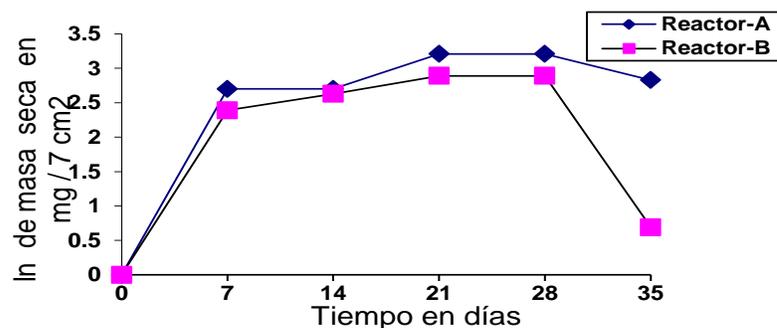


Figura 4.9. Logaritmo de la masa seca de las biopelículas en mg, muestreadas durante la primera corrida experimental<sup>6</sup>

<sup>5</sup> C1 indica cámara 1. C3 indica cámara 3, para cada reactor

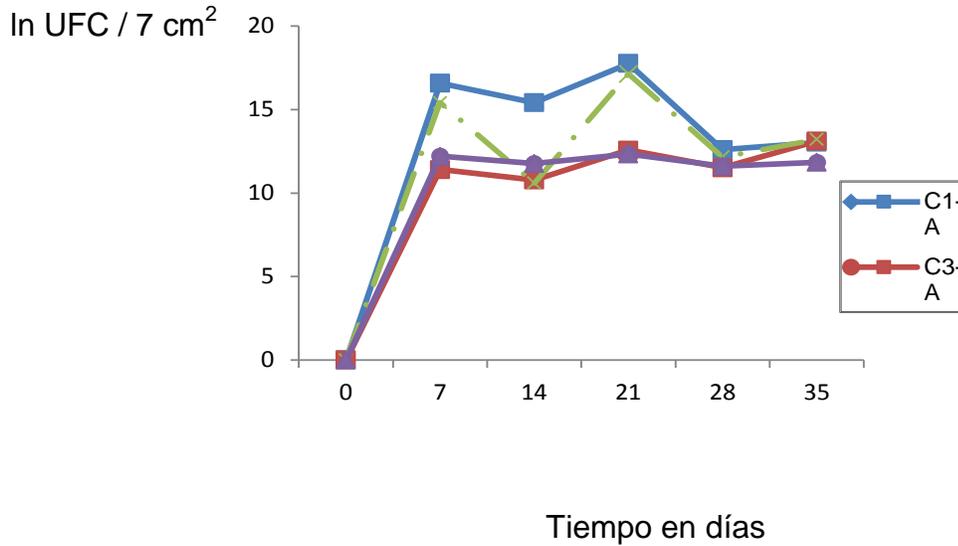


Figura 4.10. Logaritmo natural del conteo de células viables, UFC/ área muestreada en los discos del reactor biológico rotatorio (primera corrida experimental)<sup>7</sup>

En la Tabla 4.3 se observan los valores de las velocidades específicas de crecimiento de la biopelícula, determinada en la fase exponencial, correspondientes a los discos de las cámaras 1 y 3 de los reactores A y B, comparadas con la DQO soluble.

Tabla 4.3. Velocidad específica de crecimiento de las biopelículas de los reactores A y B

Parámetro cinético/concentración de DQO soluble	Reactor A		Reactor B	
	Cámara 1	Cámara 3	Cámara 1	Cámara 3
$\mu$ (día <sup>-1</sup> )	2.15	1.28	2.10	1.20
DQO Día 4 <sup>8</sup> (mgL <sup>-1</sup> )	533.40	531.90	378.97	195.24

<sup>6</sup> En el caso de la determinación de la biomasa medida como masa seca, se realizó en total para cada reactor debido a la escasa cantidad de la misma, para cada uno de ellos

<sup>7</sup> Esta gráfica se obtuvo al determinar los logaritmos naturales de las unidades formadoras de colonias manejadas en la Figura 4.7

<sup>8</sup> Se tomaron las concentraciones de la DQO soluble determinadas el día 4, ya que la fase log de la biopelícula ocurrió dentro de los primeros 7 días del experimento

Los valores de  $\mu$  de la biopelícula, para las cámaras uno de ambos reactores fueron muy parecidas y coincidieron con los encontrados para organismos degradadores de detergentes, presentes en lodos activados y con *Pseudomonas* (cepa K3-2) en un cultivo suspendido, en la degradación aerobia del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2, 4-D) (Okpokwasili y Nweke, 2005). También, se observa que las velocidades específicas de crecimiento de las biopelículas en las cámaras 1 de ambos reactores fueron mayores que las de las cámaras 3, lo que indicó que hubo una biopelícula más desarrollada y se relacionó con las mayores concentraciones de sustrato carbonoso disponible, medido como DQO soluble. En el reactor A no se observaron grandes variaciones en la DQO soluble a lo largo del reactor, sin embargo la  $\mu$  de la biopelícula entre la cámara 1 y 3 fueron muy diferentes. En el reactor B la  $\mu$  de la biopelícula y la concentración de la DQO soluble se redujeron de la cámara 1 a la cámara 3. No se pudo establecer una relación entre la  $\mu$  de la biopelícula y la DQO soluble, debido a los resultados antes analizados.

### **Identificación de bacterias**

Se aislaron 30 colonias, a partir del cultivo enriquecido de la primera muestra de biopelícula tomada el día 7 de la corrida, de las cuales mediante una identificación preliminar, resultaron 11 géneros (Tablas 4.4. y 4.5; Apéndice V).

En la Tabla 4.6 se muestran los resultados de las pruebas bioquímicas que permitieron identificar las colonias bacterianas cultivables aisladas.

De esos 11 géneros, 8 fueron del Phylum VII o Proteobacterias, que además fueron las más abundantes en la biopelícula, cómo se aprecia en la gráfica de la distribución de frecuencias que aparece en la Tabla 4.4. Ellas son un grupo de bacterias Gram negativas, con una gran diversidad metabólica y representan la mayoría de bacterias con importancia clínica, industrial o agrícola (Madigan y col., 2004).

Corresponden a este Phylum VII Proteobacterias, los siguientes géneros: *Aeromonas*, *Actinobacillus*, *Eikenella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Haemophilus*, *Pasteurella* y *Yersinia*. De estos géneros tres fueron enterobacterias (*Enterobacterium*, *Klebsiella* y *Yersinia*) cuyo hábitat natural es suelo y agua, aunque pueden tener vida parasitaria. Cabe destacar que la mayoría de las *Klebsiellas* pueden fijar nitrógeno (sólo en condiciones anóxicas).

A continuación se detalla el análisis de las pruebas bioquímicas que llevaron a la identificación de las Proteobacterias, Firmicutes y Flavobacterias. Primero se reportarán las pruebas bioquímicas que el Manual Bergey reporta para el género y enseguida se comparará con los resultados encontrados en esta investigación. También, en el Apéndice IV se ofrecen más detalles bibliográficos de cada género.

## Proteobacterias

### β-Proteobacterias

#### *Eikenella*

El Manual de Bergey (Bottone y col., 1984) reporta las siguientes características morfológicas para distinguir al género<sup>9</sup>:

Forma (2)	Esporas	Reacción de Gram (1)	Movilidad (3)	Metabolismo (4 y 5)	Temperatura óptima para su crecimiento	Oxidasa (7)	Catalasa, ureasa, aginina, dihidrolasa e indol (6 y 13)	Formación de ácidos a partir de la glucosa (8)
Bacilo recto	No forma esporas	negativo	No móvil	Anaerobios facultativos	35°C a 37°C	Positiva	Negativa	No forma ácidos

El género puede estar presente en mucosas e intestino del humano; puede ser un patógeno oportunista (Bottone y col., 1984).

Los resultados obtenidos (Tabla 4.6) coincidieron con la tabla anterior de características fenotípicas de la bacteria, reportada por el Manual de Bergey.

El Manual Bergey reporta que el género *Eikenella* no tiene flagelos, pero que su movilidad es por medio de saltos (“twitching”). Para lo cual, Davey y O’Toole mencionan que son dos las características de los procariotes, que les otorgan una amplia ubicación en la biósfera, aun en nichos inhóspitos, y son 1) una amplia versatilidad metabólica y 2) la plasticidad fenotípica.

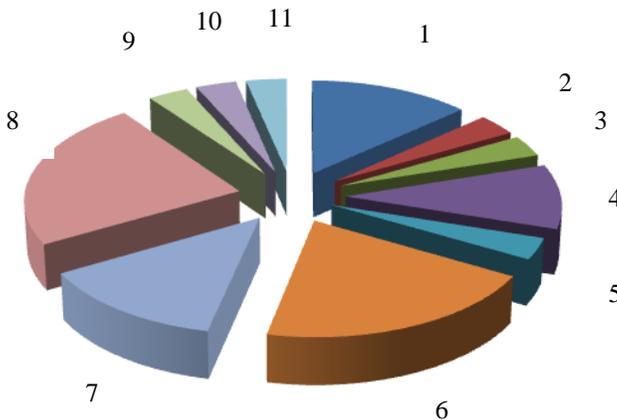
Dentro de esta última está la habilidad para posicionarse en diferentes nichos donde ellos posteriormente se propagan.

Los más comunes son la movilidad por medio de flagelos y diferentes métodos para moverse tal como el deslizamiento (“twitching”) (Davey y O’Toole, 2000).

Por lo anterior, *Eikenella* es un género que tiene capacidades muy amplias para formar biopelículas.

<sup>9</sup> Los números debajo de las pruebas bioquímicas en la tabla, corresponden a las pruebas realizadas en la presente investigación

Tabla 4.4. Géneros bacterianos y sus frecuencias, aisladas de un cultivo enriquecido de la primera biopelícula tomada del RBR

Linaje	Frecuencia <sup>10</sup>
Phylum VII: Proteoacteria β-Proteobacterias Neisseriaceae (1) <i>Eikenella</i> γ-Proteobacterias Aeromonadaceae (2) <i>Aeromonas</i> Enterobacteriaceae (3) <i>Enterobacter</i> (4) <i>Klebsiella</i> (5) <i>Yersinia</i> Pasteurellaceae (6) <i>Actinobacillus</i> (7) <i>Haemophilus</i> (8) <i>Pasteurella</i>	
Phylum VIII: Firmicutes Bacilos y Lactobacilos Staphylococcaceae (9) <i>Gemella</i> Actinobacterias Cellulomonadaceae (10) <i>Cellulomona</i>	
Phylum XIII: Flavobacteria Flavobacteriaceae (11) <i>Flavobacterium</i>	

γ-Proteobacterias

*Aeromonas*

El Manual de Bergey (Martin-Carnahan y Joseph, 1984) reporta las siguientes características morfológicas para identificar al género:

<sup>10</sup> A los números antes del género les corresponden las distribuciones de frecuencias con el mismo número en el diagrama de sectores

Forma (2)	Reacción de Gram (1)	Movilidad (3)	Metabolismo (4 y 5)	Temperatura óptima para su crecimiento	Oxidasa (7)	Catalasa, ureasa, aginina, dihidrolasa e indol (6 y 13)	Formación de ácidos a partir de la glucosa (8)	Oxida y "fermenta" a la D-glucosa (9)
Células rectas, cocobacilos y bacilos	negativo	Móvil, por medio de un flagelo polar	Anaerobios facultativos	22°C a 37°C	Positiva	Catalasa positiva	Forma ácidos	Oxida y "fermenta" a la D-glucosa

Este género está presente en agua dulce, agua clorada, en biosólidos y en lodos. Algunas especies se asocian a enfermedades de diversos animales sean de sangre fría o caliente, vertebrados o invertebrados (Martin-Carnahan y Joseph, 1984).

Los resultados obtenidos (Tabla 4.6) coincidieron con la anterior tabla de características fenotípicas de la bacteria, reportada por el Manual de Bergey. No coincidieron las siguientes pruebas: producción de ácido a partir del metabolismo de la glucosa y no oxidaron ni fermentaron a la glucosa

La presencia de flagelos, le confiere a las *Aeromonas* la capacidad de colonizar soportes, incluyendo los del reactor de biodiscos.

### *Enterobacter*

El Manual de Bergey (Richard, 1984) reporta las siguientes características morfológicas para distinguir al género:

Forma (2)	Reacción de Gram (1)	Movilidad (3)	Metabolismo (4 y 5)	Temperatura óptima para su crecimiento	Catalasa, ureasa, aginina, dihidrolasa e indol (6 y 13)	Formación de ácidos a partir de la glucosa (8)	Oxida y "fermenta" a la D-glucosa (9)	Hidrólisis de la gelatina
Células rectas	negativo	Móvil, por medio de flagelos peritrico	Anaerobios facultativos	20°C a 30°C	La mayoría de especies son ureasa negativa	Forma ácidos	"Fermenta" a la D-glucosa	La mayoría de cepas la hidroliza lentamente

Este género está presente ampliamente en la naturaleza y es común en el hombre y en animales (Richard, 1984).

Los resultados obtenidos (Tabla 4.6) coincidieron con la anterior tabla de características fenotípicas de la bacteria, reportada por el Manual de Bergey.

La presencia de flagelos, le confiere a *Enterobacter* la capacidad para colonizar soportes.

### *Klebsiella*

El Manual de Bergey (Grimont y Grimont, 1984) reporta las siguientes características morfológicas para distinguir al género:

Forma (2)	Reacción de Gram (1)	Movilidad (3)	Metabolismo (4 y 5)	Temperatura óptima para su crecimiento	Oxidasa (7)	Hidrólisis de urea	Formación de ácidos a partir de la glucosa (8)
Bacilo recto	negativo	No móvil Excepto <i>K. mobilis</i>	Anaerobios facultativos. Respiran y "fermenta"	30°C a 35°C	negativa	La mayoría de las cepas la hidrolizan	"Fermentan" a la glucosa y forma ácidos

Oxida y "fermenta" a la D-glucosa (9)	Producción de H <sub>2</sub> S (10)	Ureasa* (13)
"fermenta" a la D-glucosa	No producen	positiva

\*: Dato tomado de Bailón y col., 2003

Este género está presente en contenidos intestinales, especímenes clínicos de animales y humanos. También, presentes en agua, suelo y sobre plantas (Grimont y Grimont, 1984).

Los resultados obtenidos (Tabla 4.6) coincidieron con la anterior tabla de características fenotípicas de la bacteria, reportada por el Manual de Bergey. No coincidieron las siguientes pruebas: producción de ácido a partir del metabolismo de la glucosa, oxidó a la glucosa y la debería haber "fermentado".

### *Yersinia*

El Manual de Bergey (Bottone y col., 1984) reporta las siguientes características morfológicas para distinguir al género:

Es un género ampliamente distribuido en la naturaleza, con algunas especies adaptadas a vivir en algunas especies de animales y en el humano. Todas las especies del género *Yersinia*, reportadas en el manual Bergey son patógenas (Bottone y col., 1984).

Forma (2)	Reacción de Gram (1)	Movilidad (3)	Metabolismo (4 y 5)	Temperatura óptima para su crecimiento	Oxidasa (7)	Catalasa (6)	Formación de ácidos a partir de la glucosa (8)
Barras y cocobacilos	Negativo	Móvil con flagelo peritrico, por debajo de los 30°. Por arriba de esa temperatura son inmóviles	Anaerobios facultativos. Respiran y "fermentan"	28°C a 29°C	negativa	positiva	"Fermenta" a la glucosa y forma ácidos

Oxida y "fermenta" a la D-glucosa (9)	Producción de H <sub>2</sub> S (10)	Ureasa (13)	Hidrólisis de gelatina (14)	Indol (12)
"Fermenta" a la D-glucosa	No producen	Varía entre las especies	negativo	Varía entre las especies

Las pruebas fenotípicas que coincidieron con las reportadas con el Manual Bergey's fueron: tinción de Gram negativa, movilidad por debajo de los 30° C, crece en aire y también crece anaerobiamente, oxidasa negativa, fermenta a los carbohidratos, no produce H<sub>2</sub>S, ureasa positiva y negativa, no hidroliza a la gelatina. La prueba que no coincidió fue la fermentación de la D-glucosa con formación de ácidos, debido a que en la presente investigación dio negativa la producción de ácidos. La catalasa fue débil, y se reporta catalasa positiva.

La presencia de flagelos, le confiere al género *Yersinia* la capacidad para colonizar soportes.

### *Actinobacillus*

El Manual de Bergey (Olsen y Moller, 1984) reporta las siguientes características morfológicas para distinguir al género:

Forma (2)	Reacción de Gram (1)	Movilidad (3)	Metabolismo (4 y 5)	Temperatura óptima para su crecimiento	Oxidasa (7)	Formación de ácidos a partir de la glucosa (8)	Catalasa (6)
Cocos, ovals o barras, frecuentemente bacilos	negativo	No móvil	Aerobios, microaerobios, Anaerobios facultativos. Respiran y "fermentan"	25°C a 42°C	Positiva y débil	"Fermentan" a la glucosa y forma ácidos	Varía entre las especies

Oxida y "fermenta" a la D-glucosa (9)	Ureasa (13)	Hidrólisis de gelatina (14)	Indol (12)	Crece en agar MacConkey (11)
"Fermenta" a la D-glucosa	Varía entre las especies	La mayoría son negativos	La mayor parte de las especies son negativas	Varía entre las especies

Es un género parásito o comensal en el humano, oveja, caballos, ganado, puercos y aves (Olsen y Moller, 1984).

Coincidieron todas las pruebas bioquímicas realizadas con lo reportado por el manual de Bergey.

### *Haemophilus*

El Manual de Bergey (Kilian, 1984) reporta las siguientes características morfológicas para distinguir al género:

Forma (2)	Reacción de Gram (1)	Movilidad (3)	Metabolismo (4 y 5)	Temperatura óptima para su crecimiento	Oxidasa (7)	Catalasa (6)	Formación de ácidos a partir de la glucosa (8)
Coco bacilos o barras	negativo	No móvil	Aerobios o anaerobios facultativos. "Fermentan" a los carbohidratos	35°C a 37°C	Varía entre las especies	Varía entre las especies	"Fermentan" a la glucosa y forma ácidos acético, láctico y succínico

Oxida y "fermenta" a la D-glucosa (9)	Ureasa (13)	Indol (12)	Producción de H <sub>2</sub> S (10)
"Fermenta" a la D-glucosa	Varía entre las especies	Varía entre las especies	Varía entre las especies

Es un género parásito obligado en las mucosas de membranas de humanos y de una variedad de especies animales (Kilian, 1984).

Las colonias no produjeron ácido al metabolizar los carbohidratos y en la literatura se menciona que producen ácidos, cuando crecen usando carbohidratos. Se menciona en el manual Bergey que degradan a los carbohidratos y las colonias aisladas no los descompusieron.

### *Pasteurella*

El Manual de Bergey (Mutters y col., 1984) reporta las siguientes características morfológicas para distinguir al género:

Forma (2)	Reacción de Gram (1)	Movilidad (3)	Metabolismo (4 y 5)	Temperatura óptima para su crecimiento	Oxidasa (7)	Catalasa (6)	Formación de ácidos a partir de la glucosa (8)	Oxida y "fermenta" a la D-glucosa (9)
Coco bacilos o barras	Negativo y en ocasiones positivo	No móvil	Aerobios a micro aerófilo o anaerobios facultativos. Oxidan y "fermentan" a los carbohidratos	35°C a 37°C	Positiva	Casi siempre es positiva	"Fermenta" a la glucosa y forma ácidos	"Fermenta" a la D-glucosa

Ureasa (13)	Indol (12)	Producción de H <sub>2</sub> S (10)	Hidrólisis de la gelatina (14)	Crece en agar MacConkey (11)
Casi siempre negativo	Varía entre las especies	Negativo	No la hidroliza dentro de las 48 horas	Casi siempre negativo

Es un género parásito en vertebrados, particularmente en mamíferos y aves (Mutters y col., 1984).

Todas las pruebas coincidieron con lo reportado por el manual Bergey, excepto en: debía ser oxidasa positiva y dio negativa, no produjo ácidos y debía producir, a partir de la fermentación de los carbohidratos.

