



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**Evaluación de la desnitrificación por  
*Pseudomonas stutzeri* de aguas sintéticas de mar  
y residual doméstica bajo condiciones  
controladas de laboratorio**

**T E S I S**

**Que para obtener el título de  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

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

**CELENE GARCÍA CASTAÑEDA**

**Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2018**





Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## **JURADO ASIGNADO**

PRESIDENTE: Dr. Víctor Manuel Luna Pabello.

VOCAL: Q.F.B. Ruth Edith Martín Fuentes.

SECRETARIO: Dr. Hugo Antonio Hernández Pérez.

1er. SUPLENTE: Karla Montserrat González Reyes.

2do. SUPLENTE: M. en C. Luciano Hernández Gómez.

Sitio donde se desarrolló el tema: **Laboratorio de Microbiología Experimental, Facultad de Química, UNAM.**

Director de Tesis: Dr. Víctor Manuel Luna Pabello.

Asesor Técnico: M. en C. Luciano Hernández Gómez.

Sustentante: Celene García Castañeda.

---

## DEDICATORIA

---

## **Agradecimientos**

Se hace manifiesto el apoyo recibido de PAIP (BMLP)5000 91111 Facultad de Química, UNAM, 2017 y al Proyecto UNAM DGAPA PAPIIT IT202818, 2018-2020, para la obtención de materiales y reactivos empleado en la presente investigación.

---

## **Agradecimientos profesionales**

---

## Agradecimientos personales



---

## Índice temático

<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
<b>2. OBJETIVOS, HIPÓTESIS Y ALCANCES.....</b>	<b>6</b>
2.1 Objetivo General.....	6
2.2 Objetivos Particulares.....	6
2.3 Hipótesis.....	6
2.4 Alcances.....	7
<b>3. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>8</b>
3.1 Las aguas residuales en México y sus fuentes promotoras de contaminación.....	8
3.2 Tratamiento de las aguas residuales y sus diferentes alternativas.....	13
3.2.1 Niveles de tratamiento.....	14
3.2.2 Tipos de tratamiento.....	17
3.3 El Nitrógeno y su ciclo.....	19
3.3.1 Desnitrificación.....	21
3.3.1.1 Bajas temperaturas.....	24
3.3.1.2 Ambientes halofílicos.....	24
3.3.1.3 Efecto del pH.....	25
3.3.2 Nitratos y Nitritos. Contaminación y toxicidad.....	26
3.4 Normatividad.....	28
3.5 El género <i>Pseudomonas</i> .....	31
3.5.1 <i>Pseudomonas stutzeri</i> .....	32
3.5.1.1 Hábitat y relevancia ecológica.....	34
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>36</b>
4.1 Estrategia de trabajo.....	36
4.2 Descripción bacteriana.....	37

---

4.2.1 Descripción de crecimiento, morfológica y bioquímica .....	37
4.2.2 Aislamiento, Extracción y Purificación de ADN de <i>Pseudomonas stutzeri</i> .....	37
4.3 Modificación de las proporciones de MM, ASS y ASRD .....	37
4.4 Crecimiento bacteriano .....	38
4.4.1 Curva de crecimiento en Medio Mineral y Agua Sintética Salina.....	38
4.4.2 Crecimiento bacteriano en Agua Sintética Residual Doméstica .....	39
4.4.3 Curva de crecimiento en Agua Sintética Salina con Medio Mínimo (3:1) y Aguas Sintéticas Residual Doméstica con Salina (3:1).....	39
4.5 Determinación de cinéticas de degradación de nitratos .....	40
4.5.1 Curvas de producción de nitritos.....	40
4.6 Determinación del porcentaje de remoción de nitratos .....	40
4.7 Parámetros físico-químicos (temperatura, pH y O.D.).....	41
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>42</b>
5.1 Descripción bacteriana .....	42
5.1.1 Descripción morfológica, bioquímica y de crecimiento .....	42
5.1.2 Aislamiento, Extracción y Purificación de ADN de <i>Pseudomonas stutzeri</i> .....	43
5.2 Crecimiento bacteriano .....	44
5.2.1 Control positivo .....	44
5.2.2 Curvas de crecimiento en MM, ASS, ASRD y sus combinaciones .....	45
5.3 Remoción de nitratos .....	47
5.3.1 Cinéticas de remoción de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> en MM, ASS, ASRD y sus combinaciones .....	47
5.3.1.1 Curvas de producción de nitritos.....	52
5.3.2 Validación estadística del método (ANOVA).....	57
5.3.3 Determinación de temperatura, pH y O.D. ....	59
5.3.4 Porcentajes de remoción de nitratos en los diferentes medios y sus combinaciones .....	62
5.3.5 Comentarios finales .....	66
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>67</b>