## Firmicutes

### *Gemella*

El Manual de Bergey (Reyn, A., 1984) reporta las siguientes características morfológicas para distinguir al género:

Forma (2)	Reacción de Gram (1)	Movilidad (3)	Metabolismo (4 y 5)	Temperatura óptima para su crecimiento	Oxidasa (7)	Catalasa (6)	Formación de ácidos a partir de la glucosa (8)
Cocos	Indeterminado, pero la pared celular es Gram positivo	No móvil	Aerobio o anaerobio facultativo. "Fermenta" a los carbohidratos	37°C	Negativo	Negativo	"Fermentan" a la glucosa y forma ácidos

Oxida y "fermenta" a la D-glucosa (9)	Ureasa (13)	Indol (12)	Producción de H <sub>2</sub> S (10)	Hidrólisis de la gelatina (14)
"Fermenta" a la D-glucosa	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Es un género parásito en el hombre (Reyn, 1984).

Todas las pruebas bioquímicas coincidieron excepto: debía producir ácido al “fermentar” a los carbohidratos y en esta investigación no produjo, no debía producir H<sub>2</sub>S y en esta investigación sí produjo, no debía hidrolizar la gelatina y en esta investigación si la hidrolizó.

### *Cellulomonas*

El Manual de Bergey (Stackebrandt y Keddie, 1984) reporta las siguientes características morfológicas para distinguir al género:

Forma (2)	Reacción de Gram (1)	Movilidad (3)	Metabolismo (4 y 5)	Temperatura óptima para su crecimiento	Catalasa (6)	Formación de ácidos a partir de la glucosa (8)
Barras irregulares o ligeramente curvadas y una pequeña porción de la colonia con forma cocoide	Positivo	Móvil por medio de un flagelo, usualmente polar o subpolar, unos pocos con flagelo lateral. Pocas cepas son no móviles	Aerobio, pero pueden crecer anaerobiamente. Principalmente respiran, pero también pueden fermentar	30°C	Positiva	La mayoría de las cepas producen ácidos cuando metabolizan a la glucosa

Oxida y “fermenta” a la D-glucosa (9)	Hidrólisis de la gelatina (14)
Oxidan y “fermentan” a la D-glucosa	Hidroliza débilmente a la gelatina

Es un género cuyo principal hábitat es el suelo. También, se les puede aislar en desechos con un alto contenido de celulosa (Stackebrandt y Keddie, 1984).

Todas las pruebas bioquímicas coincidieron con lo reportado en el Manual de Bergey.

La presencia de flagelos, le confiere a las *Cellulomonas* la capacidad para colonizar soportes.

### **Flavobacterias**

#### *Flavobacterium*

El Manual de Bergey (Holmes y col., 1984) reporta las siguientes características morfológicas para distinguir al género:

Forma (2)	Reacción de Gram (1)	Movilidad (3)	Metabolismo (4 y 5)	Temperatura óptima para su crecimiento	Oxidasa (7)	Catalasa (6)	Formación de ácidos a partir de la glucosa (8)
Barras con lados paralelos y extremos redondeados	Negativo	No móvil, pero se han reportado especies nadadoras (gliding)	Aerobio estricto	37°C	Frecuentemente positivo	Positivo	Oxida la glucosa y forma ácidos

Oxida y "fermenta" a la D-glucosa (9)	Ureasa (13)	Indol (12)	Producción de H <sub>2</sub> S (10)	Crece en agar MacConkey (11)
Oxidan a la D-glucosa	Varía entre las especies	Varía entre las especies	Negativo	Frecuentemente positivo

Este género está ampliamente distribuido en suelo y agua. También se encuentra en carne cruda, leche y otros alimentos y en el ambiente hospitalario y en materiales clínicos provenientes de los humanos (Holmes y col., 1984).

La mayor parte de las pruebas bioquímicas se apegaron a lo señalado en el manual Bergey, para el género analizado. Las pruebas que no coincidieron fueron: debía dar negativo el crecimiento anaerobiamente, debía dar catalasa positiva y no produjo ácido en la oxidación de los carbohidratos.

La característica común en los 11 géneros aislados es que fueron quimioorganótrofos de vida libre, con excepción de los géneros *Gemella*, *Pasteurella* y *Haemophilus* que son parásitos estrictos. También, la mayor parte de las Proteobacterias y la *Cellulomona* (que es Firmicute) aisladas tienen flagelos, nadan o se deslizan, lo cual favoreció la formación de biopelícula, a diferencia de las bacterias no nadadoras, que tienen una capacidad reducida para formarlas (O'Toole y Kolter, 1998) que, en este caso fueron los géneros parásitos y Actinobacillus.

De todas las colonias aisladas solamente una fue celulolítica, del género *Cellulomona*. Es probable que los 10 géneros restantes aislados por medio del cultivo enriquecido hayan tenido sistemas metabólicos acoplados, es decir que el producto del metabolismo de una población bacteriana fuera el sustrato de otra población (De la Torre y Casas, 1984), tal y como se observa en la naturaleza, donde las especies celulolíticas coexisten con especies no celulolíticas. Mientras que las especies celulolíticas compiten por el mismo sustrato, las especies no celulolíticas pueden competir por las celodextrinas, glucosa y productos de la fermentación de la celulosa, como el ácido acético, etanol y succinato (Lynd y col., 2002). También, las bacterias encontradas tuvieron acceso a sustratos de fácil metabolismo como lo es la glucosa, proveniente del almidón que se agrega

durante el proceso de fabricación del papel y que en este caso particular tuvo una concentración mayor que la de la celulosa.

El inóculo que se propone para el tratamiento de las aguas blancas de la industria que usa papel reciclado y que se basó en las poblaciones autóctonas del efluente de la fábrica de papel, con capacidad para formar biopelículas, es 1) Proteobacterias: *Eikenella*, *Aeromonas* y *Yersinia*, 2) Firmicutes: *Cellulomonas*. El resto de los géneros se descartaron por que son parásitos del hombre y/o por su baja o nula capacidad de movimiento.

#### **4.2. Segunda corrida experimental en el reactor de discos rotatorios**

Como ya se mencionó en el método, los resultados de la primera corrida experimental mostraron que durante la primera semana se presentó la fase exponencial de crecimiento de la biopelícula, por lo que se realizó un segundo experimento para examinar con más detalle esta etapa. A continuación se presentan los resultados obtenidos.

#### **Caracterización del agua residual utilizada**

Se trabajó con agua residual procedente de la misma planta productora de papel que usa como materia prima papel de desperdicio, que presentó las características físico-químicas tipificadas en la Tabla 4.7. El listado completo y el análisis estadístico se encuentran en los Apéndices I y VI.

#### **Demanda química de oxígeno y demanda bioquímica de oxígeno**

En la Figura 4.11 se presenta la variación de la demanda química de oxígeno en los dos reactores, durante los siete días del experimento.

En la Figura 4.12 se observa que el porcentaje de remoción de la DQO varió un 8% al cuarto día del experimento, hasta un 14% para la cámara 4 del reactor A, en el día 7 y un 8% en el día 4 del experimento hasta un 43% para la cámara 4 del reactor B al final de la corrida. Lo anterior se puede deber a que la eficiencia en la remoción de los sustratos carbonosos varía ampliamente durante los primeros días de la puesta en marcha del reactor, debido a que la inmovilización de la biopelícula fue reversible en ese periodo.

#### **Valores de pH, oxígeno disuelto y temperatura**

Los valores de pH en las cuatro cámaras de ambos reactores presentaron valores de 6.92 a 7.50, aun cuando hubo ocasiones en que el pH del influente fue de 5.39. El pH del agua residual en tratamiento al pasar de cámara en cámara se fue neutralizando debido a la acción de las bases débiles que amortiguan los cambios en éste.

Tabla 4.5. Relación de las cepas aisladas e identificación del género

Cepas No.	Género	Cepas No.	Género
1, 3, 5, 13,	<i>Haemophilus</i>	4, 6, 9, 10, 18, 25, 29	<i>Pasteurella</i>
2, 14, 19, 21, 24, 28	<i>Actinobacillus</i>	7, 11, 12, 27,	<i>Eikenella</i>
8	<i>Gemella</i>	16	<i>Enterobacter</i>
15	<i>Flavobacterium</i>	17,	<i>Yersinia</i>
20	<i>Aeromona</i>	22	<i>Cellulomonas</i>
23, 26, 30	<i>Klebsiella</i>		

Los géneros que se presentaron con mayor frecuencia fueron *Haemophilus*, *Actinobacillus*, *Pasteurella* y *Eikenella*

Tabla 4.6. Pruebas bioquímicas para identificación de bacterias

Número de cepa	Clave	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	C1.2dchica	-	B	-	+	+	D	-	-	-	-	D	-	-	+
2	C1.5c	-	B	-	+	+	D	+	-	-	+	+	-	-	-
3	C7.1Ad1	-	B	-	+	+	+	-	-	F	-	-	-	+	-
4	C1.4c gran	-	B	-	+	+	D	+	-	-	-	-	-	-	-
5	C9.4bchic	-	B	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
6	C7.1Ac	-	B	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-
7	C9.4c	-	B	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-

En filas: 1: Tinción de Gram, 2: Forma, 3: Movilidad, 4: Crecimiento aerobio, 5: Crecimiento anaerobio, 6: Catalasa, 7: Oxidasa, 8: Glucosa ácido, 9: Carbohidratos (F/o/-), 10: Producción de H<sub>2</sub>S, 11: Crece en Agar MacConkey, 12: Indol, 13: Ureasa, 14: Hidrólisis de gelatina. B= bacilo, C= coco, D= débil, F= "fermenta", o= oxida, -= prueba negativa y para el caso de tinción de Gram es Gram negativa, += reacción de Gram

Continúa.....

Tabla 4.6. Pruebas bioquímicas para identificación de bacterias (Continuación)

Número de cepa	Clave	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
8	C1.2c	-	C	-	+	+	D	-	-	F	+	D/-	-	-	+
9	C9.4c	-	B	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+
10	C1.2a4	-	B	-	+	+	+	-	-	-	-	D/-	-	-	-
11	C7.3b	-	B	-	+	+	-	+	-	-	-	D/-	-	-	-
12	C9.3b	-	B	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-
13	C9.2b	-	B	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	D	+
14	C1.3a	-	B	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-
15	C7.6a	-	B	-	+	+	-	+	-	O	-	D/-	-	-	-
16	C7.3c	-	B	+	+	+	+	-	+	F	+	+	-	+	-
17	C1.2a2	-	B	-	+	+	D	-	-	F	-	-	-	-	-
18	C72achica	-	B	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
19	C9.4d	-	B	-	+	+	D	+	-	-	-	+	-	D	-
20	C3.2a	-	B	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+
21	C1.4b2	-	B	-	+	+	D	+	-	-	-	+	-	+	-
22	C1.2dm	+	B	-	+	+	+	-	-	-	+	D/-	-	D	-
23	C9.5a	-	B	-	+	+	+	-	-	O	-	+	-	+	-
24	C1.4b3chic	-	B	-	+	+	D	+	-	-	-	+	-	+	-

En filas: 1: Tinción de Gram, 2: Forma, 3: Movilidad, 4: Crecimiento aerobio, 5: Crecimiento anaerobio, 6: Catalasa, 7: Oxidasa, 8: Glucosa ácido, 9: Carbohidratos (F/o/-), 10: Producción de H<sub>2</sub>S, 11: Crece en Agar MacConkey, 12: Indol, 13: Ureasa, 14: Hidrólisis de gelatina. B= bacilo, C= coco, D= débil, F= "fermenta", o= oxida, -= prueba negativa y para el caso de tinción de Gram es Gram negativa, += reacción de Gram positiva

Continúa.....

Tabla 4.6. Pruebas bioquímicas para identificación de bacterias (Continuación)

Número de cepa	Clave	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
25	C9.3c	-	B	-	+	+	D	-	-	-	-	+	-	-	-
26	C1.1d	-	B	-	+	+	+	-	-	O	-	+	-	D	-
27	C7.5a	-	B	-	+	+	-	-	-	-	+	D	-	+	+
28	C9.3a	-	B	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-
29	C3.1b	-	B	-	+	+	+	-	-	-	-	D	-	-	+
30	C11e	-	B	-	+	+	+	-	-	O	-	+	-	D	-

En filas: 1: Tinción de Gram, 2: Forma, 3: Movilidad, 4: Crecimiento aerobio, 5: Crecimiento anaerobio, 6: Catalasa, 7: Oxidasa, 8: Glucosa ácido, 9: Carbohidratos (F/o/-), 10: Producción de H<sub>2</sub>S, 11: Crece en Agar MacConkey, 12: Indol, 13: Ureasa, 14: Hidrólisis de gelatina. B= bacilo, C= coco, D= débil, F= "fermenta", o= oxida, -= prueba negativa y para el caso de tinción de Gram es Gram negativa, += reacción de Gram positiva

Tabla 4.7. Características fisicoquímicas del agua residual usada en la segunda corrida experimental

Parámetro	Media aritmética ± D.E.	Mediana	Número de muestras analizadas
Demanda química de oxígeno soluble, mgL <sup>-1</sup>	798.84±90.85	737.80	10
Demanda bioquímica de oxígeno soluble, mgL <sup>-1</sup> (DBO <sub>5</sub> ) <sup>11</sup>	364.76	-	1
Relación de biodegradabilidad: Demanda bioquímica de oxígeno soluble última, mgL <sup>-1</sup> (DBO <sub>5</sub> )/ Demanda química de oxígeno soluble, mgL <sup>-1</sup>	0.45	-	-
pH	5.72±0.2	5.70	10
Oxígeno disuelto, ppm	0.78±0.52	0.68	10
Temperatura, °C	21.20±2.65	21	5

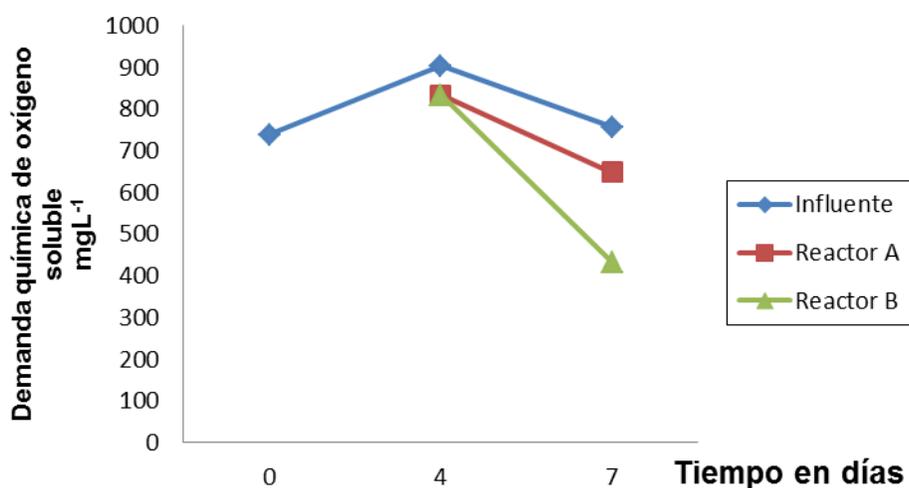


Figura 4.11. Variación de la demanda química de oxígeno en los reactores A y B, durante la segunda corrida experimental<sup>12</sup>

<sup>11</sup> Se determinó la DBO<sub>5</sub> de una sola muestra correspondiente al influente del tiempo cero

El oxígeno disuelto en el agua residual presentó valores menores a 1 ppm. Posteriormente, a lo largo de su avance por las cámaras de ambos reactores, este valor aumentó hasta alcanzar 5.95 ppm, en promedio. La temperatura en los reactores estuvo entre 17 y 19°C. Estos tres parámetros analizados tuvieron valores adecuados para el desarrollo de los microorganismos y, por tanto, de la biopelícula en los reactores de discos rotatorios.

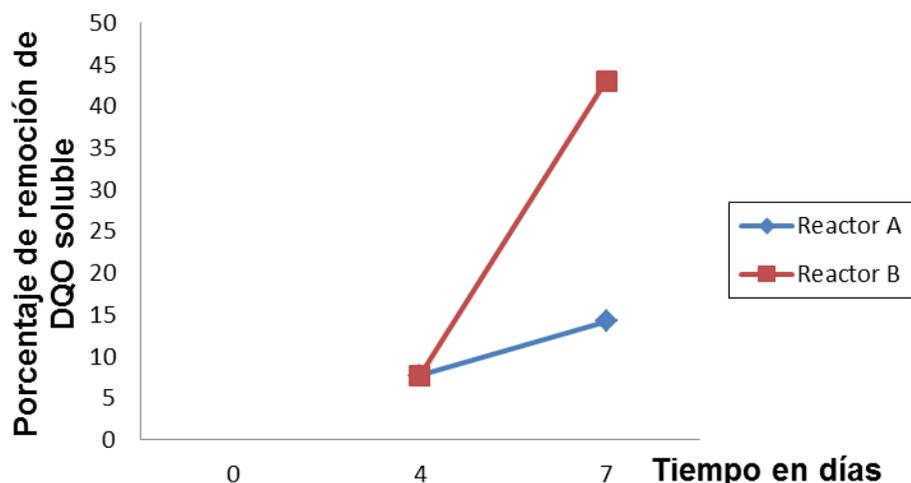


Figura 4.12. Eficiencias de remoción de DQO en el RBR en un lapso de 7 días

### Formación de la biopelícula

El desarrollo de la biopelícula se determinó por medio del recuento de células viables (UFC / 7 cm<sup>2</sup>). Las muestras se tomaron diariamente en un área radial del disco. Los datos obtenidos se presentan en la Figura 4.13. En la Figura 4.14 se muestra la gráfica semilogarítmica del recuento de células viables contra el tiempo. Se observa que la aclimatación y la fase de crecimiento exponencial de los microorganismos ocurrieron durante el primer día del experimento. Después del primer día, la velocidad de crecimiento de la biopelícula se estabilizó, lo cual indicó que las primeras horas de la colonización de los discos del reactor fueron las más importantes en la puesta en marcha de este sistema de tratamiento biológico.

El influente con el que se trabajó tuvo  $8.175 \times 10^6$  UFC / mL. Al cuarto día de iniciado el experimento se presentó un máximo de colonias de bacterias, en ambos reactores (142 millones en el reactor A y 417 millones en el reactor B; Figura 4.13). Sin embargo, la inmovilización fue reversible, ya que para el quinto día el número de unidades formadoras de colonias se redujo en 97% en el reactor A y 99% en el reactor B. Esto hizo evidente que, durante la primera semana, la

<sup>12</sup> Los datos de DQO soluble que se graficaron fueron los del licor mezclado de la cámara 4 de ambos reactores, ya que los datos resultantes del efluente fueron una mezcla de ellos y se consideró que no fueron representativos de la eficiencia de los reactores

colonización de los discos tuvo un carácter reversible. Characklis y colaboradores explican que lo anterior se debe a que al inicio del desarrollo de la biopelícula la interacción de las células con el soporte es electrostática y de baja energía (20 a 50  $\text{kJmol}^{-1}$ ) y sólo una pequeña fracción de las células se adsorbe de manera irreversible, mediante interacciones electrostáticas con una energía de enlace 10 veces mayor a las de la unión reversible (40 a 400  $\text{kJmol}^{-1}$ ). También, dichas células inmovilizadas irreversiblemente inician la excreción de polímeros extracelulares, que ayudan a mantener unida a la biopelícula (Characklis y Marshall, 1990; Characklis, 1984; Casablanca, 1998).

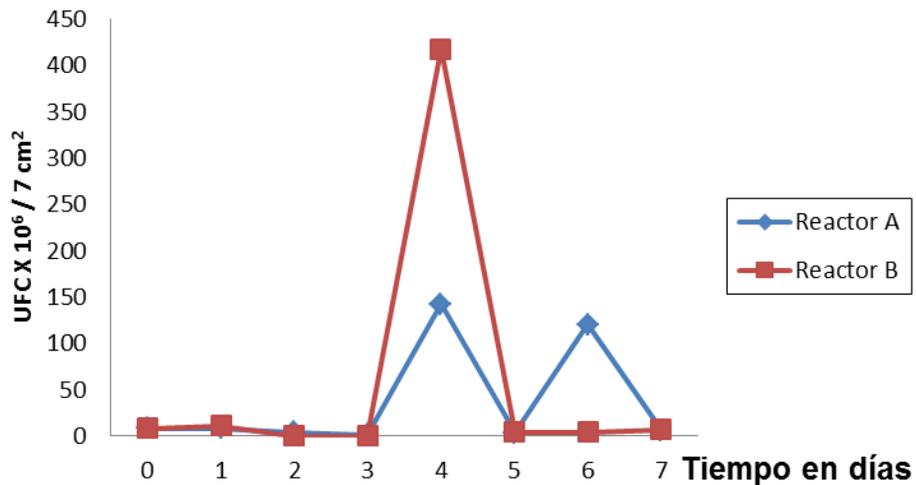


Figura 4.13. Biomasa medida como recuento de células viables (UFC/ área muestreada en los discos del reactor biológico rotatorio) en el tiempo.

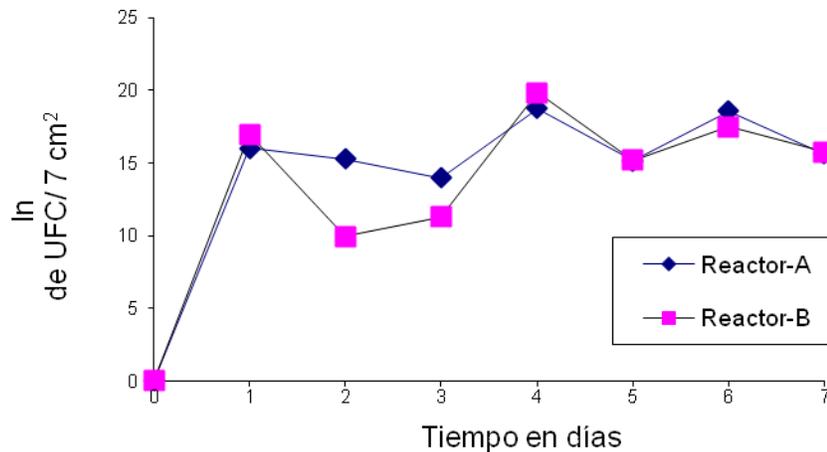


Figura 4.14. Logaritmo de la biomasa medida como conteo celular (UFC/ área muestreada en los discos del reactor biológico rotatorio) en el tiempo

Se recomienda que en el tratamiento de las aguas blancas con el reactor biológico rotatorio se mantengan las siguientes condiciones físico químicas del agua de alimentación, para lograr un desarrollo y mantenimiento óptimo de la biopelícula: un intervalo de pH 5.5 a 8.5; un intervalo de temperatura entre 9 y 45°C; una concentración de fuente de carbono con un mínimo de 15 ppm de azúcares libres y / o 120 ppm de DBO (este valor de la concentración del sustrato carbonoso es el recomendado para el tipo de agua tratada y reactor usado) y ausencia de compuestos tóxicos, como los biocidas o los que producen valores de pH muy ácidos o muy alcalinos (como hidróxido de sodio y ácido sulfúrico).

## **5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

## Conclusiones

Considerando los objetivos generales de esta investigación referentes al diseño de un inóculo bacteriano, por medio de la identificación de las poblaciones aerobias mesófilas cultivables de una biopelícula tomada durante la fase de crecimiento exponencial en un reactor biológico rotatorio que trató aguas blancas de la industria del papel reciclado, el análisis del efecto de la concentración de la DQO soluble en la velocidad específica de crecimiento de las comunidades bacterianas mesófilas cultivables de la biopelícula de las cámaras 1 y 3 de los reactores A y B y el estudio del efecto de la concentración de azúcares libres en la densidad de bacterias aerobias mesófilas cultivables, se llegó a las siguientes conclusiones:

### Primera corrida experimental

1. Las eficiencias en la remoción de la DQO soluble variaron de 13% en la primera semana a 44% en el día 35 en el reactor A y de 13 a 35% para el reactor B y estuvieron muy por debajo de lo reportado en la literatura donde los valores típicos son de 70 a 90% de remoción para este parámetro.
2. Lo anterior se pudo deber a la presencia de sustancias tóxicas, como ácidos, álcalis y compuestos microbicidas que se usan de manera habitual durante los mantenimientos de las máquinas de papel, que provocaron un constante desprendimiento de la biopelícula.
3. Al término de la cuarta semana la eficiencia en la remoción de la  $DBO_5$  soluble se redujo de 77% (eficiencia en la primera semana) a 53%, lo que coincidió con una reducción abrupta en el recuento de las células viables en la biopelícula, con lo que se confirmó que la remoción de los compuestos biodegradables es llevada a cabo principalmente por la biopelícula.
4. El azúcar libre fue el sustrato carbonoso más abundante y disponible para los microorganismos, presentándose en un rango de concentraciones de 11.52 a 46.47 ppm. La presencia de estos azúcares libres se explicó por la utilización de mezclas de almidones en el proceso de producción del papel.
5. Se encontró que la reducción en la concentración de los azúcares libres en el influente provocó que la eficiencia en la remoción de la  $DBO_5$  soluble se redujera, al igual que el conteo de células viables en la biopelícula.
6. El pH del agua blanca tuvo un valor promedio de 8.55 y en ocasiones presentó un valor de 11.20, lo que se pudo deber al uso del NaOH en el proceso de destintado del papel reciclado.
7. El pH dentro de ambos reactores mostró una tendencia a un pH neutro, presentando un intervalo de 6.67 a 7.79, lo que se pudo deber a la acción

de los carbonatos ( $\text{CO}_3^{-2}$ ), bicarbonatos ( $\text{HCO}_3^-$ ) y el ácido carbónico ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ), que se forman en el agua residual por la generación de  $\text{CO}_2$  por parte de los microorganismos. Esta generación de  $\text{CO}_2$  juega un papel muy importante en el equilibrio del pH del agua en tratamiento dentro del reactor.

8. Los valores de oxígeno disuelto (intervalo de 5.03 a 8.52) y de temperatura (intervalo de 16.20 a 17.75) mostraron valores adecuados para un desarrollo óptimo de los microorganismos inmovilizados y los del licor mezclado.
9. En la gráfica semilogarítmica del recuento de las células viables contra el tiempo, se identificó que la fase exponencial de crecimiento de la biopelícula ocurrió durante los primeros siete días del experimento, seguida de una fase estacionaria, que fue del día 7 hasta el término del estudio.
10. El uso del recuento de células viables fue una herramienta útil, en el análisis del crecimiento de la biopelícula.
11. Se aislaron e identificaron 11 géneros de bacterias aerobias mesófilas cultivables. De ellas 8 fueron del Phylum Proteobacterias, Gram (-) que representan la mayoría de importancia clínica, industrial o agrícola. Los géneros fueron: *Aeromonas*, *Actinobacillus*, *Eikenella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Haemophilus*, *Pasteurella* y *Yersinia*. De ellos, *Eikenella*, *Aeromona*, *Enterobacter* y *Yersinia* son móviles, ya sea por flagelos o por brincos.
12. Del Phylum Firmicutes se encontró a *Gemella* y a *Cellulomona*, de las cuales solo ésta última es móvil.
13. Del Phylum Flavobacteria se encontró al género *Flavobacterium*, que no tiene movilidad.
14. Los géneros de bacterias que tienen movilidad propiciaron la formación de la biopelícula, según O'Toole y Kolter (1998).
15. El inóculo que se propone para el tratamiento de las aguas blancas de la industria que usa papel reciclado es el siguiente: 1) Proteobacterias: *Eikenella*, *Aeromonas* y *Yersinia*, 2) Firmicutes: *Cellulomonas*. El resto de los géneros se descartaron por que son parásitos del hombre y/o por su baja o nula capacidad de movimiento.

#### Segunda corrida experimental

1. La eficiencia en la remoción de la DQO soluble fue semejante en ambos reactores en el día cuatro (8%), sin embargo en el día 7 fueron muy

diferentes, ya que para el reactor A fue de 14% y la del reactor B fue de 43%.

2. Las anteriores eficiencias no se pudieron relacionar con los valores del recuento de células viables, ya que los conteos de células más altos se dieron en el día 4.
3. Durante las primeras 24 horas, el crecimiento de la biopelícula tuvo un carácter exponencial
4. En los 7 días del experimento, la inmovilización de los microorganismos fue reversible, lo que se vio reflejado en las variaciones abruptas en el recuento de células viables.
5. La curva de crecimiento de la biopelícula presentó dos fases de crecimiento, la exponencial y la estacionaria. La aclimatación, o fase *lag*, tuvo que darse durante las primeras horas después de haberse iniciado el experimento.

## Recomendaciones

Se sugiere que el tratamiento de las aguas blancas en el reactor biológico rotatorio, se mantengan las siguientes condiciones físico químicas del agua de alimentación, para lograr un desarrollo y mantenimiento óptimo de la biopelícula: un intervalo de pH 5.5 a 8.5; un intervalo de temperatura de 9 a 45°C; una concentración de sustrato carbonoso con un mínimo de 20 ppm de azúcares libres, 200 ppm de DBO<sub>5</sub> y ausencia de compuestos tóxicos, como los biocidas o los que producen valores de pH muy ácidos o muy alcalinos (como hidróxido de sodio y ácido sulfúrico).

Como parte del seguimiento y operación normal de una planta de tratamiento que utilice un RBR, se debe contar con una bitácora de seguimiento de la operación y mantenimiento de la máquina de papel, misma que será analizada por los operadores de la planta de tratamiento de las aguas residuales, para determinar en qué momento se desviará el agua hacia un tratamiento químico o de otro tipo diferente al tratamiento biológico.

Con lo anterior se podrá contar con un funcionamiento óptimo del reactor biológico rotatorio.

Dado que transcurrió un buen número de años desde que se realizó esta experimentación y el conocimiento ha avanzado a pasos agigantados, y que el problema que originó esta investigación sigue vigente, ya que las plantas papeleras siguen teniendo aguas residuales contaminantes con algunas

agravantes producto de la modernidad, sería interesante realizar esta experimentación nuevamente pero usando técnicas modernas de seguimiento en línea de las variables en los RBR, así como realizar la identificación de los organismos responsables de la degradación de los compuestos contaminantes que permita instrumentar un sistema microbiano resistente a los biocidas que, regularmente, se adicionan para impedir la proliferación de hongos que dejan manchas negras en la hoja de papel.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Álvarez, A. 1986. Diseño y construcción de un reactor biológico rotatorio para el tratamiento aerobio de efluentes. Tesis profesional (Ingeniería química). UNAM. Facultad de Química. México D.F. México.
- Álvarez, A., Escárcega, C.A., Pulido, R., y Durán-de-Bazúa, C. 1985. Diseño, construcción y modelamiento matemático de un reactor biológico rotatorio para tratar efluentes. Presentado en el Seminario de Ingeniería Química Ambiental. UNAM. Facultad de Química. México D.F. México.
- Anónimo. 2006. Redes internacionales (Consulta: Marzo 15, 2006). Dirección electrónica: <http://www.smurfitcellulosedupin.com>
- Anónimo. 2011. Universidad del País Vasco (Consulta: Septiembre 25, 2011). Dirección electrónica: <http://www.sc.ehu.es/iawfemaf/archivos/materia/industrial/libro-3.PDF>
- Anónimo. 2012. Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo. Industria del papel y de la pasta de papel. (Consulta: Enero 2, 2012). Dirección electrónica: <http://www.bvsde.paho.org/bvsast/e/fulltext/enciclopedia/72.pdf>
- Anónimo. 2013a. Información Jurídica del Instituto de Investigaciones Jurídicas de la UNAM (Consulta Mayo 1, 2013). Dirección electrónica: <http://info4.juridicas.unam.mx/ijure/fed/15/11.htm?s=>
- Anónimo. 2013b. Enrique de la Madrid Cordero. La Situación de la Industria de la Celulosa y el Papel en el Mundo. Financiera Rural (Consulta Mayo 12, 2013). Dirección electrónica: <http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Documents/Articulos%20FR/Microsoft%20Word%20-%20art%C3%ADculo%20Celulosa%20y%20Papel.pdf>
- Anónimo. 2013c. Sistemas miniaturizados API. (Consulta Mayo 17, 2013). Dirección electrónica: [http://www.ucv.ve/fileadmin/user\\_upload/facultad\\_farmacia/catedraMicro/10\\_SistemasAPI.pdf](http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_SistemasAPI.pdf)
- APHA – AWWA – WPCF. 1985. Standard methods for examination of water and wastewater. 16 th. Ed. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation. Washington, DC, EEUU.
- Bailón, L., Cruz, R., y Cervantes, A. 2003. Atlas de pruebas bioquímicas para identificar bacterias. Fes-Zaragoza. UNAM. México.
- Benson, DA., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, DJ., Ostell, J., and Wheeler, DL. 2004. GenBank: update. Nucleic. Acid. Res. 32: D23-D26.

- Bergey, J.G., Holt, N.R., Krieg, P., and Sneath, H. 1993. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9a ed. Williams and Wilkins. Baltimore, EEUU.
- Bishop, P., and Kinner, N. 1986. Aerobic fixed film processes. In: *Biotechnology: Microbial degradations*. Vol. 8. Ed. Schonborn, W. VCH, pp 113-176. Weinheim, Alemania.
- Bottone, J. Jackson, F., and Goodman, Y. 1984. In: *Bergey's Manual of systematic bacteriology*. 1984. Vol. 1. Ed: Krieg, N., Holt, J. Williams & Wilkins. EEUU.
- Branda, S., Vik, Á., Friedman, L., and Kolter, R. 2005. Biofilms: the matrix revisited. *Trends. Microbiol.* 13: 20-26.
- Braun, S., Morales, R., Méndez, E., Orriols, M., Ramos, S., y Triantafilo, V. 2002. Infecciones por *Pasteurella* spp: reporte de 20 casos en un período de quince años. *Rev. Chil. Infectol.* 19: 74-78.
- Brindis-Olvera, F.N., Orihuela-García, R., y Durán-de-Bazúa, C. 1993. Evaluación económica preliminar de la instalación de una planta anaerobia-aerobia para depurar aguas blancas de la industria papelera. Informe Técnico de Proyecto PAP-01-93. Pub. Facultad de Química, UNAM. México D.F. México.
- Brock, T., Smith, D., y Madigan, M. 1987. *Microbiología*. 4a Ed. Prentice Hall. México D.F. México.
- Bryers, J. 1988. Modeling biofilm accumulation. In *Physiological models in microbiology*. Ed. Bazin, M. y Prosser, J. CRC. Boca Raton. FL. EEUU.
- Bryers, J.D., and Characklis, W. 1981. Early fouling biofilm formation in a turbulent flow system: Overall kinetics. *Wat. Res.* 15:483-491.
- Bryers, J., and Characklis, W. 1982. Processes governing primary biofilm formation. *Biotechnol. Bioeng.* XXIV:2451-2476.
- Cámara Nacional de las Industrias de la Celulosa y del Papel. 2008. (Consulta: junio 3, 2009). Dirección electrónica: <http://wwwcamaradelpapel.com.mx>
- Casablanco, G. 1998. Biocatalizadores inmovilizados. En: *Ingeniería Bioquímica*. Ed. Casablanco, G. y Santín, L. Síntesis. Madrid, España.
- Caspi, J., Barak, Y., Haimovitz, D., Irwin, D., Lamed, R., Wilson, D., and Bayer, E. 2009. Effect of linker length and dockerin position on conversion of a *Thermobifida fusca* endoglucanase to the cellulosomal mode. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 7335-7342.

- Claus, W. 1989. Understanding microbes. A laboratory textbook for microbiology. Ed. Freeman. Nueva York, EEUU.
- Cohen-Stuart, M.A., Scheutjeans, G., and Fleer, J. 1980. Polydispersity effects and the interpretation of polymer adsorption isotherms. *J. Polymer Sci. (Part. B)*. 18: 559-573.
- Conner, A. H. 1995. Size exclusion chromatography of cellulose and cellulose derivatives. In: *Handbook of size exclusion chromatography*. Ed. Wu, Chi-san. Chromatographic Science Series. Cap.13. 69: 331-352. Marcel Dekker, Inc. Nueva York, EEUU.
- Characklis, W. 1984. Biofilm development: A process analysis. In *Microbial adhesion and aggregation*. Ed. K.C. Marshall. Springer Verlag. Nueva York, EEUU.
- Characklis, W. 1981. Bioengineering Report. Fouling Biofilm Development: A process analysis. *Biotechnol. Bioeng.* 23:1923-1960.
- Characklis, W., and Marshall, K. 1990. *Biofilms*. Wiley and Sons, Nueva York, EEUU.
- Christensen, B.E., and Characklis, W.G. 1990. Physical and chemical properties of biofilms. In *Biofilms*. Characklis, W.G. y Marshall, K.C. eds. Pp. 93-130. Wiley and Sons, Nueva York. EEUU.
- Davey, M., and O'Toole, G. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 847-867.
- De la Torre, M., and Casas, C. 1984. Isolation and characterization of a symbiotic cellulolytic mixed bacterial culture. *Appl Microbiol Biotechnol.* 19: 430-434.
- Delfín-Alcalá, I. 2002. Estudios de biodegradación de residuos celulósicos y lignocelulósicos: pasto, paja, algodón y residuo celulósico de pañal desechable. Tesis Maestría en Ciencias (Química Ambiental). Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas, UNAM. México D.F. México.
- Deng, W., Xi, D., Mao, H., and Wanapat, M. 2008. The use of molecular techniques based on ribosomal RNA and DNA for rumen microbial ecosystem studies: a review. *Mol. Biol. Rev.* 35: 265-274
- Devlieghere, F., Francois, K., Vermeulen, A., and Debevere, J. 2009. Chapter 3. Predictive microbiology. En *Predictive modeling and risk assessment*. Costa, R. y Kristbergsson, K. eds. Pp. 29-35. Springer Science&Business Media. (Consulta: enero 25, 2011). Dirección electrónica:

[http://books.google.com.mx/books?id=J11jIU0S5PYC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](http://books.google.com.mx/books?id=J11jIU0S5PYC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)

- Díaz, G., y Wachter, R. 2003. Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 45: 30-40.
- DOF. 1996a. Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. Diario Oficial de la Federación. Poder Ejecutivo Federal. México D.F. México.
- DOF. 1996b. Norma Oficial Mexicana NOM-002-SEMARNAT-1996, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a los sistemas de alcantarillado urbano o municipal. Diario Oficial de la Federación. Poder Ejecutivo Federal. México D.F. México.
- DOF. 1997. Norma Oficial Mexicana NOM-085-SEMARNAT-1994, Contaminación atmosférica-fuentes fijas-para fuentes fijas que utilizan combustibles fósiles sólidos, líquidos o gaseosos o cualquiera de sus combinaciones, que establece los niveles máximos permisibles de emisión a la atmósfera de humos, partículas suspendidas totales, bióxido de azufre y óxidos de nitrógeno y los requisitos y condiciones para la operación de los equipos de calentamiento indirecto por combustión, así como los niveles máximos permisibles de emisión de bióxidos de azufre en los equipos de calentamiento directo por combustión. . Diario Oficial de la Federación. Poder Ejecutivo Federal. México D.F. México.
- Donlan, RM. 2002. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* (Consulta: enero 18, 2008). Dirección electrónica: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol8no9/02-0063.htm>
- Donlan, RM., and Costerton, JW. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15: 167-193.
- Durán-de-Bazúa, C., and Hartmann, L. 1980. Produktion und Verwertbarkeit aus Prozessabwasser der Nixtamalization. *Wiss. Abschlussber.*, 15 Intls. Seminar. Julio. Universidad de Karlsruhe, pp. 214-232, Karlsruhe, Alemania.
- Durán-de-Bazúa, C., and Hartmann, L. 1981. Food industry effluents, conversion from wastes into useful products. Presented at the 2<sup>nd</sup> European Congress on Biotechnol. Abril 6-10. Eastbourne, Gran Bretaña.
- Durán-Domínguez-de-Bazúa, M.C. 1987. Die biologische Behandlung und Verwertung von Abwässern der Maiverarbeitung in Mexiko. Reihe 15: Umwelttechnik. Nr. 51. VDI Verlag. ISBN 3-18-145115-0. Düsseldorf, RFA.