<b>7. ANEXOS .....</b>	<b>69</b>
Anexo A. Preparación de agua de sal marina sintética (ASS) .....	69
Anexo B. Preparación de la curva de Mc Farland (Ramírez-Gama, <i>et al.</i> , 2008).....	70
Anexo C. Determinación de nitratos (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) mediante Absorción UV. Curva patrón .....	72
Anexo D. Determinación de nitritos (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) método de Sulfanilamida. Curva patrón .....	74
Anexo E. Amplificación del 16S rRNA.....	76
<b>8. REFERENCIAS .....</b>	<b>77</b>

## Índice de tablas

Tabla 3.1. Descargas de aguas residuales municipales y no municipales, 2015 (CONAGUA, 2016) .....	9
Tabla 3.2. Niveles de tratamiento de aguas residuales industriales, 2015 (CONAGUA, 2016).....	17
Tabla 3.3. Estados de oxidación de compuestos nitrogenados clave (Madigan <i>et al.</i> , 2004)......	20
Tabla 3.4. Ejemplo de bacterias desnitrificadoras que viven en hábitats salinos (Bothe <i>et al.</i> , 2007) .....	25
Tabla 3.5. Límites máximos permisibles de nitrógeno y pH en aguas residuales de México .....	29
Tabla 3.6. Límites permisibles de nitratos y nitritos en agua para consumo .....	29
Tabla 3.7. Normas mexicanas relacionadas con el sector agua (CONAGUA, 2010) .....	30
Tabla 4.1. Cantidades y proporciones de MM y ASS.....	38
Tabla 4.2. Cantidades y proporciones ASS y ASRD .....	38
Tabla 4.3. Fórmula del agua sintética residual doméstica (Lolmede, <i>et.al.</i> , 2000) .....	39
Tabla 5.1. Descripción macro y microscópica, bioquímica y de crecimiento de <i>Pseudomonas stutzeri</i> .....	42
Tabla 5.2. Tiempos de duplicación de <i>P. stutzeri</i> en distintos medios de exposición.....	46
Tabla 5.3. Concentración de nitratos en los medios modificados con agua salina en función del tiempo.....	48

Tabla 5.4. Concentración de nitratos en los medios modificados con agua residual en función del tiempo.....	49
Tabla 5.5. Concentración de nitritos en los medios modificados con agua salina en función del tiempo.....	53
Tabla 5.6. Concentración de nitritos en los medios modificados con agua residual en función del tiempo.....	54
Tabla 5.7. Resultados Análisis de Varianza (resumen estadístico).....	58
Tabla 5.8. Diferencia mínima significativa entre los medios experimentales y toma de decisión.....	58
Tabla 5.9. Registro de temperatura, pH y O.D.....	60
Tabla 5.10. Porcentajes de remoción de nitratos en MM, ASS, ASRD y sus distintas combinaciones (día 0-12) .....	62
Tabla 5.11. Análisis estadístico de la tabla 5.10 y gráfica 5.10. $H_0: C_f=C_i$ / $H_1: C_f<C_i$ . T student $n=5$ , $v=4$ , $\alpha=5\%$ .....	64
Tabla 5.12. Análisis estadístico de gráfica 5.11. $H_0: \%R_E=\%R_B$ / $H_1: \%R_E<\%R_B$ . T student $n=5$ , $v=4$ , $\alpha=5\%$ .....	65
Tabla A.1. Propiedades del agua de mar sintética (ASS) .....	69
Tabla B.1. Cantidades de cloruro de bario y ácido sulfúrico utilizadas en la escala de McFarland y su equivalencia con No. bacterias/mL.....	70
Tabla C.1. Cantidades de solución de nitratos utilizadas para la curva de calibrado y su equivalencia con la concentración de $\mu\text{g NO}_3^-/\text{mL}$ .....	72
Tabla D.1. Cantidades de solución de nitratos y reactivos de color utilizados para la curva patrón y su equivalencia con la concentración de $\text{mg NO}_2^-/\text{L}$ .....	74
Tabla E.1. Cebadores 16S rRNA bacteriano .....	76