- Durán-de-Bazúa, C. 1994. Tratamiento biológico de aguas residuales de la industria química y de proceso. Pub. Facultad de Química, UNAM. México D.F. México.
- Eckenfelder, Jr. W. 1989. Industrial water pollution control. 2<sup>a</sup> ed. McGraw Hill International Editions. Singapore.
- Egli, T., Lendenmann and Snozzi, M. 1993. Kinetics of microbial growth with mixtures of carbon sources. *Antonie van Leeuwenhoek*. 63: 289-298.
- Envirex Inc en Metcalf and Eddy. 1991. Wastewater Engineering. Treatment, disposal, reuse. 3a. ed. McGraw-Hill International Editions. Singapore.
- Escárcega, C., y Pulido, R. 1986. Modelo cinético para un RBR usado en un tratamiento aerobio. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM. México, D.F. México.
- Faleiro, P. 2010. Formación de biopelículas por "Escherichia coli" y su correlación con factores de virulencia: prevención y actividad de antimicrobianos frente a organismos planctónicos y asociados a biopelículas. Tesis de doctorado. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.
- Fernández-Villagómez, G. 1992. Estudios cinéticos de sistemas anaerobios en un reactor de película fija con aguas blancas de la industria del papel. Tesis de Doctorado en Ingeniería Ambiental. Co-Dirigida por la Profa. Carmen Durán con el Prof. L. Göttching de la Universidad Técnica de Darmstadt, RFA y la asesoría técnica del Dr. Pedro Martínez de la FI-UNAM. Facultad de Ingeniería, UNAM. México, D.F. México.
- Fitch, M., and Murphy, J. 1999. Biological fixed-film systems. *Water Environment Research*. 71: 638-656.
- Fletcher, M. 1977. The effects of culture concentration and age, time, and temperature on bacterial attachment to polystyrene. *Can. J. Microbiol.* 23:1-6.
- Fletcher, M., and Loeb, G. 1979. Influence of substratum characteristics on the attachment of a marine pseudomonad to solid surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 67-72.
- Friedrich, V., Wintzingerode, U., Göbel, B., and Stackebrandt, E. 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* 21: 213-229.
- Fundación ICA, A.C. 2003. Ingeniería de los sistemas de tratamiento y disposición de aguas residuales. México. (Consulta: julio 14, 2006). Dirección electrónica: [http://www.capac.org/web/Portals/0/biblioteca\\_virtual/doc003/](http://www.capac.org/web/Portals/0/biblioteca_virtual/doc003/)

- Gavrilescu, M., and Chisti, Y. 2005. Biotechnology –a sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnol. Adv.* 23: 471-499.
- Gautam, S., Bundela, P., Pandey., jamaluddin., awasthi, M., and Sarsaiya, S. 2012. Diversity of cellulolytic microbes and the biodegradation of municipal solid waste by a potential strain. *Int. J. Microbiol.* 2012: 325907.
- Gerhardt, P., Murray, R., and Castilow, E. 1981. Manual of methods for general bacteriology. American Society for Microbiology. Washington, D.C. EEUU
- Goksoyr, J., and Eriksen, J. 1980 *Microbial Enzymes and Biocversions*. Ed. A.H. Rose. Economic Microbiology. V-5. Academic Press. London, Great Britain.
- Golla, P., and Overcamp, T. 1990. Simple solutions for steady-state biofilm reactors. *J. Environ. Eng.* 116: 829-836.
- González-Brambila, M., y López-Isunza, F. 2007. Transporte de masa y reacción en una biopelícula. *Rev. Mex. Ingen. Quim.* 6: 127-136.
- González, J., y Montelongo, I. 1999. *Introducción al Derecho Ambiental Mexicano*. 2ª Ed. Universidad Autónoma Metropolitana. Azcapotzalco. México, D.F., México.
- Gottschalk, G.1986. *Bacterial Metabolism*. 2a Ed. Springer – Verlag. Nueva York, EEUU.
- Griffin, P. and Findlay, G. 2000. Process and engineering improvements to rotating biological contactor design. *Water Sci. Technol.* 41: 137-144.
- Grimont, P., and Grimont, F. 1984. En: *Bergey's Manual of systematic bacteriology*. Vol. 1. Ed: Krieg, N., Holt, J. Williams & Wilkins. EEUU.
- Gupta, P., Samant, K., and Sahu, A. 2012. Isolation of Cellulose-degrading bacteria and determination of their cellulolytic potencial. *Int. J. Microbiol.* 2012: 578925.
- Hernández, A., García, E., y Rodríguez A. 1999. Celulosomas: Sistemas multienzimáticos. *Rev. Soc. Quím. Méx.* 43: 137-142.
- Holmes, B., Owen, R., and McMeekin. 1984. En: *Bergey's Manual of systematic bacteriology*. Vol. 1. Ed. Krieg, N., Holt, J. Williams & Wilkins. EEUU.
- Huang, S., Sheng, P., and Zhang, H. 2012. Isolation and identification of cellulolytic bacteria from the gut of *Holotrichia parallela* larvae (coleopteran: scarabaeidae). *Int. J. Mol. Sci.* 13: 2563-2577.

- Ioan-Valentin Moise., Bratu, E., Georgescu, R., Virgolici, M., Alexandru, M., Negut, C., and Cutruvinis, M. 2009. Sinteza studiilor de caz privind tratamentul cu radiatii ionizante pentru documentele de archiva. Centrul de Iradierii Tehnologice.IRASM. (Consulta: junio 8, 2010). Dirección electrónica: [www.iras.ro/arcon/pub/sa1\\_ifin.pdf](http://www.iras.ro/arcon/pub/sa1_ifin.pdf)
- June, H., Qi, M., Gong, J., Egbosimba, E., and Forsberg, C. 2007. Outer membrane proteins of *Fibrobacter succinogenes* with potential roles in adhesion to cellulose and in cellulose digestion. J. of Bacteriol. 189: 6806-6815.
- Jurasek, L. 1979. Enzymic Hydrolysis of Pretreated Aspen Wood. Dev. Ind. Microbiol. 20:177-183.
- Kevin, A., Kahmark, J., and Unwin, P. 1999. Pulp and paper effluent management. Water. Environ. Res. 5: 836-852.
- Kilian, M. 1984. En: Bergey's Manual of systematic bacteriology. Vol. 1. Ed. Krieg, N., Holt, J.. Williams & Wilkins. EEUU.
- Kinner, N., Balkwill, D., and Bishop, P.1982. The microbiology of rotating biological contactor films. En 1<sup>st</sup> International Conference on Fixed-film Biological Processes. Vol. I. Kings Island, Ohio, EEUU.
- Kirk, J., Beaudette, L., Hart, M., Moutoglis., Klironomos, J., Lee, H., and Trevors, J. 2004. Methods of studying soil microbial diversity. J. of Microbiol. Meth. 58: 169-188
- Kroukamp, O., Dumitrache, R., and Wolfaardt, G. 2010. Pronounced effect of the nature of the inoculum on biofilm development in flow systems. Appl. Environ. Microbiol. 76: 6025-6031.
- Kyte, J. 2007. Structure in protein chemistry. 2<sup>nd</sup> ed. Garland Science.Taylor & Francis Group. EEUU.
- Lee, S., Bollinger, J., Bezdicek, D., and Ogram, A. 1996. Estimation of the abundance of an unculturable soil bacterial strain by a competitive quantitative PCR method. Appl. Environ. Microbiol. 62: 3787-3793.
- Lee, H., Euiso, C., Zuwhan, Y., and Yong, K. 2008. Microbial structure and community of RBC biofilm removing nitrate and phosphorus from domestic wastewater. J. Microbiol. Biotechnol. 18: 1459-1469.
- Lehninger, A. 1982. Bioquímica. 2a Ed. Omega, S. A. Barcelona, España.

- Libernoche, D. 1983. Removal of color from kraft mill waste waters with cultures of white-rot fungi and with immobilized mycelium of *Coriolus versicolor*. *Biotechnol. Bioeng.* 25: 2055.
- Loosdrecht, V., Heijnen, J., Eberl, H., Kreft, J., and Picioreanu, C. 2002. Mathematical modelling of biofilm structures. *Antonie van Leeuwenhoek*. 81: 245-256.
- Luna-Pabello, V.M., Aladro-Lubel, M.A., y Durán-de-Bazúa, C. 1994. Efecto del sustrato sobre las poblaciones de ciliados en un reactor de biodiscos. Casos tipo: Nejayote, vinazas y aguas blancas de papel. Serie: Química ambiental del agua. Vol. 3. Pub. PIQAYQA, Facultad de Química, UNAM. ISBN 968-36-3244-0. México D.F. México.
- Luonsi, A. 1999. Forest industry wastewater. En 6<sup>th</sup> IAWQ Symposium on forest industry wastewaters, Tampere, Finlandia.
- Lynd, L., Weimer, P., Zyl, W., and Pretorius, I. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66:506-577.
- MacFaddin, J. 2000. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3a Ed. Editoria Médica Panamericana. Argentina.
- Madigan, M., Martinko, J., y Parker, J. 2004. Brock. Biología de los microorganismos. 10a ed. Pearson Prentice Hall. España.
- Mandels, M., and Reese, E. 1963. Inhibition of cellulases and  $\beta$ -glucosidase. In *Advances in enzymatic hydrolysis of cellulose and related materials*. Ed. E.T. Reese, Oxford: Pergamon Press Ltd Pp. 115-157. Nueva York. EEUU.
- Mandels, M., Stenger, D., and Andreotti, R. 1975. In: *Proceedings of the SITA Symposium on Enzymatic Hydrolysis of Cellulose*. Ed. M. Bailey, T. M. Enary y M. Linko. P. 81. Aulanko, Finlandia.
- Márquez, A., y Guevara, E. 2004. Descripción y evaluación del funcionamiento de un sistema de tratamiento de aguas residuales en una industria avícola. *Rev. Ing. U.C.* 11: 92-101.
- Martin-Carnahan and Joseph, S. 1984. En: *Bergey's Manual of systematic bacteriology*. Vol. 1. Ed. Krieg, N., Holt, J.. Williams & Wilkins. EEUU.
- Martín-Cereceda, M., Álvarez, A., Serrano, S., and Guinea, A. 2001. Confocal and light microscope examination of protozoa and other microorganisms in the biofilms from a rotating biological contactor wastewater treatment plant. *Acta Protozool.* 40: 263-272.

- Martínez, D., Rodríguez, M. 2005. Tratamiento de aguas residuales con Metlab<sup>®</sup>. Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Azcapotzalco. Reverté. México.
- Massachusetts Department of Public Health. 2008. Yersiniosis (*Yersinia* spp. Other than *Yersinia Pestis*). (Consulta: agosto 30, 2010). Dirección electrónica: [www.state.nj.us/health/Cd/manual/yersiniosis.pdf](http://www.state.nj.us/health/Cd/manual/yersiniosis.pdf)
- Metcalf and Eddy. 1991. Wastewater Engineering. Treatment disposal, reuse. 3a. ed. McGraw-Hill International Editions. Singapur. 3
- Metcalf y Eddy. 1996. Ingeniería de aguas residuales. Tratamiento, vertido y reutilización. Vol. I. McGraw-Hill. México.
- Miranda, R. 2009. Caracterización y eliminación de la material disuelta y coloidal en la fabricación del papel reciclado. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Madrid. (Consulta electrónica: mayo 15, 2011). Dirección electrónica: <http://eprints.ucm.es/9414/1/T30873.pdf>
- Molin, G., Nilsson, I., and Stenson, L. 1982. Biofilm build-up of *Pseudomonas putida* in a chemostat at different dilution rates. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 15: 218-222.
- Montgomery, H., y William, H. 1996. Probabilidad y estadística para ingeniería y ciencias. 6a. ed. CECSA. México, D.F. México.
- Mutters, R., Christensen, H., and Bisgaard, M. 1984. In: Bergey's Manual of systematic bacteriology. Vol. 1. Krieg, N., Holt, J. Editores. Williams & Wilkins. EEUU.
- Nachtergaele, A. 1989. The benefits of cationic starches for the paper industry. Starch/Stärke. 41: 27-31.
- Nalco. 1989. Water Handbook. Kemmer, F. Ed. Nalco Chemical Company. EEUU.
- Norouzian, M., Deloya, M. 1984. Estudio del comportamiento de una unidad de biodiscos estructuralmente modificada. Instituto de Ingeniería. UNAM. 170 p. México, D.F. México.
- Okpokwasili, G., and Nweke, C. 2005. Microbial growth and substrate utilization kinetics. Afr. J. Biotechnol. 5: 305-317.
- Olsen I., and Moller, K. 1984. In: Bergey's Manual of systematic bacteriology. Vol. 1. Ed. Krieg, N., Holt, J.. Williams & Wilkins. EEUU.
- O'Toole, G. 2003. To build a biofilm. J. Bacteriol. 185: 2687-2689.

- O'Toole, G., and Kolter, R. 1998. The initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* wcs365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis. *Mol. Microbiol.* 28: 449-461.
- Pham, Hoa, T., Quyen, D., Nghiem, N., and Vu, T. 2011. Cloning, expression, purification, and properties of an endoglucanasa gene (glycosyl hidrolasa family 12) from *Aspergillus niger* VTCC-F021 in *Pichia pastoris*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 21: 1012-1020.
- Pedroza-de-Brenes, R., and Durán-de-Bazúa, C. 1987. RBC Characteristics for nejayote aerobic treatment. *Environm. Technol. Letters*, 8(11):579-588.
- Piciooreanu, C., Van Loosdrecht, M., and Heijnen, J. 2001. Two-Dimensional Model of biofilm detachment caused by internal stress from liquid flow. *Biotechnol. Bioeng.* 72: 205-218.
- Pirt, J. 1975. Principles of microbe and cell cultivation. Blackwell Scientific Publications. Oxford. 274 p.
- Pitts, B., Hamilton, MA., Zelter, N., and Stewart, PS. 2003. A microtiter-plate sceening method for biofilm disinfection and removal. *J. Microbial. Methods.* 54: 269-276.
- Powell, M., and Slater, N. 1982. Removal rates of bacterial cells from glass surfaces by fluid shear. *Biotechnol. Bioeng.* 24: 2527-2537.
- PROFEPA. 2010. Informe Anual. PROFEPA. Poder Ejecutivo Federal. México, D.F. México.
- Quintanar-Ferriz, H.M. 1993. Estudio técnico de la degradación de los materiales disueltos presentes en las aguas residuales de la industria papelera empleando microorganismos floculados. Título de Ingeniero Químico. Facultad de Química, UNAM. México, D.F., México.
- Ramalho, R.S. 1991. Introduction to wastewater treatment processes. 2<sup>a</sup> Ed. Academic Press, London, Great Britain.
- Ripley, R. 2005. Principles and Techniques of Molecular Biology, bioinformatics and basic techniques. In: *Biochemistry and Molecular Biology*. 6<sup>th</sup> Ed. Ed: Wilson, K. and Walker, J. Cambridge University Press. Hong Kong.
- Reese, E., Mandels, M., and Weiss, A. 1972. Cellulose as a Novel Energy Source. *Adman. Brioche. Eng.* 2:181-200.
- Richard, C. 1984. En: *Bergey's Manual of systematic bacteriology*. Vol. 1. Ed: Krieg, N., Holt, J. Williams & Wilkins. EEUU.

- Rittmann, B. E., Trinet., F., Amar, D., and Chang, H.T. 1992. Measurement of the activity of a biofilm: Effects of surface loading and detachment on a three phase liquid fluidized bed reactor. *Watt. Si, Techo.* 26: 585-594.
- Rusos, S., y Perraud-Gaime, I. 1996. Fisiología de microorganismos utilizados en procesos de “fermentación” en medio sólido. En *Fronteras en Biotecnología y Bioingeniería*. E. Galindo, ed. Pp 341-348. Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería. México.
- Rybeck, L., Grethlein, H., and Wolkin, R. 1989. Fermentation of cellulosic substrates in batch and continuous culture by *Clostridium thermocellum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 3131-3139.
- Salomé, J., y Goikoetxea, A., 2006. Gestión del agua en la industria papelera. (Consulta: marzo 17, 2008). Dirección electrónica: <http://www.sc.ehu.es/iawfemaf/archivos/princip.htm>
- Sawhney, R., and Berry, V. 2009. Bacterial biofilm formation, pathogenicity, diagnostics, and control: An overview. *Indian J. Med. Sci.* 63: 313-321.
- Sawyer, C.N., y McCarty, P.L. 1978. *Chemistry for Environmental Engineering*. 3<sup>a</sup> Ed. McGraw – Hill. 532 pp. Nueva York. EEUU.
- Schroll, C., Barken, K., Krogfelt, K., and Struve, C. 2010. Role of type 1 and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation. *BMC Microbiol.* 10:179.
- Stackebrandt, E., and Keddie, M. 1984. In: *Bergey's Manual of systematic bacteriology*. Vol. 1. Ed: Krieg, N., Holt, J. Williams & Wilkins. EEUU.
- Toutain, C., Caiazza, N., and O'Toole, G. 2004. In: *Microbial Biofilms*. Ed: Ghannoum, M. y O'Toole, G. American Society for Microbiology Press. EEUU.
- Torsvik, V., and Ovreas. 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* 5: 240-245.
- Updegraff, D. M. 1969. Semimicro determination of cellulose in biological materials. *Analyt. Biochem.* 32: 420-424.
- Vanhooren, H. 2002. Modeling for optimization of biofilm wastewater treatment processes: A complexity compromise. Tesis doctoral. Universiteit Gent. Países Bajos.
- Vázquez-García, M.L. 1991. Estudio del tratamiento aerobio de aguas blancas de la industria papelera en un reactor de biodiscos. Título de Ingeniero Químico. Facultad de Química, UNAM. México D.F. México.

- Vázquez-García, M.L., Bekris-Palafox, J., y Durán-de-Bazúa, C. 1990. Tratamiento aerobio de aguas residuales de la industria del papel empleando reactores biológicos rotatorios. Informe Técnico de Trabajo PAP-01-91. Pub. Facultad de Química, UNAM. México D.F. México.
- Vejborg, R., and Klemm, P. 2009. Cellular chain formation in *Escherichia coli* biofilms. *Microbiol.* 155: 1407-1417
- Vieira, M., and Melo, L. 1999. Intrinsic kinetics of biofilms formed under turbulent flow and low substrate concentrations. *Bioprocess. Eng.* 20: 369-375.
- Welter, A., Romero, J., Grumelli, Y., Sánchez, J., y Ascar, G. 2006. La biopelícula en los procesos RBC. Universidad de ingeniería. Universidad Católica de Córdoba, Argentina. (Consulta: mayo 12, 2008). Dirección electrónica: <http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/argentina14/welter.pdf>
- Wimpenny, J. Coombs, J., and Lovitt, R. 1984. Growth and interactions of microorganisms in spatially heterogeneous ecosystems. In: *Current perspectives in microbial ecology*. American Society for Microbiology. Washington, D.C. EEUU.
- Wood, J.M. 1980. The interaction of microorganisms with ion exchange resins. In *Microbial adhesion to surfaces*. Ed. Berkeley, R.C.W., Lynch, J.M., Melling, J., Rutter, P.R., Vincent, B. Ellis Horwood. Pp. 163-185. Chichester, Reino Unido.

# **APÉNDICE I**

## **DATOS EXPERIMENTALES**

Primera corrida experimental (hoja 1/6)

Demanda química de oxígeno

Tiempo (en días)	Influyente mgL <sup>-1</sup>	Reactor A			Reactor B		
		Cámara 1 (mgL <sup>-1</sup> )	Cámara 3 (mgL <sup>-1</sup> )	Efluente (mgL <sup>-1</sup> )	Cámara 1 (mgL <sup>-1</sup> )	Cámara 3 (mgL <sup>-1</sup> )	Efluente (mgL <sup>-1</sup> )
0	498.99	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4	542.50	533.40	531.90	173.33	378.97	195.24	212.14
9	535.50	472.21	477.89	464.75	472.21	446.20	449.93
14	556.57	444.60	417.15	421.13	533.09	453.88	406.87
17	465.19	392.05	397.31	380.69	441.17	380.83	383.64
21	521.81	406.50	364.58	359.46	403.70	368.07	334.60
24	457.82	453.83	326.67	311.73	462.83	508.61	341.80
28	484.50	459.39	374.53	362.28	463.43	533.90	425.52
31	521.25	491.61	444.85	445.38	473.76	447.49	444.53
35	635.97	404.33	338.97	357.42	429.83	407.21	413.87

ND= no determinado

Demanda bioquímica de oxígeno

Tiempo (en días)	Influyente mgL <sup>-1</sup>	Reactor A			Reactor B		
		Cámara 1 (mgL <sup>-1</sup> )	Cámara 3 (mgL <sup>-1</sup> )	Efluente (mgL <sup>-1</sup> )	Cámara 1 (mgL <sup>-1</sup> )	Cámara 3 (mgL <sup>-1</sup> )	Efluente (mgL <sup>-1</sup> )
0 <sup>1</sup>	165.00	ND	ND	ND	ND	ND	ND
7 <sup>1</sup>	399.00	150.00	163.00	91.00	133.00	124.00	91.00
14 <sup>1</sup>	279.00	105.00	80.00	75.00	100.00	75.00	75.00
21 <sup>1</sup>	177.00	75.00	60.00	ND	83.00	64.00	ND
28 <sup>1</sup>	198.00	102.00	60.00	94.00	122.00	157.00	94.00

Primera corrida experimental (Hoja 2/6)

Tiempo (en días)	Influyente mgL <sup>-1</sup>	Reactor A			Reactor B		
		Cámara 1 (mgL <sup>-1</sup> )	Cámara 3 (mgL <sup>-1</sup> )	Efluente (mgL <sup>-1</sup> )	Cámara 1 (mgL <sup>-1</sup> )	Cámara 3 (mgL <sup>-1</sup> )	Efluente (mgL <sup>-1</sup> )
35 <sup>1</sup>	223.00	70.00	58.00	81.00	115.5	97.00	81.00
42 <sup>2</sup>	402.27	85.91	54.09	62.73	85.45	70.91	62.73

<sup>1</sup> .- Demanda bioquímica de oxígeno al quinto día (DBO<sub>5</sub>)

<sup>2</sup> .- Demanda bioquímica de oxígeno última, tomada al 18 día

ND= no determinado

Azúcares libres

Tiempo (en días)	Influyente mgL <sup>-1</sup>	Reactor A		Reactor B	
		Cámara 1 (mgL <sup>-1</sup> )	Efluente (mgL <sup>-1</sup> )	Cámara 1 (mgL <sup>-1</sup> )	Efluente (mgL <sup>-1</sup> )
0	ND	ND	ND	ND	ND
4	20.55	ND	ND	ND	ND
7	37.09	ND	ND	ND	ND
14	32.20	16.97	ND	13.54	ND
18	15.50	19.22	15.90	22.85	23.57
21	46.47	23.14	19.46	19.18	20.30
25	11.52	21.15	19.52	17.18	15.78
28	17.74	16.61	16.22	17.45	15.04
32	29.77	36.14	31.95	42.25	35.04
35	25.10	20.73	ND	ND	17.85

ND= no determinado

Primera corrida experimental (Hoja 3/6)

Celulosa en sólidos

Tiempo (en días)	Influyente mgL <sup>-1</sup>	Reactor A		Reactor B	
		Cámara 1 (mgL <sup>-1</sup> )	Efluente (mgL <sup>-1</sup> )	Cámara 1 (mgL <sup>-1</sup> )	Efluente (mgL <sup>-1</sup> )
0	20.40	ND	ND	ND	ND
4	15.54	ND	ND	ND	ND
7	22.19	ND	ND	ND	ND
14	22.66	22.10	ND	22.61	ND
18	1.87	4.27	2.93	2.33	4.17
21	10.81	2.09	5.24	1.86	2.09
25	ND	ND	ND	ND	ND
28	ND	ND	ND	ND	ND
32	27.14	6.03	22.15	16.56	ND
35	22.89	6.79	31.88	8.60	34.51

ND= no determinado

pH

Tiempo (en días)	Influyente	Reactor A			Reactor B		
		Cámara 1	Cámara 3	Efluente	Cámara 1	Cámara 3	Efluente
0	7.90	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4	7.47	8.14	8.46	8.44	8.43	8.78	8.70
9	8.09	8.09	9.04	9.03	9.11	8.97	8.82
14	11.00	9.66	9.09	9.11	9.90	8.94	9.06
17	9.83	9.48	9.42	9.10	9.38	9.34	9.13

Continúa.....

Primera corrida experimental (Hoja 4/6)

Tiempo (en días)	Influyente	Reactor A			Reactor B		
		Cámara 1	Cámara 3	Efluente	Cámara 1	Cámara 3	Efluente
21	9.75	ND	ND	ND	ND	ND	ND
28	7.78	8.70	8.42	8.62	8.61	9.03	8.81
35	8.10	ND	ND	ND	8.50	ND	ND

ND= no determinado

Oxígeno disuelto

Tiempo (en días)	Influyente (ppm)	Reactor A			Reactor B		
		Cámara 1 (ppm)	Cámara 3 (ppm)	Efluente (ppm)	Cámara 1 (ppm)	Cámara 3 (ppm)	Efluente (ppm)
0	0.03	ND	ND	ND	ND	ND	ND
9	0.03	6.57	7.44	7.69	6.51	7.60	7.01
14	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
17	0.04	5.03	7.07	8.52	5.88	7.64	7.56
21	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
28	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
35	0.40	5.99	7.38	7.57	7.22	7.54	7.89

ND= no determinado

Primera corrida experimental (Hoja 5/6)

Temperatura del agua residual

Tiempo (en días)	Influente °C	Reactor A			Reactor B		
		Cámara 1 °C	Cámara 3 °C	Efluente °C	Cámara 1 °C	Cámara 3 °C	Efluente °C
0	17.50	ND	ND	ND	ND	ND	ND
9	19.27	17.26	16.84	17.02	17.54	17.01	17.40
14	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
17	19.15	17.75	15.99	16.30	17.25	16.15	16.02
21	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
28	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
35	20.70	17.45	16.85	16.50	16.80	16.55	16.20

ND= no determinado

Masa seca de biopelículas

Tiempo (en días)	Reactor A		Reactor B	
	Cámara 1 (gramos/ 7 cm <sup>2</sup> )	Cámara 3 (gramos/7 cm <sup>2</sup> )	Cámara 1 (gramos/ 7 cm <sup>2</sup> )	Cámara 3 (gramos/ 7 cm <sup>2</sup> )
7	0.011	0.004	0.007	0.004
14	0.012	0.003	0.008	0.006
21	0.009	0.016	0.009	0.009
28	0.008	0.017	0.014	0.004
35	0.007	0.010	0.012	0.008

Primera corrida experimental (Hoja 6/6)

Unidades formadoras de colonias en biopelículas

Tiempo (en días) <sup>a</sup>	Reactor A		Reactor B	
	Cámara 1 (UFC x 10 <sup>6</sup> / 7 cm <sup>2</sup> )	Cámara 3 (UFC x 10 <sup>6</sup> / 7 cm <sup>2</sup> )	Cámara 1 (UFC x 10 <sup>6</sup> / 7 cm <sup>2</sup> )	Cámara 3 (UFC x 10 <sup>6</sup> / 7 cm <sup>2</sup> )
7	16	0.09	5	0.2
14	5	0.048	0.04	0.13
21	52	0.29	28	0.23
28	0.3	0.1	0.19	0.11
35	0.46	0.5	0.55	0.14

<sup>a</sup> La primera biopelícula se tomó a los siete días después de iniciado el experimento. En el tiempo cero el inóculo presentó 9.345 x 10<sup>6</sup> UFC/ mL

Segunda corrida experimental (Hoja 1/4)

Demanda química de oxígeno

Tiempo (en días)	Influyente mgL <sup>-1</sup>	Reactor A mgL <sup>-1</sup>				Reactor B mgL <sup>-1</sup>				Efluente de A y B mgL <sup>-1</sup>
		C1	C2	C3	C4	C1	C2	C3	C4	
0	737.80									
4	902.72	695.41	826.35	902.72	833.15	902.33	833.10	833.25	833.20	902.06
7	756.00	565.39	647.19	647.92	648.19	721.50	648.94	720.69	432.89	630.35

Demanda bioquímica de oxígeno (DBO<sub>5</sub>)

Tiempo (en días)	Influyente (ppm)
0	364.76

Segunda corrida experimental (Hoja 2/4)

pH

Tiempo (en días)	Influyente	Reactor A			Reactor B		
		Cámara 1	Cámara 3	Efluente	Cámara 1	Cámara 3	Efluente
0	5.94	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
1	5.63	7.01	7.35	7.25	7.14	7.39	7.35
4	5.70	6.97	7.42	7.47	7.10	7.43	7.43
5	5.44	6.67	7.34	7.40	6.86	7.46	7.47
7	5.94	7.05	7.75	7.79	6.99	7.64	7.76

Oxígeno disuelto

Tiempo (en días)	Influyente (ppm)	Reactor A			Reactor B		
		Cámara 1 (ppm)	Cámara 3 (ppm)	Efluente (ppm)	Cámara 1 (ppm)	Cámara 3 (ppm)	Efluente (ppm)
0	1.72	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
1	0.79	4.50	5.89	5.77	5.95	6.01	5.81
4	0.35	5.13	4.20	4.30	4.16	4.75	4.80
5	0.40	4.11	3.66	2.06	2.06	4.18	3.72
7	0.68	4.01	4.84	5.30	4.02	5.19	4.84

Segunda corrida experimental (Hoja 3/4)

Temperatura

Tiempo (en días)	Influyente (°C)	Reactor A			Reactor B		
		Cámara 1 (°C)	Cámara 3 (°C)	Efluente (°C)	Cámara 1 (°C)	Cámara 3 (°C)	Efluente (°C)
0	23	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
1	22	19	19	19	19	19	19
4	21	18	18	18	18	18	18
5	20	17	17	17	17	17	17
7	20	17	17	17	17	17	17

N.D.= no determinado

Sólidos totales

Tiempo (en días)	Influyente mgL <sup>-1</sup>	Reactor A mgL <sup>-1</sup>				Reactor B mgL <sup>-1</sup>				Efluente De A y B mgL <sup>-1</sup>
		C1	C2	C3	C4	C1	C2	C3	C4	
0	523.0									
4	735.0	671.0		524.0		411.0		672.0		

Segunda corrida experimental (Hoja 4/4)

Conteo de células viables (unidades formadoras de colonias: UFC). Muestras tomadas de la biopelícula, en un área de 7 cm<sup>2</sup>, que se desarrolló sobre los discos del reactor biológico rotatorio.

Tiempo días	Influente UFC X 10 <sup>6</sup>	Reactor A				Reactor B			
		Cámara 1 UFC X 10 <sup>6</sup> /7 cm <sup>2</sup>	Cámara 2 UFC X 10 <sup>6</sup> /7 cm <sup>2</sup>	Cámara 3 UFC X 10 <sup>6</sup> /7 cm <sup>2</sup>	Cámara 4 UFC X 10 <sup>6</sup> /7 cm <sup>2</sup>	Cámara 1 UFC X 10 <sup>6</sup> /7 cm <sup>2</sup>	Cámara 2 UFC X 10 <sup>6</sup> /7 cm <sup>2</sup>	Cámara 3 UFC X 10 <sup>6</sup> /7 cm <sup>2</sup>	Cámara 4 UFC X 10 <sup>6</sup> /7 cm <sup>2</sup>
0	8.175	N.D.							
1		0.007	4.450	2.350	1.72	1.000	5.060	2.985	1.770
2		1.697	1.425	1.300	0.001	0.008	0.008	0.002	0.003
3		0.410	0.350	0.310	0.306	0.006	0.070	0.005	0.001
4		31.500	1.315	9.700	100.000	184.000	107.000	124.250	1.967
5		1.290	0.995	0.660	0.910	1.250	0.820	1.040	0.880
6		23.650	30.000	35.000	31.950	19.000	7.450	0.860	13.000
7		3.276	0.595	1.345	1.000	3.505	2.020	0.970	0.610

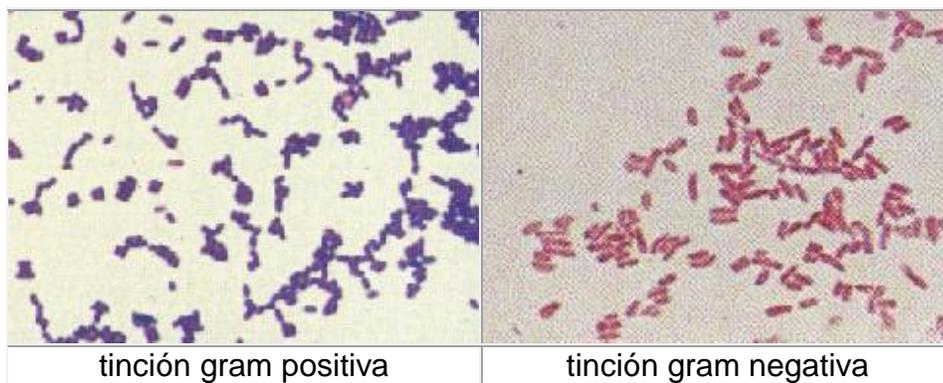
## **APÉNDICE II ESTUDIOS MICROBIOLÓGICOS**

## Tinción de Gram

Una tinción de Gram es un método para teñir microorganismos (bacterias) utilizando una serie especial de colorantes. Para este examen, se tiñe una muestra de la cepa a analizar, que debe ser de una cepa previamente aislada y luego se examina bajo el microscopio. Este método se puede aplicar a casi cualquier muestra y es una de las técnicas más comúnmente utilizadas para el diagnóstico rápido de infecciones bacterianas.

Primero se tiñe con cristal de violeta, luego yodo, luego se decolora, finalmente se tiñe con safranina y se examina bajo el microscopio para verificar la presencia de bacterias. El color, número y morfología de las células ayuda en la identificación del organismo.

En la fotografía de abajo se muestra la tinción de Gram en la que se observa la presencia de cocos gram positivos dispuestos en parejas y cadenas (*Streptococcus*) y en cúmulos (*Staphylococcus aureus*)



Descripción de la técnica: Se seca y fija la preparación del modo ordinario. Se tiñe durante 5 min con violeta de genciana; se elimina el exceso de colorante y se aplica la solución yodada de Gram durante 2 o 3 min. Se lava con alcohol de 95° y luego con agua. Las bacterias que no toman el colorante se llaman gram-negativas. Éstas se tiñen a continuación con fucsina o safranina.

## Prueba de la movilidad

La movilidad es una característica importante al hacer una determinación bacteriana, pues indirectamente señala que el microorganismo posee flagelos, rasgo taxonómico que es difícil poner de manifiesto por otros métodos, incluidos los de tinción. Existen varias técnicas que permiten demostrar la movilidad bacteriana. Entre ellas destacan:

- Las que se visualizan microscópicamente,
- las que se observan por cultivos semisólidos

a) Por observación microscópica 1.- Entre porta objetos y cubre objetos se deposita una gota de cultivo en medio líquido o la suspensión de una colonia en suero fisiológico, sobre un portaobjetos. Colocar un cubreobjetos encima y mirar al microscopio utilizando objetivo seco de gran aumento. Esta técnica se puede utilizar para microorganismos anaerobios, siempre que se efectúe con rapidez y se observe la porción central del montaje. Presenta el inconveniente, para observadores poco expertos, de confundir el movimiento activo con el movimiento browniano de la célula

2.- Gota pendiente.- Consiste en colocar una gota de suspensión bacteriana en el centro de un cubreobjetos, depositando además vaselina sólida en sus cuatro extremos. Seguidamente se coloca un portaobjetos excavado o de Koch sobre el cubre objeto, de modo que la gota quede en la concavidad del portaobjetos. Después se le da la vuelta, con lo que la gota queda suspendida. La observación se hace de igual forma que la anterior y presenta el mismo inconveniente.

3.- En tubo capilar cerrado.- Las bacterias anaerobias pueden observarse en fresco llenando un tubo capilar con una suspensión y cerrando inmediatamente los dos extremos con plastilina. El capilar se observa al microscopio con objetivo de 40 X aumentos. Tiene el mismo inconveniente que los anteriores.

b) Por cultivo en medio semisólido. Los medios de cultivo para la observación de la movilidad contienen 0.4 por 100 de agar, lo que permite ver el desplazamiento de las bacterias, si existe. Medio de cultivo. El medio de cultivo más recomendado es el de Edwards-Ewing, ya que permite el desarrollo de muchas bacterias. Fórmula en g/L de agua destilada:

- Peptona:10g
- Extracto de carne:3g
- Cloruro de sodio:5g
- Agar:4g

El medio se prepara de forma convencional, calentando los componentes hasta solubilizarlos. Se distribuye en tubos, se esteriliza en autoclave y se deja enfriar en posición vertical. Para observar mejor el desplazamiento de los microorganismos aerobios se puede añadir al medio  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  de cloruro de trifeniltetrazolio, que se reduce a formazán por acción de las deshidrogenasas bacterianas, quedando de color rojo la zona donde haya crecimiento. Sin embargo, las sales de trifeniltetrazolio pueden actuar inhibiendo el crecimiento de algunas bacterias muy exigentes

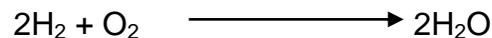
Inoculación. Se siembra por picadura en el centro del medio, introduciendo la aguja con cuidado hasta unos 0.6 cm del fondo y extrayéndola siguiendo el mismo recorrido de entrada. Incubación. La temperatura de incubación dependerá de la bacteria estudiada, ya que muchos organismos no son móviles a su temperatura óptima de crecimiento ( $35-37^{\circ}\text{C}$ ) y lo son a  $18-25^{\circ}\text{C}$ . Se deben inocular dos tubos

simultáneamente, incubando uno a 35-37°C y el otro a 22-25°C realizando lecturas diarias durante diez días. Interpretación de los resultados. El “test” de movilidad se interpreta por un examen macroscópico del medio. Si el microorganismo es móvil, se producirá una zona de difusión del crecimiento a los lados de la línea de inoculación. Si la bacteria es inmóvil, crecerá sobre la línea de siembra.

Hay algunos medios de cultivo de identificación que permiten observar, además de una o dos pruebas bioquímicas, si el microorganismo sembrado es móvil o no. Entre ellas destacamos el sulfhídrico-indol-movilidad, el movilidad- indol-ornitina y el manitol-movilidad-nitrato. En ellos la movilidad se interpretará antes de adicionar los reactivos.

### **Prueba de los requerimientos de oxígeno (bacterias aerobias) o bacterias anaerobias, que proliferan en ausencia de aire**

Las bacterias anaerobias solo proliferan en atmósferas libres de oxígeno, por lo que la prueba consistió en crecer a las diferentes bacterias aisladas, en cajas Petri con medio estándar y aisladas en bolsas, selladas. La técnica dice que se debe usar un sistema anaerobio gas Pak, dentro del cual se ponen, además de las cajas Petri sembradas con las bacterias a probar, tabletas generadoras de hidrógeno, que al reaccionar con el oxígeno del aire se convierte a agua. La reacción es la siguiente:



El desarrollo o no de las bacterias en esas condiciones indica si son anaerobias.

**Prueba del catabolismo de la glucosa, oxidativo o “fermentativo”.**- Esta prueba se realiza en un caldo base con rojo fenol. El medio es estable, de composición uniforme y permite hacer determinaciones con base en un viraje de color. Cuando el microorganismo metaboliza el azúcar estudiado, el pH del medio baja, entonces el rojo fenol vira de rojo a amarillo.

Composición del rojo fenol: peptona, 12g; extracto de carne, 1 g; cloruro de sodio, 5 g; rojo fenol, 0.018 g; azúcar, 10 g; agua destilada, 1000 mL.

Preparación: Disolver los componentes en un baño de agua caliente y ajustar el pH a 7.5. Dispensar en tubos y esterilizar en autoclave a 121°C, durante 15 minutos.

**Prueba de la catalasa.**- Se utiliza para comprobar la presencia de la enzima catalasa que se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo. La principal excepción es *Streptococcus*.

Una prueba de rutina de la catalasa a temperatura ambiente puede hacerse siguiendo dos técnicas:

Método del portaobjetos (recomendado):

Con el asa de siembra recoger el centro de una colonia pura de 18-24 horas y colocar sobre un portaobjetos limpio de vidrio.

Agregar con gotero o pipeta Pasteur una gota de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% sobre el microorganismo sin mezclarlo con el cultivo (MacFaddin, 2000).

Observar la formación inmediata de burbujas (resultado positivo).

Desechar el portaobjetos en un recipiente con desinfectante.

Si se invierte el orden del método (extender la colonia sobre el agua oxigenada) pueden producirse falsos positivos.

Método del tubo de ensayo:

Agregar 1mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% directamente a un cultivo puro de agar en "slant" densamente inoculado.

Observar la formación inmediata de burbujas (resultado positivo).

Precauciones: Si se utilizan para esta prueba cultivos procedentes de agar sangre, se debe tener la precaución de no retirar algo de agar con el asa al retirar la colonia ya que los eritrocitos del medio contienen catalasa y su presencia dará un falso resultado positivo.

**Prueba de la oxidasa-** Esta prueba sirve para determinar la presencia de enzimas oxidasas. La reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromo oxidasa que activa la oxidación del citocromo que se reduce por el oxígeno molecular que produce agua o peróxido de hidrógeno según la especie bacteriana. El oxígeno actúa, por tanto, como aceptor final de electrones en la cadena transportadora de electrones. Por lo general, el sistema citocromo oxidasa sólo se encuentra en los organismos aerobios, algunos anaerobios facultativos y, excepcionalmente, en algún micro aerófilo (*Vibrio fetus*), pero los anaerobios estrictos carecen de actividad oxidasa. Asimismo, la presencia de oxidasa va ligada a la producción de catalasa, ya que ésta degrada el peróxido de hidrógeno que se produce como consecuencia de la reducción del oxígeno y cuya acumulación es tóxica (op. Cit.).