## Índice de gráficas

Gráfica 5.1. Crecimiento bacteriano en MM y ASS en función del tiempo. Determinación de McFarland.....	45
--	----

Gráfica 5.2. Curvas de crecimiento de <i>P. stutzeri</i> expuesta a distintos medios experimentales (n=17) .....	46
Gráfica 5.3 Curva de concentración de nitratos en función del tiempo (agua sintética salina)50	
Gráfica 5.4. Curva de concentración de nitratos en función del tiempo (agua sintética residual doméstica) .....	50
Gráfica 5.5. Concentración del nitrato inversamente proporcional al crecimiento del microorganismo .....	51
Gráfica 5.6. Curva de concentración de nitritos en función del tiempo (agua salina) .....	55
Gráfica 5.7. Curva de concentración de nitritos en función del tiempo (agua residual) .....	55
Gráfica 5.8. Reducción de nitratos y la simultánea producción de nitritos .....	56
Gráfica 5.9. Tendencia de parámetros (T°, pH, O.D.) .....	60
Gráfica 5.10. Concentración inicial y final de nitratos en los medios de exposición .....	63
Gráfica 5.11. Porcentaje de remoción de nitratos en los medios de exposición.....	63
Gráfica B.1. Curva de McFarland.....	71
Gráfica C.1. Curva patrón de nitratos (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ).....	73
Gráfica D.1. Curva patrón de nitritos (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ).....	75

## Índice de figuras

Figura 3.1. La cara oscura del nitrógeno (Townsend & Howarth, 2010) .....	12
Figura 3.2 Valores medios anuales de los componentes del ciclo hidrológico en México, 2015. (CONAGUA, 2016) .....	11
Figura 3.3. Proceso de tratamiento de aguas residuales (Madigan <i>et al.</i> , 2004).....	15
Figura 3.4. Principales procesos de tratamiento de aguas residuales municipales, por caudal tratado, 2015 (CONAGUA 2016) .....	19
Figura 3.5. Ciclo de óxido reducción del nitrógeno. Las reacciones de oxidación están representadas por flechas amarillas y las de reducción por rojas (Madigan <i>et al.</i> , 2004) .....	20
Figura 3.6. Secuencia de reducción desde nitrato hasta nitrógeno gaseoso .....	22
Figura 3.7. Transformación de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> a N <sub>2</sub> en agua residual (Claros, 2012) .....	23

---

Figura 3.8. Esquema del transporte de electrones de <i>Pseudomonas stutzeri</i> durante la desnitrificación (Madigan <i>et al.</i> , 2004).....	33
---	----

## Índice de ecuaciones

Ecuación 4.1. Cinética de degradación de nitratos .....	40
Ecuación 4.2. Porcentaje de remoción de nitratos (% desnitrado) .....	40
Ecuación 5.1. Número aproximado de bacterias en función de la turbidez del medio .....	44

## RESUMEN

El nitrógeno (N) principalmente en su forma de ion nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), es uno de los contaminantes predominantes en las aguas residuales domésticas crudas o parcialmente tratadas por métodos biológicos aerobios como lodos activados, lagunas de estabilización y discos biológicos. Este tipo de tratamientos suelen ser deficientes en la remoción de contaminantes nitrogenados y fosforados, por lo que las descargas de aguas tratadas por los mismos ocasiona diversos daños en los cuerpos de agua receptores, como es el caso de la eutrofización de los mismos. México es un país que cuenta con una gran extensión de litoral, el cual es susceptible de recibir aguas residuales contaminadas con residuos orgánicos e inorgánicos, como es el caso del Golfo de México, el cual recibe enormes volúmenes de aguas residuales, no tratadas, generadas en la Ciudad de México y zonas conurbadas. Por ello, resulta de alto interés el realizar el estudio del efecto que, en el proceso de bio-degradación de contaminantes, tiene la combinación de diferentes proporciones de agua residual vs agua de mar. En este sentido, para la realización de la presente tesis, se seleccionó a *Pseudomonas stutzeri* (bacteria Gram negativa) por su reconocida capacidad desnitrificante y su amplia distribución ambiental, incluido el fondo marino.