La prueba de la oxidasa se usa sobre todo para:

Identificar todas las especies de *Neisseria* (+)

Diferenciar *Pseudomonas* de los miembros oxidasa negativos de las enterobacterias.

El reactivo de la oxidasa más recomendado es la solución acuosa al 1% de diclorhidrato de tetrametil-*p*-fenilendiamina (reactivo de Kovacs). Es menos tóxico y mucho más sensible que el correspondiente compuesto dimetilo (reactivo de Gordon y McLeod), pero es más caro. Este reactivo tiñe las colonias oxidasa positivas de color lavanda que vira gradualmente a púrpura-negruzco intenso.

Realización de la prueba:

Método en placa directa

Agregar directamente 2-3 gotas de reactivo a algunas colonias. No inundar toda la placa y no invertirla.

Observar los cambios de color. Con el reactivo de Kovacs la reacción se produce en unos 10-15 segundos, mientras que con el de Gordon y McLeod es dentro de los 10-30 minutos.

Método indirecto sobre papel

Colocar un trozo de papel de filtro de 3x3cm aproximadamente en una placa de Petri.

Agregar 2-3 gotas del reactivo de Kovacs en el centro del papel.

Extender con el asa de siembra una colonia sobre el papel impregnado.

La reacción de color positiva se produce a los 5-10 segundos

**Prueba de producción de ácido por la “fermentación“ de la glucosa (glucosa ácido).**- Prueba rojo de metilo. Ciertas bacterias, entre ellas todas las entéricas, son capaces de “fermentar” glucosa, ya sea por la vía 2,3-butanodiol o bien por “fermentación” ácido mixta. En este último caso se produce un acúmulo de productos ácidos debido al desdoblamiento del azúcar. El pH del cultivo baja hasta aproximadamente 4 tras la inoculación. Al añadir al medio la solución alcohólica de rojo de metilo se puede detectar un viraje del indicador, de color amarillo por encima del pH 5.1 y rojo a pH inferior a 4.4.

Técnica: Suspender un asa de crecimiento bacteriano obtenido sobre medio sólido en 5 mL de medio OF sin azul bromofenol. Incubar 18 horas a 37 °C. Añadir un par de gotas de indicador e interpretar resultados.

Medio OF: Peptona, 2 g; glucosa, 10 g; agar, 2.5. g; NaCl, 5 g; difosfato de potasio, 0.3 g; agua destilada, 1000 mL. Disolver , ajustar el poH a 7.1 y distribuir en tubos. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min.

**Producción de ácido sulfhídrico.**- Muchas bacterias producen sulfuro de hidrógeno (sulfhídrico) a partir de aminoácidos azufrados (cisteína o metionina) o tiosulfato

La fermentación de sulfhídrico puede ser detectada incluyendo hierro reducido en el medio para formar un precipitado negro de FeS. Se inocula un medio de agar nutritivo conteniendo tiosulfato de metionina y sulfato ferroso.

La formación de un precipitado negro (FeS) da una prueba positiva.

Crecimiento en agar MacConkey.- Es un medio diferencial que permite distinguir entre enterobacterias que hidrolizan lactosa y las que no lo hacen. La hidrólisis de la lactosa produce ácidos orgánicos y las colonias que la hidrolizan adquieren un color rojo. Las colonias lactosas negativas permanecen incoloras aunque el medio vira a amarillo por la subida de pH que origina la utilización de las proteínas (peptona) del medio. Se inoculan placas de medio y se incuban a 37 °C

Las bacterias que hidrolizan lactosa producen ácidos orgánicos que las vuelven de color rosa – rojo.

**Prueba del Indol.-** Es una prueba para identificar enterobacterias. Existen bacterias que producen triptofanasa que convierte el triptofano en indol. (bacteria que proliferan en un medio que contiene triptofano). La presencia de indol se detecta añadiendo p-dimetilaminobenzaldehído.

Si se produce indol se observa un anillo rojo.

**Ureasa.-** Esta enzima hidroliza la urea ( $H_2N-CO.NH_2$ ) y origina amonio lo que producirá un incremento del pH que puede detectarse con un indicador.

Las bacterias se inoculan en un medio con glucosa-peptona y urea al 2%. Como indicador de pH se utiliza el rojo fenol.

La hidrólisis de la urea origina un pH alcalino y el indicador vira a rojo.

**Hidrólisis de gelatina.-** La mayoría de los polímeros son demasiado grandes para ser transportados dentro de la célula. Las bacterias excretan enzimas extracelulares que hidrolizan esos polímeros transportándose al interior de la célula en forma de monómeros que les sirven para realizar sus funciones metabólicas.

La producción de proteasas se evalúa por incorporación de una proteína (gelatina o caseína) en un medio sólido en placa. La placa se inunda con ácido que precipita la proteína no hidrolizada.

Si existen proteasas se produce una zona clara alrededor de la estría.

**APÉNDICE III**  
**TÉCNICA: CULTIVO DE ENRIQUECIMIENTO**

## Enriquecimiento

La técnica del enriquecimiento del cultivo propicia que el desarrollo del microorganismo de interés sea más rápido que el del resto de los organismos presentes en la muestra; entonces, el número de este tipo se aumenta cuando el cultivo mixto se inocula en un medio adecuado. Para aislar a un microorganismo del suelo que degrade celulosa, por ejemplo, se debe introducir el suelo en un medio líquido que contenga celulosa como única fuente de carbono. Los organismos que degradan celulosa tendrán una fuente abundante de carbono en esas condiciones, pero el resto de los microbios sólo tendrán bajas concentraciones de nutrientes que contengan carbono presentes en el suelo. Debido a que los degradadores de celulosa se desarrollan más rápido que el resto, ellos eventualmente serán las formas predominantes en el cultivo enriquecido. Los microorganismos celulolíticos se aíslan fácilmente por siembra en estría.

Las condiciones que favorecen el desarrollo de un tipo de microorganismo en particular en un cultivo de enriquecimiento pueden crearse con tres estrategias que son físicas, químicas y biológicas. Las estrategias químicas incluyen técnicas tales como el uso de fuentes de carbono específicas (como celulosa) para enriquecer a los organismos con habilidades específicas de degradación o el uso de un pH ácido para enriquecer a los hongos. Las estrategias físicas incluyen métodos tales como incubar a altas temperaturas para enriquecer a los organismos termófilos o incubar en ausencia de oxígeno para enriquecer a los organismos anaerobios. Un ejemplo de estrategia biológica es la adición de células vivas del hospedero para enriquecer a un cierto tipo de virus bacterianos como los bacteriófagos (Claus, 1989).

Algunas veces es necesario llevar a cabo una serie de transferencias secuenciales e incubaciones en el medio de enriquecimiento, antes de poder aislar al microorganismo deseado.

**APÉNDICE IV**  
**DESCRIPCIÓN DE LOS GÉNEROS AISLADOS**

## Phylum VII: Proteoacteria

### $\beta$ -Proteobacterias

#### Neisseriaceae

***Eikenella***: Bacterias Gram negativo aisladas de infecciones del tracto respiratorio e intestinal y de la cavidad bucal, tracto intestinal y tracto urogenital. Son una probable parte de la flora normal del hombre y de los animales.

### $\gamma$ -Proteobacterias

#### Aeromonadaceae

***Aeromonas***: El género *Aeromonas* es Gram (-), está diseminado en ambientes acuáticos, y los miembros de este género han sido implicados en enfermedades de animales acuáticos como ranas, tortugas y peces. Las *Aeromonas* también originan infecciones en los caracoles y diarreas en el hombre. El organismo puede aislarse con facilidad del agua fresca no contaminada y es probable que se trate de un oportunista patógeno de los animales acuáticos. *Aeromonas* presenta algunas dificultades en los análisis de agua sanitaria ordinaria por la prueba del coliforme, ya que muchas cepas de éste género “fermentan” lactosa con la producción de ácido y gas, por lo que asemejan coliformes típicos. Sin embargo, las aeromonas pueden distinguirse con facilidad de los coliformes por la prueba de oxidasa (*Aeromonas* es oxidasa positiva, los coliformes son oxidasa negativos) y, si son móviles, por el tipo de flagelación (*Aeromonas* es polar, los coliformes son peritricos) (Brock y col., 1987).

#### Enterobacteriaceae

***Enterobacter***: Bacilos móviles, flagelos peritricos, algunas cepas encapsuladas. Pueden usar citrato y acetato como única fuente de carbono. El alginato no lo pueden utilizar. “Fermenta” con producción de ácido con la glucosa. La gelatina es licuada lentamente por la mayoría de las cepas. No se produce ácido sulfhídrico en agar.

***Klebsiellas***: El género *Klebsiella* es una bacteria entérica que se encuentra en agua, suelo, agua residual, productos alimenticios y en las heces del hombre y de otros animales. Es un organismo no móvil. Gram (-), de forma bacilar. Ácido sulfhídrico (-), oxidasa (-) ureasa (+). Indol (-), Hidrólisis de gelatina (-). La mayoría de las *Klebsiellas* pueden fijar nitrógeno (Madigan y col., 2004).

***Yersinia***: El género *Yersinia* es una bacteria entérica Gram (-), encontrada en animales, notablemente en puercos, ratas, aves y pequeños mamíferos. Algunas cepas de las especies como *Y. enterocolitica* y *Y. pseudotuberculosis* causan enterosis en humanos, cuyos síntomas son diarreas, pudiendo ser sanguinolentas, vómito y temperatura alta (Massachussets Department of Public Health, 2008). El

género *Yersinia* es ácido sulfhídrico (-), ureasa (+), indol (+) y es móvil (Madigan y col., 2004).

### Pasteurellaceae

***Actinobacillus***: Esféricas, ovoides o bacilos  $0.4 \pm 0.1$  por  $1.0 \pm 0.4$   $\mu\text{m}$ . En pares, o más raramente en cadenas. No móviles. No forman endosporas. Gram (-) Tinción irregular. Puede ser difícil remover las colonias de la superficie del agar. Cultivos superficiales. Son de baja viabilidad, muriendo en 5-7 días. Quimioorganótrofos, fermentan ácido pero no gas dentro de las 24 horas en glucosa. Producen  $\text{H}_2\text{S}$  (con papel con acetato de plomo). El nitrato se reduce a nitritos. No produce Indol. Ureasa (+). Crece en medio MacConkey (Bergey y col., 1984).

***Haemophilus***: Un género de pasteurellaceae que consiste de diversas especies que ocurren en animales y en el humano. Se describe como Gram negativo, facultativo anaerobio, de forma cocobacilo y bacilar y no es móvil.

***Pasteurella***: es un género cocobacilo Gram (-), que es parte de la flora normal de muchos animales, incluidos perros y gatos. Es un patógeno importante en infecciones por mordeduras de animales y puede causar abscesos, osteomielitis y artritis séptica. Susceptible a la penicilina G, gentamicina y cloranfenicol. Es oxidasa y catalasa (+), reduce nitrato a nitrito. Produce ácido pero no gas, a través del metabolismo de la dextrosa, glicerol, inositol, lactosa, maltosa y manosa. Producción de indol (+), Ureasa (-). Hidrólisis de gelatina (-) (Braun y col., 2002).

### Phylum VIII: Firmicutes

#### Bacilos y Lactobacilos

#### Staphylococcaceae

***Gemella***: Se presentan como cocos o en pares con lados adyacentes. Género móvil, anaerobio facultativo, que se presenta solo o en pares, con flagelos adyacentes. Ellos son indeterminados, en lo relativo a su reacción Gram, pero tiene una pared celular como las de los organismos Gram positivo y son parásitos de los mamíferos. La especie de *Gemella* se encuentra en secreciones bronquiales y en la mucosidad del tracto respiratorio.

#### Actinobacterias

#### Cellulomonadaceae

***Cellulomonas***: En cultivos jóvenes, son bacilos irregulares de  $0.5$   $\mu\text{m}$  de diámetro por  $0.7 - 2.0$   $\mu\text{m}$  o más de longitud, los cuales pueden ser rectos, angulares o ligeramente curvos. Una proporción de los bacilos está arreglada en ángulo uno

con otro dando formación en V. Ocasionalmente, las células pueden mostrar ramificaciones rudimentarias pero sin formar un micelio verdadero. Con cultivos viejos, los bacilos se acortan, pero sólo una pequeña proporción de células cocoides se observan en cultivos de una semana o más viejos. Son móviles por uno (usualmente polar o subpolar) o pocos flagelos laterales o pueden ser no móviles. No forman endosporas. Gram (+): las células son decoloradas y frecuentemente se ve una mezcla de Gram (+) y Gram (-). No son ácido "fase".

Quimioorganótrofos: Su metabolismo se basa principalmente en el uso del oxígeno molecular como aceptor final de electrones; la mayoría de las cepas producen ácido a partir de la glucosa bajo condiciones de aerobiosis y anaerobiosis.

Catalasa (+). Todas las cepas reconocidas atacan a la celulosa.

Las paredes celulares no contienen ni ácido diaminopimélico ni arabinosa. Las paredes son típicamente Gram (+); ellas contienen alanina, ácido glutámico y lisina. Uno o más azúcares pueden estar presentes pero la galactosa está ausente.

La biotina y tiamina son sólo factores orgánicos de desarrollo exógeno y cuando se les agrega con un medio mineral adecuado con glucosa como fuente de carbono y una sal de amonio, ayudan a la proliferación de las células.

La mayoría de las cepas pueden proliferar anaerobiamente. La temperatura óptima es 30°C. No sobreviven a temperaturas de 63°C por 30 minutos. Se desarrollan bien a valores de pH neutros.

Phylum XIII: Flavobacteria

Flavobacteriaceae

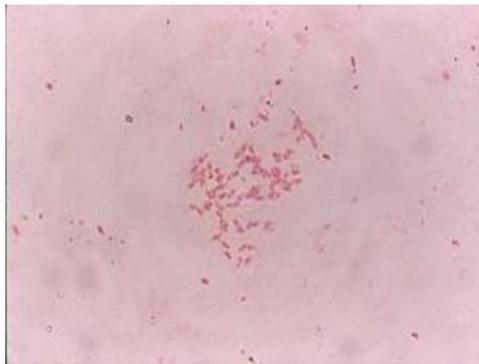
**Flavobacterium:** Varían de cocobacilos a bacilos delgados, móviles con flagelos peritricos o no móviles. Se desarrollan en agar nutritivo. Color amarillo- naranja o café. Conducta "fermentativa" no conspicua, no hay restricciones ácido o de producción de gas. Es un organismo oxidasa positivo.

# **APÉNDICE V**

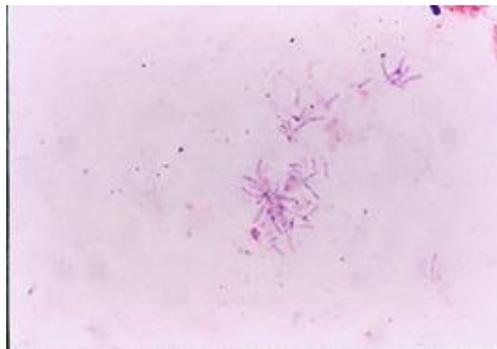
## **MEMORIA FOTOGRÁFICA**



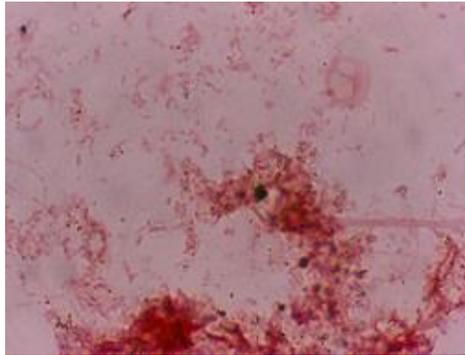
Enriquecimiento de las bacterias celulolíticas. El medio de cultivo consistió de agua con trozos de papel filtro (Whatman 1) al 1% y  $\text{NH}_4\text{SO}_4$ . Previo a la inoculación con la biopelícula el medio fue esterilizado



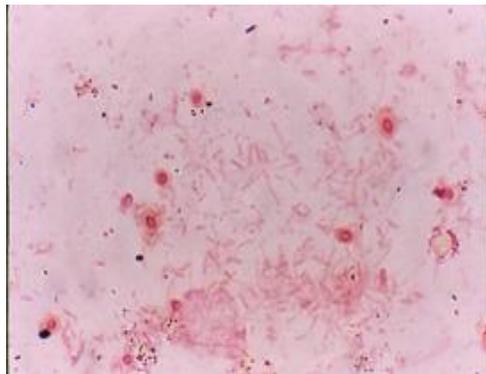
Bacteria (Gram —) aislada en el enriquecimiento de la primera biopelícula de la cámara 1



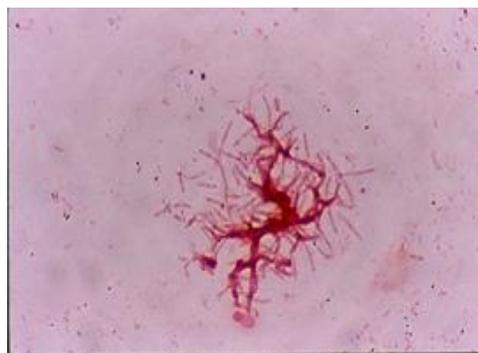
Bacteria (Gram +) aislada en el enriquecimiento de la quinta biopelícula de la cámara 1. Fue la única bacteria celulolítica aislada



Bacteria (Gram —) aislada en el enriquecimiento de la quinta biopelícula de la cámara 1



Bacteria (Gram —) aislada en el enriquecimiento de la primera biopelícula de la cámara 3



Bacteria (Gram —) aislada en el enriquecimiento de la segunda biopelícula de la cámara 3



Bacteria (Gram —) aislada en el enriquecimiento de la tercer biopelícula de la cámara 7



Bacteria (Gram —) aislada en el enriquecimiento de la segunda biopelícula de la cámara 9

# **APÉNDICE VI**

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

Primera corrida. Desviaciones estándar de datos de demanda química de oxígeno. Influyente y reactor A:  
cámaras 1 y 3

Muestras	Tiempo	Influyente	Promedio	Desviación Estándar	Reactor A Cámara 1	Promedio	Desviación Estándar	Cámara 3	Promedio	Desviación Estándar
1	0	471.80	498.99	38.4595378	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	0	526.19			ND			ND		
1	4	555.00	542.50	17.6776695	523.81	533.40	13.5693791	523.81	531.90	11.4480588
2	4	530.00			543.00			540.00		
1	9	481.48	535.50	76.4028877	444.44	472.21	39.2727106	459.26	477.89	26.3467987
2	9	589.53			499.98			496.52		
1	14	589.15	556.57	46.0680068	449.61	444.60	7.07813888	418.60	417.15	2.05060967
2	14	524.00			439.60			415.70		
1	17	450.38	465.19	20.9445029	396.95	392.05	6.92964646	393.13	397.31	5.91848376
2	17	480.00			387.15			401.50		
1	21	528.45	521.81	9.38330699	406.50	405.40	1.55563492	341.46	364.58	32.6966176
2	21	515.18			404.30			387.70		
1	24	465.65	457.82	11.0662211	458.02	453.83	5.92555483	328.24	326.67	2.21324423
2	24	450.00			449.64			325.11		
1	28	500.00	484.50	21.9203102	460.00	459.39	0.86267027	376.92	374.53	3.37289935
2	28	469.00			458.78			372.15		
1	31	515.51	521.25	8.12465692	492.42	491.61	1.13844192	446.97	444.85	2.99106168
2	31	527.00			490.81			442.74		
1	35	646.94	635.97	15.5139228	405.30	404.31	1.39300036	340.91	338.97	2.73650324
2	35	625.00			403.33			337.04		
1	39	587.76	567.38	28.8216724	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	39	547.00			ND			ND		
		Promedio	526.137273		450.757778			408.208889		
		Desviación estándar	55.1615284		45.6016001			66.118763		
Unidades de DQO = mg/L					ND = No determinado					
Unidades de Tiempo = días										

Primera corrida. Desviaciones estándar de datos de demanda química de oxígeno. Influyente de reactor A y cámara 1 de reactor B

Muestras	Tiempo	Efluente A	Promedio	Desviación Estándar	Reactor B Cámara 1	Promedio	Desviación Estándar
1	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	0	ND			ND		
1	4	166.67	173.33	9.42573339	380.95	378.97	2.79307179
2	4	180.00			377.00		
1	9	444.44	464.75	28.7226775	444.44	472.21	39.2727106
2	9	485.06			499.98		
1	14	426.36	421.13	7.39633693	534.88	533.09	2.53144228
2	14	415.90			531.30		
1	17	381.68	380.69	1.40007143	442.75	441.17	2.22738636
2	17	379.70			439.60		
1	21	357.72	359.46	2.4607316	406.50	403.70	3.95979797
2	21	361.20			400.90		
1	24	312.98	311.73	1.76069589	465.65	462.83	3.98808225
2	24	310.49			460.01		
1	28	361.54	362.28	1.0535891	461.54	463.43	2.67286363
2	28	363.03			465.32		
1	31	446.97	445.38	2.2415285	477.27	473.76	4.95681854
2	31	443.80			470.26		
1	35	356.06	357.42	1.92333044	430.76	429.83	1.31521861
2	35	358.78			428.90		
1	39	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	39	ND			ND		
		Promedio	364.021111			451.000556	
		Desviación estándar	83.9907818			44.436596	
Unidades de DQO = mg/L							
Unidades de Tiempo = días							

Primera corrida. Desviaciones estándar de datos de demanda química de oxígeno. Reactor B: Cámaras 3 y efluente

Muestras	Tiempo	Cámara 3	Promedio	Desviación Estándar	Efluente B	Promedio	Desviación Estándar
1	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	0	ND			ND		
1	4	190.48	195.24	6.73165656	214.29	212.14	3.03348809
2	4	200.00			210.00		
1	9	414.81	446.20	44.3921637	414.81	449.93	49.6742514
2	9	477.59			485.06		
1	14	457.36	453.88	4.9214632	410.85	406.87	5.62149891
2	14	450.40			402.90		
1	17	381.68	380.83	1.20208153	381.68	383.64	2.77185858
2	17	379.98			385.60		
1	21	365.85	368.07	3.14662518	333.33	334.60	1.79605122
2	21	370.30			335.87		
1	24	511.45	508.61	4.00929545	343.51	341.80	2.41830519
2	24	505.78			340.09		
1	28	538.46	533.90	6.44174278	423.08	425.52	3.45068109
2	28	529.35			427.96		
1	31	446.97	447.49	0.73539105	446.97	444.53	3.44361002
2	31	448.01			442.10		
1	35	409.09	407.21	2.65165043	416.66	413.87	3.93858477
2	35	405.34			411.09		
1	39	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	39	ND			ND		
		Promedio	415.716667			379.213889	
		Desviación estándar	96.5408735			73.5511794	
Unidades de DQO = mg/L							
Unidades de Tiempo = días							

Primera corrida. Desviaciones estándar de datos de concentración de azúcares libres. Influyente, reactor A: Cámara 1

Muestras Azúcar libre	Tiempo	Influyente	Promedio	Desviación Estándar	Reactor A Cámara 1	Promedio	Desviación Estándar
1	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	0	ND			ND		
1	4	21.32	20.55	1.08894444	ND	ND	ND
2	4	19.78			ND		
1	7	38.06	37.02	1.46371104	ND	ND	ND
2	7	35.99			ND		
1	11	21.32	22.02	0.98994949	ND	ND	ND
2	11	22.72			ND		
1	14	33.28	32.20	1.52735065	15.32	16.97	2.33345238
2	14	31.12			18.62		
1	18	14.10	15.50	1.97989899	20.12	19.22	1.27279221
2	18	16.90			18.32		
1	21	47.62	46.47	1.6263456	22.51	23.14	0.89802561
2	21	45.32			23.78		
1	25	12.95	11.52	2.02232539	21.32	21.15	0.23334524
2	25	10.09			20.99		
1	28	18.93	17.74	1.67584307	15.34	16.61	1.80312229
2	28	16.56			17.89		
1	32	30.88	29.77	1.56270599	36.83	36.14	0.97580736
2	32	28.67			35.45		
1	35	26.10	25.10	1.40714249	21.92	20.73	20.735
2	35	24.11			19.55		
	Promedio	25.791			21.9971429		
	Desviación estándar	10.4604412			6.48146758		

Primera corrida. Desviaciones estándar de datos de concentración de azúcares libres. Efluente de reactor A y Reactor B: cámara 1 y efluente

Muestras Azúcar libre mgL <sup>-1</sup>	Tiempo en días	Efluente A	Promedio	Desviación Estándar	Reactor B Cámara 1	Promedio	Desviación Estándar	Efluente B	Promedio	Desviación Estándar
1	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	0	ND			ND			ND		
1	4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	4	ND			ND			ND		
1	7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	7	ND			ND			ND		
1	11	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	11	ND			ND			ND		
1	14	ND	ND	ND	14.10	13.54	0.78488853	ND	ND	ND
2	14	ND			12.99			ND		
1	18	21.32	15.90	7.65796644	20.72	22.85	3.01227489	26.10	23.57	3.57796031
2	18	10.49			24.98			21.04		
1	21	18.93	19.46	0.74953319	20.12	19.18	1.32228968	18.93	20.30	1.93747258
2	21	19.99			18.25			21.67		
1	25	18.93	19.52	0.84145707	15.94	17.18	1.76069589	14.10	15.78	2.38294985
2	25	20.12			18.43			17.47		
1	28	15.34	16.22	1.24450793	16.51	17.45	1.33643182	14.10	15.04	1.33643182
2	28	17.10			18.40			15.99		
1	32	33.28	31.95	1.87383297	44.95	42.25	3.81837662	33.28	35.04	2.48901587
2	32	30.63			39.55			36.80		
1	35	21.32	ND	ND	23.71	ND	ND	18.93	17.85	1.52735065
2	35	20.09			22.00			16.77		
	Promedio	20.6283333			22.1892857			21.265		
	Desviación estándar	6.11243566			9.20452185			7.29445555		

Primera corrida. Desviaciones estándar de datos de concentración de celulosa en sólidos. Influyente y Reactor A: cámara 1

Muestras Celulosa en sólidos	Tiempo	Influyente	Promedio	Desviación Estándar	Reactor A Cámara 1	Promedio	Desviación Estándar	
1	0	21.23	20.40	ND	ND	ND	ND	
2	0	19.58			ND			
1	4	14.10	15.54	2.0435386	ND	ND	ND	
2	4	16.99			ND			
1	7	23.71	22.19	2.14960461	ND	ND	ND	
2	7	20.67			ND			
1	11	14.10	16.51	3.40825469	ND	ND	ND	
2	11	18.92			ND			
1	14	23.71	22.66	1.48492424	23.69	22.10	2.24859956	
2	14	21.61			20.51			
1	18	2.19	1.87	0.44547727	3.38	4.27	1.25865007	
2	18	1.56			5.16			
1	21	11.75	10.81	1.32936075	2.19	2.09	0.14142136	
2	21	9.87			1.99			
1	25	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
2	25	ND			ND			
1	28	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
2	28	ND			ND			
1	32	28.50	27.14	1.92333044	5.17	6.03	1.22329473	
2	32	25.78			6.90			
1	35	23.71	22.89	1.15965512	7.57	6.79	6.795	
2	35	22.07			6.02			
	Promedio	17.14			8.62			
	Desviación estándar	7.81012353			8.51946333			
Unidades de azúcar libre = microgramos/L					ND = No determinado			
Unidades de Tiempo = días								

Primera corrida. Desviaciones estándar de datos de concentración de celulosa en sólidos. Efluente del Reactor A y cámara 1 del reactor B

Muestras Celulosa en sólidos	Tiempo	Efluente A	Promedio	Desviación Estándar	Reactor B Cámara 1	Promedio	Desviación Estándar
1	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	0	ND			ND		
1	4	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	4	ND			ND		
1	7	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	7	ND			ND		
1	11	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	11	ND			ND		
1	14	ND	ND	ND	21.32	22.61	1.8243355
2	14	ND			23.90		
1	18	2.19	2.93	1.04651804	2.78	2.33	0.62932504
2	18	3.67			1.89		
1	21	4.58	5.24	0.93338095	2.19	1.86	0.45961941
2	21	5.90			1.54		
1	25	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	25	ND			ND		
1	28	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	28	ND			ND		
1	32	23.71	22.15	2.19910209	17.13	16.56	0.80610173
2	32	20.60			15.99		
1	35	33.28	31.88	1.97282792	8.16	8.60	0.62932504
2	35	30.49			9.05		
	Promedio	15.5525			10.39		
	Desviación estándar	12.888156			8.57169405		
Unidades de azúcar libre = microgramos/L							
Unidades de Tiempo = días							

Primera corrida. Desviaciones estándar de datos de concentración de celulosa en sólidos. Efluente del Reactor B

Muestras Celulosa en sólidos	Tiempo	Efluente B	Promedio	Desviación Estándar
1	0	ND	ND	ND
2	0	ND		
1	4	ND	ND	ND
2	4	ND		
1	7	ND	ND	ND
2	7	ND		
1	11	ND	ND	ND
2	11	ND		
1	14	ND	ND	ND
2	14	ND		
1	18	4.58	4.17	0.57982756
2	18	3.76		
1	21	2.19	2.06	0.18384776
2	21	1.93		
1	25	ND	ND	ND
2	25	ND		
1	28	ND	ND	ND
2	28	ND		
1	32	ND	ND	ND
2	32	ND		
1	35	33.28	34.51	1.73948268
2	35	35.74		
	Promedio	13.58		
	Desviación estándar	16.26		
Unidades de azúcar libre = microgramos/L				
Unidades de Tiempo = días				

Primera corrida. Desviaciones estándar de datos de pH. Influyente y cámara 1 y 3 del Reactor A

pH Muestras	Tiempo	Influyente	Promedio	Desviación Estándar	Reactor A Cámara 1	Promedio	Desviación Estándar	Cámara 3
1	0	7.70	7.90	0.28284271	ND	ND	ND	ND
2	0	8.10			ND			ND
1	4	7.74	7.47	0.38183766	8.26	8.14	0.16970563	8.67
2	4	7.20			8.02			8.25
1	9	7.99	8.09	0.14849242	7.99	8.09	0.14849242	8.93
2	9	8.20			8.20			9.15
1	14	11.20	11.00	0.28284271	9.82	9.66	0.22627417	8.99
2	14	10.80			9.50			9.20
1	17	10.10	9.83	0.38183766	9.57	9.48	0.12020815	9.25
2	17	9.56			9.40			9.60
1	21	9.30	9.75	0.6363961	ND	ND	ND	ND
2	21	10.20			ND			ND
1	24	7.50	7.65	0.21213203	ND	ND	ND	ND
2	24	7.80			ND			ND
1	28	7.56	7.78	0.31112698	8.39	8.70	0.4384062	8.66
2	28	8.00			9.01			8.19
1	31	7.72	7.96	0.33941125	8.26	8.43	0.24748737	8.63
2	31	8.20			8.61			8.23
1	35	8.30	8.10	0.28284271	ND	ND	ND	ND
2	35	7.90			ND			ND
1	39	8.70	8.52	0.24748737	8.60	8.67	0.09899495	8.84
2	39	8.35			8.74			8.45
	Promedio	8.55090909			8.74071429			8.78857143
	Desviación estándar	1.13260723			0.61604775			0.42653987

Primera corrida. Desviaciones estándar de datos de pH. Cámara 3 (continuación) y Efluente del Reactor

A

pH Muestras	Tiempo	Promedio	Desviación Estándar	Efluente A	Promedio	Desviación Estándar
1	0	ND	ND	ND	ND	ND
2	0			ND		
1	4	8.46	0	8.73	8.44	0.41012193
2	4			8.15		
1	9	9.04	0	8.96	9.03	0.09899495
2	9			9.10		
1	14	9.09	0	8.92	9.11	0.26870058
2	14			9.30		
1	17	9.42	0	9.20	9.10	0.14142136
2	17			9.00		
1	21	ND	ND	ND	ND	ND
2	21			ND		
1	24	ND	ND	ND	ND	ND
2	24			ND		
1	28	8.42	0	8.74	8.62	0.16970563
2	28			8.50		
1	31	8.43	0	8.69	8.83	0.1979899
2	31			8.97		
1	35	ND	ND	ND	ND	ND
2	35			ND		
1	39	8.64	0	8.83	8.69	0.1979899
2	39			8.55		
Promedio				8.83142857		
Desviación estándar				0.30275294		

Primera corrida. Desviaciones estándar de datos de pH. Cámara 1 y 3 del Reactor B

pH Muestras	Tiempo	Reactor B Cámara 1	Promedio	Desviación Estándar	Cámara 3	Promedio	Desviación Estándar
1	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	0	ND			ND		
1	4	8.26	8.43	0.24041631	8.55	8.78	0.32526912
2	4	8.60			9.01		
1	9	8.92	9.11	0.26870058	8.92	8.97	0.07071068
2	9	9.30			9.02		
1	14	10.00	9.90	0.14142136	9.09	8.94	0.20506097
2	14	9.8			8.80		
1	17	9.65	9.38	0.37476659	9.29	9.34	0.07778175
2	17	9.12			9.40		
1	21	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	21	ND			ND		
1	24	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	24	ND			ND		
1	28	8.42	8.61	0.26870058	8.66	9.03	0.52325902
2	28	8.80			9.40		
1	31	8.33	8.50	0.24748737	8.66	8.41	0.34648232
2	31	8.68			8.17		
1	35	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	35	ND			ND		
1	39	8.62	8.63	0.01414214	8.80	8.75	0.06363961
2	39	8.64			8.71		
	Promedio	8.93857143			8.89142857		
	Desviación estándar	0.55676065			0.34426861		

Primera corrida. Desviaciones estándar de datos de pH. Efluente del Reactor B

pH Muestras	Tiempo	Efluente B	Promedio	Desviación Estándar
1	0	ND	ND	ND
2	0	ND		
1	4	8.60	8.70	0.14142136
2	4	8.80		
1	9	8.95	8.82	0.1767767
2	9	8.70		
1	14	8.93	9.06	0.19091883
2	14	9.20		
1	17	9.21	9.13	0.11313708
2	17	9.05		
1	21	ND	ND	ND
2	21	ND		
1	24	ND	ND	ND
2	24	ND		
1	28	8.68	8.81	0.19091883
2	28	8.95		
1	31	8.60	8.52	0.10606602
2	31	8.45		
1	35	ND	ND	ND
2	35	ND		
1	39	8.80	8.61	0.26870058
2	39	8.42		
	Promedio	8.81		
	Desviación estándar	0.25151847		

Primera corrida. Desviaciones estándar de datos de oxígeno disuelto. Influyente y cámara 1 del Reactor A

O <sub>2</sub> Muestras	Tiempo	Influente	Promedio	Desviación Estándar	Reactor A Cámara 1	Promedio	Desviación Estándar
1	0	0.04	0.03	0.01414214	ND	ND	ND
2	0	0.02			ND		
1	4	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	4	ND			ND		
1	9	0.02	0.03	0.0212132	6.97	6.57	0.55861436
2	9	0.05			6.18		
1	14	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	14	ND			ND		
1	17	0.06	0.04	0.02545584	5.38	5.03	0.48790368
2	17	0.02			4.69		
1	21	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	21	ND			ND		
1	24	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	24	ND			ND		
1	28	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	28	ND			ND		
1	31	0.33	0.39	0.09192388	4.50	4.05	0.6363961
2	31	0.46			3.60		
1	35	0.45	0.40	0.06363961	6.15	5.99	0.2192031
2	35	0.36			5.84		
1	39	0.08	0.06	0.02828427	6.32	6.10	0.30405592
2	39	0.04			5.89		
Promedio		0.16116667			5.55		
Desviación estándar		0.18039846			1.01321052		

Primera corrida. Desviaciones estándar de datos de oxígeno disuelto. Cámara 3 y efluente del Reactor A

O <sub>2</sub> Muestras	Tiempo	Cámara 3	Promedio	Desviación Estándar	Efluente A	Promedio	Desviación Estándar
1	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	0	ND			ND		
1	4	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	4	ND			ND		
1	9	7.85	7.44	0.56922096	7.82	7.69	0.18384776
2	9	7.04			7.56		
1	14	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	14	ND			ND		
1	17	7.16	7.07	0.12727922	8.37	8.52	0.21213203
2	17	6.98			8.67		
1	21	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	21	ND			ND		
1	24	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	24	ND			ND		
1	28	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	28	ND			ND		
1	31	6.95	6.39	0.78488853	7.66	7.85	0.27577164
2	31	5.84			8.05		
1	35	7.75	7.38	0.51972348	7.93	7.57	0.50204581
2	35	7.01			7.22		
1	39	7.54	7.76	0.31112698	8.10	7.97	0.1767767
2	39	7.98			7.85		
Promedio		7.21		7.92			
Desviación estándar		0.62076476		0.41047533			

Primera corrida. Desviaciones estándar de datos de oxígeno disuelto. Cámara 1 y 3 del Reactor B

O <sub>2</sub> Muestras	Tiempo	Reactor B Cámara 1	Promedio	Desviación Estándar	Cámara 3	Promedio	Desviación Estándar
1	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	0	ND			ND		
1	4	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	4	ND			ND		
1	9	6.94	6.5175	0.59750523	7.90	7.60	0.42426407
2	9	6.09			7.30		
1	14	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	14	ND			ND		
1	17	5.72	5.8835	0.23122392	7.28	7.64	0.51618795
2	17	6.04			8.01		
1	21	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	21	ND			ND		
1	24	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	24	ND			ND		
1	28	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	28	ND			ND		
1	31	6.15	6.02	0.18384776	6.83	6.72	0.14849242
2	31	5.89			6.62		
1	35	7.00	7.225	0.31819805	7.76	7.54	0.31112698
2	35	7.45			7.32		
1	39	7.21	7.345	0.19091883	7.62	7.39	0.31819805
2	39	7.48			7.17		
Promedio		6.59			7.38		
Desviación estándar		0.68202326			0.44888628		

Primera corrida. Desviaciones estándar de datos de oxígeno disuelto. Efluente del Reactor B

O <sub>2</sub> Muestras	Tiempo	Efluente B	Promedio	Desviación Estándar
1	0	ND	ND	ND
2	0	ND		
1	4	ND	ND	ND
2	4	ND		
1	9	7.20	7.01	0.26870058
2	9	6.82		
1	14	ND	ND	ND
2	14	ND		
1	17	7.91	7.56	0.49497475
2	17	7.21		
1	21	ND	ND	ND
2	21	ND		
1	24	ND	ND	ND
2	24	ND		
1	28	ND	ND	ND
2	28	ND		
1	31	7.30	7.07	0.31819805
2	31	6.85		
1	35	8.04	7.89	0.20506097
2	35	7.75		
1	39	8.00	7.92	0.10606602
2	39	7.85		
Promedio		7.49		
Desviación estándar		0.47060363		

Primera corrida. Desviaciones estándar de datos de temperatura. Influyente y cámara del Reactor A

Temperatura Muestras	Tiempo	Influente	Promedio	Desviación Estándar	Reactor A Cámara 1	Promedio	Desviación Estándar
1	0	19	17.50	2.12132034	ND	ND	ND
2	0	16			ND		
1	4	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	4	ND			ND		
1	9	19.60	19.27	0.45961941	17.50	17.26	0.33941125
2	9	18.95			17.02		
1	14	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	14	ND			ND		
1	17	19.40	19.15	0.35355339	17.60	17.75	0.21213203
2	17	18.90			17.90		
1	21	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	21	ND			ND		
1	24	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	24	ND			ND		
1	28	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	28	ND			ND		
1	31	21.20	21.60	0.56568542	19.40	19.18	0.30405592
2	31	22.00			18.97		
1	35	20.60	20.70	0.14142136	17.70	17.45	0.35355339
2	35	20.80			17.20		
1	39	20.10	20.35	0.35355339	17.60	17.45	0.21213203
2	39	20.60			17.30		
		Promedio	19.76			17.81	
		Desviación estándar	1.53639558			0.7698261	

Primera corrida. Desviaciones estándar de datos de temperatura. Cámara 3 y efluente del Reactor A

Temperatura Muestras	Tiempo	Cámara 3	Promedio	Desviación Estándar	Efluente A	Promedio	Desviación Estándar
1	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	0	ND			ND		
1	4	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	4	ND			ND		
1	9	17.10	16.84	0.36769553	17.50	17.02	0.67882251
2	9	16.58			16.54		
1	14	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	14	ND			ND		
1	17	16.10	15.99	0.14849242	16.10	16.30	0.28284271
2	17	15.89			16.50		
1	21	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	21	ND			ND		
1	24	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	24	ND			ND		
1	28	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	28	ND			ND		
1	31	18.40	18.15	0.35355339	18.20	18.35	0.21213203
2	31	17.90			18.50		
1	35	16.70	16.85	0.21213203	16.60	16.50	0.14142136
2	35	17.00			16.40		
1	39	16.90	16.70	0.28284271	16.50	16.65	0.21213203
2	39	16.50			16.80		
		Promedio	16.90		16.96		
		Desviación estándar	0.76463572		0.81708425		