La identificación de *Pseudomonas stutzeri* se realizó mediante la aplicación de pruebas bioquímicas y técnicas de biología molecular (Reacción en Cadena de la Polimerasa – PCR). Los experimentos se enfocaron en determinar las condiciones que favorecen la remoción de nitratos por dicho microorganismo en una combinación de aguas sintéticas de mar (agua salina) y residual doméstica. Los medios en los que se trabajó fueron medio mineral (MM o M9) el cual posee todos los requerimientos necesarios para el desarrollo óptimo de *P. stutzeri*, agua destilada (AD) siendo el medio sin nutrientes usado como blanco para el monitoreo del crecimiento de la bacteria así como su actividad desnitrificante, agua sintética salina (ASS) y agua sintética residual doméstica (ASRD), las cuales se mezclaron en proporciones geométricas para el estudio de la actividad del microorganismo. Como prueba inicial se determinó el tiempo de duplicación de la bacteria en MM con un resultado de 43.8 minutos y en ASS con un tiempo de 47.3 minutos. Los resultados indican que *P. stutzeri* es una bacteria Gram negativa con excelente capacidad de adaptación al medio y eficaz desnitrificante en todas las condiciones expuestas. El medio ASS:AD (3:1) fue en el que ocurrió la mayor transformación de nitratos con un porcentaje de remoción del 91.82% quedando en última posición el medio con solo agua residual al obtener 80.80% de nitratos removidos. Los

parámetros biológicos y fisicoquímicos considerados fueron ion nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), ion nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), temperatura, pH y oxígeno disuelto (O.D.). La transformación de los nitratos a otros compuestos nitrogenados está en función de la temperatura, pH y la concentración de O.D., es decir, cuanto más elevados sean la temperatura y el pH mayor será la actividad desnitrificante presentada. Por el contrario, en presencia de una concentración elevada de O.D. la desnitrificación se ve disminuida. La validación del modelo conceptual se realizó mediante una prueba de ANOVA con los valores obtenidos experimentalmente (en las distintas proporciones de ASS y ASRD) a un intervalo de confianza del 95%, lo cual permitió establecer significancia estadística al sistema.

## 1. INTRODUCCIÓN

El agua es un recurso natural esencial para la supervivencia de todas las formas de vida conocidas. La calidad de dicho recurso se degrada cada día debido a acciones de origen antropogénico, en su mayoría derivadas de actividades de tipo doméstico, agrícola e industrial. La problemática ambiental que representa el vertido incontrolado de residuos líquidos y sólidos sobre medios acuáticos naturales como acuíferos, ríos y lagos, ha ocasionado que el tratamiento de las aguas residuales suscite especial interés debido a la necesidad cada vez más urgente de gestionar este foco de contaminación ambiental (Claros, 2012).

Los recursos hídricos en México, al igual que en el resto del mundo, se encuentran bajo una creciente presión. El crecimiento demográfico, la urbanización y la demanda en el consumo de agua en los hogares, la agricultura y la industria, han aumentado significativamente el uso global del agua. La falta de coordinación entre usuarios y autoridades, aunado a la falta de un adecuado tratamiento y reuso de las aguas residuales generadas; conducen a la sobreexplotación del recurso, la contaminación de ecosistemas, la degradación de suelos y a un impacto negativo sobre la inocuidad alimentaria. Ante esta problemática, el saneamiento de las aguas residuales adquiere más importancia para asegurar su recolección, conducción, tratamiento y adecuada disposición en los cuerpos receptores, en condiciones que no perjudiquen al medio ambiente y a la salud de la población (BID, 2013).