Primera corrida. Desviaciones estándar de datos de temperatura. Cámara 1 y 3 del Reactor B

Temperatura Muestras	Tiempo	Reactor B Cámara 1	Promedio	Desviación Estándar	Cámara 3	Promedio	Desviación Estándar
1	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	0	ND			ND		
1	4	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	4	ND			ND		
1	9	17.20	17.54	0.48790368	17.20	17.01	0.26870058
2	9	17.89			16.82		
1	14	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	14	ND			ND		
1	17	17.10	17.25	0.21213203	15.90	16.15	0.35355339
2	17	17.40			16.40		
1	21	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	21	ND			ND		
1	24	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	24	ND			ND		
1	28	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	28	ND			ND		
1	31	18.60	18.50	0.14142136	18.10	18.30	0.28284271
2	31	18.40			18.50		
1	35	16.60	16.40	0.28284271	16.40	16.55	0.21213203
2	35	16.20			16.70		
1	39	16.70	16.80	0.14142136	16.30	16.60	0.42426407
2	39	16.90			16.90		
		Promedio	17.29		16.92		
		Desviación estándar	0.78372969		0.81592211		

Primera corrida. Desviaciones estándar de datos de temperatura. Efluente del Reactor B

Temperatura Muestras	Tiempo	Efluente B	Promedio	Desviación Estándar
1	0	ND	ND	ND
2	0	ND		
1	4	ND	ND	ND
2	4	ND		
1	9	17.30	17.40	0.14142136
2	9	17.50		
1	14	ND	ND	ND
2	14	ND		
1	17	16.10	16.02	0.10606602
2	17	15.95		
1	21	ND	ND	ND
2	21	ND		
1	24	ND	ND	ND
2	24	ND		
1	28	ND	ND	ND
2	28	ND		
1	31	18.14	18.22	0.11313708
2	31	18.30		
1	35	16.50	16.20	0.42426407
2	35	15.90		
1	39	16.50	16.65	0.21213203
2	39	16.80		
Promedio		16.89		
Desviación estándar		0.87496603		

Segunda corrida. Desviaciones estándar de datos de demanda química de oxígeno. Influyente y reactor A: cámaras 1, 2, 3, y 4. Reactor B: cámara 1

Muestras	Tiempo	Influyente	Promedio	Desviación Estándar	Reactor A Cámara 1	Promedio	Desviación Estándar	Reactor A Cámara 2	Promedio	Desviación Estándar
1	0	763.84	737.80	36.8261212	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	0	711.76			ND			ND		
1	4	960.25	902.72	81.3667773	705.58	695.415	14.3754809	854.14	826.35	39.3009949
2	4	845.18			685.25			798.56		
1	7	773.19	756.00	24.3103311	509.47	565.395	79.0898935	623.55	647.195	33.4390797
2	7	738.81			621.32			670.84		
		Promedio	798.838333		630.405			736.7725		
		Desviación estándar	90.8515641		88.2554363			107.640225		
Unidades de DQO = mg/L					ND = No determinado					
Unidades de Tiempo = días										

Muestras	Tiempo	Reactor A Cámara 3	Promedio	Desviación Estándar	Reactor A Cámara 4	Promedio	Desviación Estándar	Reactor B Cámara 1	Promedio	Desviación Estándar
1	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	0	ND			ND			ND		
1	4	960.25	902.72	81.3667773	903.25	833.15	99.1363707	972.02	902.33	98.5565432
2	4	845.18			763.05			832.64		
1	7	662.58	647.92	20.7394419	689.75	648.19	58.7747157	732.56	721.50	15.641202
2	7	633.25			606.63			710.44		
		Promedio	775.315		740.67			811.915		
		Desviación estándar	154.891055		125.82089			119.244187		

Segunda corrida. Desviaciones estándar de datos de demanda química de oxígeno. Reactor B: cámaras 2, 3, y 4. Efluentes A y B

Muestras	Tiempo	Reactor B Cámara 2	Promedio	Desviación Estándar	Reactor B Cámara 3	Promedio	Desviación Estándar	Reactor B Cámara 4	Promedio	Desviación Estándar
1	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	0	ND			ND			ND		
1	4	821.01	833.10	17.0907709	924.48	833.25	129.018703	821.33	833.20	16.786715
2	4	845.18			742.02			845.07		
1	7	646.11	648.94	4.00222438	826.15	720.695	149.135891	412.26	432.89	29.1752258
2	7	651.77			615.24			453.52		
	Promedio	741.0175			776.9725			633.045		
	Desviación estándar	106.803833			131.092802			231.934677		

Muestras	Tiempo	Efluente de A y B	Promedio	Desviación Estándar
1	0	ND	ND	ND
2	0	ND		
1	4	933.05	902.06	43.8264783
2	4	871.07		
1	7	639.89	630.35	13.4915974
2	7	620.81		
	Promedio	766.205		
	Desviación estándar	159.090234		

Segunda corrida. Desviaciones estándar de datos de pH. Influyente y reactor A: cámaras 1, y 3

Muestras	Tiempo	Influyente	Promedio	Desviación Estándar	Reactor A Cámara 1	Promedio	Desviación Estándar	Reactor A Cámara 3	Promedio	Desviación Estándar
1	0	5.89	5.94	0.06363961	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	0	5.98			ND			ND		
1	1	5.65	5.63	0.02828427	6.99	7.015	0.03535534	7.33	7.35	0.02828427
2	1	5.61			7.04			7.37		
1	4	5.72	5.70	0.02828427	6.99	6.97	0.02828427	7.4	7.42	0.02828427
2	4	5.68			6.95			7.44		
1	5	5.39	5.44	0.06363961	6.65	6.67	0.02828427	7.36	7.34	0.02828427
2	5	5.48			6.69			7.32		
1	7	5.96	5.94	0.02828427	7.07	7.05	0.02828427	7.77	7.75	0.02828427
2	7	5.92			7.03			7.73		
Promedio		5.728			6.92625			7.465		
Desviación estándar		0.20509077			0.16265103			0.18023794		
ND = No determinado										

Segunda corrida. Desviaciones estándar de datos de pH. Efluente reactor A y reactor B: cámaras 1, 3 y su efluente

Muestras	Tiempo	Reactor A Efluente	Promedio	Desviación Estándar	Reactor B Cámara 1	Promedio	Desviación Estándar	Reactor B Cámara 3	Promedio	Desviación Estándar
1	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	0	ND			ND			ND		
1	1	7.23	7.25	0.02828427	7.12	7.14	0.02828427	7.37	7.39	0.02828427
2	1	7.27			7.16			7.41		
1	4	7.49	7.47	0.02828427	7.08	7.10	0.02828427	7.41	7.43	0.02828427
2	4	7.45			7.12			7.45		
1	5	7.38	7.40	0.02828427	6.84	6.86	0.02828427	7.44	7.46	0.02828427
2	5	7.42			6.88			7.48		
1	7	7.77	7.79	0.02828427	6.97	6.99	0.02828427	7.66	7.64	0.02828427
2	7	7.81			7.01			7.62		
Promedio		7.4775			7.0225			7.48		
Desviación estándar		0.21184563			0.11817058			0.10447146		
Muestras	Tiempo	Reactor B Efluente	Promedio	Desviación Estándar						
1	0	ND	ND	ND						
2	0	ND								
1	1	7.33	7.35	0.02828427						
2	1	7.37								
1	4	7.41	7.43	0.02828427						
2	4	7.45								
1	5	7.49	7.47							
2	5	7.45								
1	7	7.74	7.76							
2	7	7.78								
Promedio		7.5025								
Desviación estándar		0.16688319								

Segunda corrida. Desviaciones estándar de datos de oxígeno disuelto. Influyente y reactor A: cámaras 1, y 3

Muestras	Tiempo	Influyente	Promedio	Desviación Estándar	Reactor A Cámara 1	Promedio	Desviación Estándar	Reactor A Cámara 3	Promedio	Desviación Estándar
1	0	1.7	1.72	0.02828427	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	0	1.74			ND			ND		
1	1	0.77	0.79	0.02828427	4.48	4.50	0.02828427	5.87	5.89	0.02828427
2	1	0.81			4.52			5.91		
1	4	0.33	0.35	0.02828427	5.11	5.13	0.02828427	4.22	4.21	0.0212132
2	4	0.37			5.15			4.19		
1	5	0.38	0.40	0.02828427	4.09	4.11	0.02828427	3.64	3.66	0.02828427
2	5	0.42			4.13			3.68		
1	7	0.66	0.68	0.02828427	4.00	4.01	0.00919239	4.82	4.84	0.02828427
2	7	0.7			4.01			4.86		
Promedio		0.788			4.436625			4.64875		
Desviación estándar		0.52168104			0.47138669			0.88692788		
ND = No determinado										

Segunda corrida. Desviaciones estándar de datos de oxígeno disuelto. Efluente reactor A y reactor B: cámaras 1, 3 y su efluente

Muestras	Tiempo	Reactor A Efluente	Promedio	Desviación Estándar	Reactor B Cámara 1	Promedio	Desviación Estándar	Reactor B Cámara 3	Promedio	Desviación Estándar
1		0 ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2		0 ND			ND			ND		
1		1	5.75	5.77 0.02828427	5.93	5.95 0.02828427	5.99	6.01	0.02828427	
2		1	5.79		5.97		6.03			
1		4	4.28	4.30 0.02828427	4.14	4.16 0.02828427	4.73	4.75	0.02828427	
2		4	4.32		4.18		4.77			
1		5	2.04	2.06 0.02828427	2.04	2.06 0.02828427	4.16	4.18	0.02828427	
2		5	2.08		2.08		4.2			
1		7	5.28	5.30 0.02828427	3.99	4.02 0.04242641	5.21	5.19	0.02828427	
2		7	5.32		4.05		5.17			
Promedio		4.3575			4.0475			5.0325		
Desviación estándar		1.52754472			1.47213887			0.71483764		
Muestras	Tiempo	Reactor B Efluente	Promedio	Desviación Estándar						
1		0 ND	ND	ND						
2		0 ND								
1		1	5.79	5.81 0.02828427						
2		1	5.83							
1		4	4.78	4.80 0.02828427						
2		4	4.82							
1		5	3.7	3.72						
2		5	3.74							
1		7	4.86	4.84						
2		7	4.82							
Promedio		4.7925								
Desviación estándar		0.79092622								

Segunda corrida. Desviaciones estándar de datos de temperatura. Influyente y reactor A: cámaras 1, y 3

Muestras	Tiempo	Influyente	Promedio	Desviación Estándar	Reactor A Cámara 1	Promedio	Desviación Estándar	Reactor A Cámara 3	Promedio	Desviación Estándar
1	0	21	23.00	2.82842712	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	0	25			ND			ND		
1	1	19	22.00	4.24264069	17.00	19.00	2.82842712	17.00	19.00	2.82842712
2	1	25			21.00			21.00		
1	4	19	21.00	2.82842712	16.00	18.00	2.82842712	16.00	18.00	2.82842712
2	4	23			20.00			20.00		
1	5	18	20.00	2.82842712	15.00	17.00	2.82842712	15.00	17.00	2.82842712
2	5	22			19.00			19.00		
1	7	18	20.00	2.82842712	15.00	17.00	2.82842712	15.00	17.00	2.82842712
2	7	22			19.00			19.00		
Promedio		21.2			17.75			17.75		
Desviación estándar		2.65832027			2.31455025			2.31455025		
ND = No determinado										

Segunda corrida. Desviaciones estándar de datos de temperatura. Efluente reactor A y reactor B: cámaras 1, 3 y su efluente

Muestras	Tiempo	Reactor A Efluente	Promedio	Desviación Estándar	Reactor B Cámara 1	Promedio	Desviación Estándar	Reactor B Cámara 3	Promedio	Desviación Estándar
1	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	0	ND			ND			ND		
1	1	17.00	19.00	2.82842712	17.00	19	2.82842712	17.00	19	2.82842712
2	1	21.00			21.00			21.00		
1	4	16.00	18.00	2.82842712	16.00	18.00	2.82842712	16.00	18.00	2.82842712
2	4	20.00			20.00			20.00		
1	5	15.00	17.00	2.82842712	15.00	17.00	2.82842712	15.00	17.00	2.82842712
2	5	19.00			19.00			19.00		
1	7	15.00	17.00	2.82842712	15.00	17.00	2.82842712	15.00	17.00	2.82842712
2	7	19.00			19.00			19.00		
Promedio		17.75			17.75			17.75		
Desviación estándar		2.31455025			2.31455025			2.31455025		

Muestras	Tiempo	Reactor B Efluente	Promedio	Desviación Estándar
1	0	ND	ND	ND
2	0	ND		
1	1	17.00	19.00	2.82842712
2	1	21.00		
1	4	16.00	18.00	2.82842712
2	4	20.00		
1	5	15.00	17.00	
2	5	19.00		
1	7	15.00	17.00	
2	7	19.00		
Promedio		17.75		
Desviación estándar		2.31455025		

**APÉNDICE VII  
PROPIEDADES Y COMPOSICIÓN DE LA  
BIOPELÍCULA**

## Propiedades y composición de la biopelícula

Los microorganismos, principalmente bacterias, son los que se unen a las superficies. Los microorganismos se unen principalmente por medio de fibras de polímeros extracelulares, fabricados y orientados por la célula, que se extiende desde la superficie celular para formar una matriz llamada glicocalix. Las fibras pueden conservar y concentrar las enzimas necesarias para preparar las moléculas de sustrato para su ingestión, especialmente las de alta masa molecular o sustratos frecuentemente encontrados en aguas naturales.

La superficie de la biopelícula es altamente adsortiva, parcialmente debido a su naturaleza de poli-electrolito y puede coleccionar cantidades significativas de sílice, arena y detritos del agua.

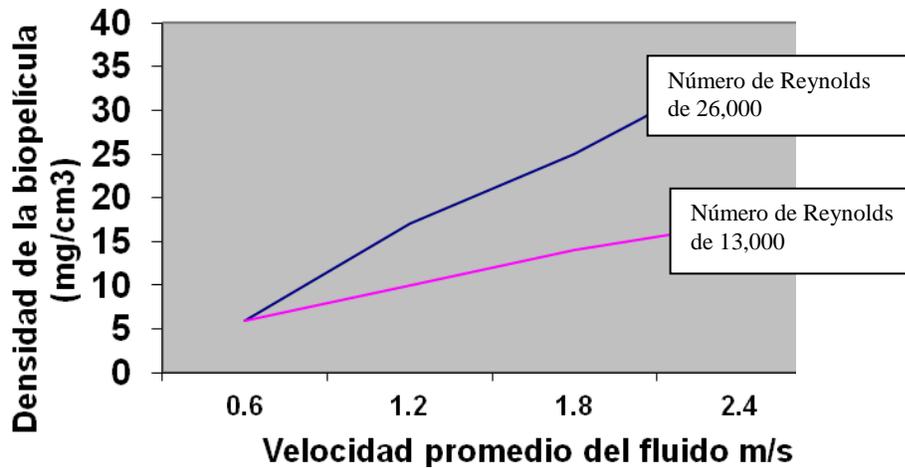
Las propiedades físicas, químicas y biológicas de las biopelículas dependen del ambiente al que están expuestas. El ambiente físico y químico se combina para seleccionar a los microorganismos que prevalecerán los cuales, a la vez, modificarán el microambiente en la superficie de la película.

Las propiedades termodinámicas relevantes de las biopelículas son su volumen y su masa. En sistemas de flujo turbulento, el grosor de la biopelícula húmeda raramente excede los 1000  $\mu\text{m}$ . La densidad de la masa seca de la biopelícula puede determinarse a partir del grosor de la biopelícula húmeda si se conoce su masa. La densidad refleja la masa seca por unidad de volumen de biopelícula húmeda y a partir de mediciones se tiene que, en sistemas de flujo turbulento, las densidades varían de 10 a 50  $\text{mg}/\text{cm}^3$ . Las densidades varían con los incrementos en la turbulencia, así como también con incrementos en la carga del sustrato, como se indica en las gráficas de la siguiente hoja.

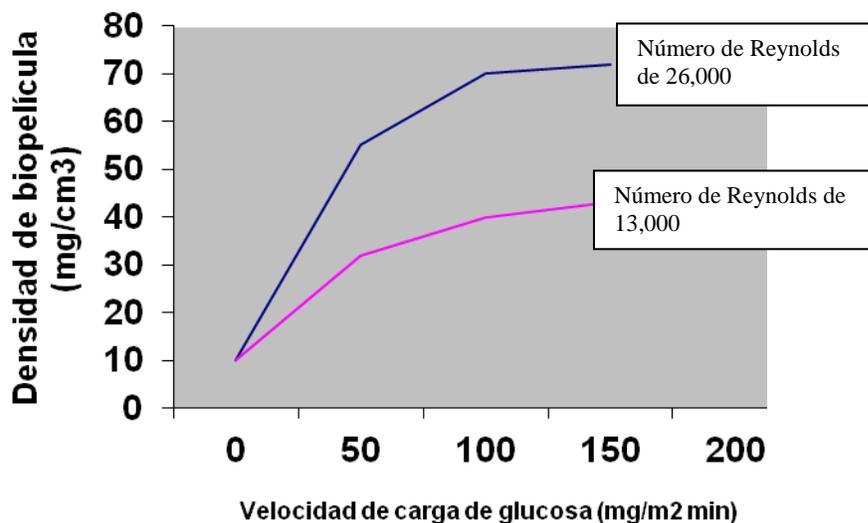
El incremento en la densidad con un aumento en la turbulencia puede ser causado por uno de los siguientes fenómenos (Bryers, 1988; Picioreanu y col., 2001):

- 1 Unión selectiva de ciertas especies de microbios
- 2 Respuesta metabólica de los microbios al estrés ambiental
- 3 Fuerzas de presión del fluido que hacen perder la frontera entre el agua y la biopelícula

Según datos experimentales de Bryers (1988), la velocidad a la que se depositó la biopelícula descende levemente sólo en los casos en que se duplicó el número de Reynolds. En experimentos a un número de Reynolds de 13,000 ( $0.8 \text{ m s}^{-1}$ ) la velocidad a la que se deposita ésta fue de 1.1 a 1.2  $\mu\text{g DQO cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$ , mientras que con un número de Reynolds de 26,000 ( $1.6 \text{ m s}^{-1}$ ), la velocidad a la que se depositó fue de 0.8  $\mu\text{g DQO cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$ .



Influencia del estrés de corte del fluido en la densidad de la biopelícula (Bryers, 1988)



Influencia de la velocidad de carga de la glucosa en la densidad de la biopelícula (Bryers, 1988)

La composición inorgánica de la biopelícula varía con la composición química del agua con que se alimenta y probablemente afecta la estructura física y biológica de la película. El calcio, el magnesio y el hierro afectan la unión intermolecular de los polímeros extracelulares de las biopelículas, mismos que son los responsables de la integridad estructural de ellas. De hecho, el EDTA es efectivo en el desprendimiento de la biopelícula. En intercambiadores de calor, los productos de la corrosión y los sólidos suspendidos pueden absorberse en la matriz de la biopelícula e influenciar su composición química (Christensen y Characklis, 1990).

La composición orgánica de la biopelícula está relacionada con la fuente de energía y de carbono disponibles para el metabolismo. El ambiente y la velocidad de reproducción microbiana ejercen efectos en la composición de las células y en sus productos extracelulares. Por ejemplo, una limitación en nitrógeno puede dar como resultado una gran producción de polisacáridos extracelulares (Christensen y Characklis, 1990).

El tipo de organismo que coloniza la superficie influye fuertemente sobre la velocidad de desarrollo de la biopelícula y las propiedades físicas y químicas de ella. Sin duda, la interacción organismo-organismo y organismo-ambiente cambia la distribución de la población durante la acumulación de la biopelícula.

Los primeros signos visibles de la actividad microbiana en una superficie son las pequeñas colonias de células que se distribuyen al azar en la superficie. Conforme la biopelícula continúa desarrollándose las colonias proliferan juntas para formar una biopelícula relativamente uniforme. El número de células viables es relativamente bajo comparado con el volumen de la biopelícula.

En muchos casos pueden emerger formas filamentosas de la biopelícula en desarrollo. Es frecuente encontrar en filamentos a *Hyphomicrobium*, *Sphaerotilus* y *Beggiatoa*. Estas formas pueden tener una ventaja ecológica ya que las células se pueden introducir en el fluido para obtener los nutrientes necesarios o el oxígeno requerido el cual puede estar muy limitado en las porciones más profundas de la película (Characklis, 1981).