En México, el 75% de las aguas residuales generadas por actividades antropogénicas se vierten a cuerpos de agua naturales y artificiales sin ningún tratamiento previo, provocando deterioro en los ecosistemas. El aumento en las descargas de agua residuales ha llevado a que la mayoría de los cuerpos receptores de agua, así como los mantos freáticos presenten distintos tipos y niveles de contaminación. En el caso de la Ciudad de México, los pocos lagos que sobreviven cuentan con niveles elevados de materia orgánica, sólidos suspendidos, sólidos disueltos, nutrimentos y compuestos tóxicos (CONAGUA, 2011).

El tratamiento eficaz de las aguas residuales ha sido el factor más importante que ha determinado los avances realizados en salud pública en el último siglo. La potabilización de las aguas permite el consumo general del agua libre de microorganismos patógenos y de compuestos químicos indeseables. El agua residual debe ser tratada antes de ser vertida en las aguas superficiales,

para reducir o eliminar patógenos y nutrientes que estimulan el crecimiento de algas. El objetivo principal de éste es obtener agua con calidad suficiente para ser utilizada directamente en una planta de potabilización de agua (Madigan *et al.*, 2004). La gestión sostenible y el tratamiento integral de los recursos hídricos es una cuestión prioritaria en la sociedad en que vivimos. Es importante disponer de agua con calidad adecuada y que se encuentre en cantidad suficiente para poder soportar las actividades derivadas del desarrollo, lo que permitirá una mejora en el medio ambiente, la salud y la calidad de vida (Martín *et al.*, 2006).

Dentro de los principales problemas ambientales asociados a la contaminación por nitrógeno en los sistemas acuáticos son la acidificación de ríos y lagos con baja o mínima alcalinidad, la eutrofización de las aguas dulces y marinas y una toxicidad directa de los compuestos nitrogenados como el amoníaco ( $\text{NH}_3$ ), amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ), nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) y nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) para las especies acuáticas (Bystrôm *et al.*, 2000). La contaminación atmosférica asociada al nitrógeno (las partículas sólidas así como el ozono a ras del suelo), afecta a centenares de millones de personas; aumenta la incidencia de trastornos cardiopulmonares y eleva las tasas de mortalidad (Townsend & Howarth, 2010).

El nitrógeno es esencial para el crecimiento biológico por su actividad para la síntesis de proteínas, es también llamado nutriente o bioestimulante. Debido a su importancia es necesario conocer la información sobre su concentración requerida a la hora de evaluar el tratamiento del agua residual. Éste en forma de nitrato, es la especie química más oxidada del nitrógeno que se encuentra en las aguas residuales.

Los organismos desnitrificadores se encuentran comúnmente en muchos ambientes naturales, tales como sistemas de tratamiento de aguas residuales, tratamiento de suelos, sedimentos marinos y de agua dulce, entre otros. Los estudios sobre la ecología de desnitrificadores comenzaron con su cultivo en diversos ambientes, uno de los primeros y más completos se llevó a cabo con comunidades desnitrificadoras en suelo aislando 1500 bacterias de las cuales 146 fueron capaces de desarrollar una desnitrificación completa. Los géneros destacados en este estudio fueron *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Alcaligenes*, *Paracoccus*, *Rhodobacter*, *Rubrivivax*, *Thauera*, *Burkholderia*, *Bacillus* y *Streptomyces* considerándose dominantes en diversos entornos. Los desnitrificadores marinos fueron *Shewanella báltica* y *Marinobacter* spp. (Boethe *et al.*, 2007).

Las bacterias desnitrificantes representan del 10 al 15% de la población bacteriana en suelo, agua y sedimentos. Los desnitrificadores utilizan una amplia gama de compuestos inorgánicos y orgánicos como fuente de carbono y energía. La desnitrificación es un rasgo que se encuentra en más de 50 géneros. La mayoría de estas bacterias pertenecen a una amplia gama de subclases de  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\epsilon$ -proteobacterias, bacterias Gram positivas, entre ellas destacan algunas como *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Bacillus* y algunas especies de Actinobacterias especialmente *Streptomyces* (Boethe *et al.*, 2007).

Las pseudomonas tienen requerimientos nutritivos muy simples y crecen quimioorganotróficamente a pH neutro en un rango mesofílico de temperaturas. Una de las características más representativas de las pseudomonas, es el amplio abanico de compuestos que pueden utilizar como fuentes de carbono y energía. Las pseudomonas son ecológicamente significativas en suelo y agua, y probablemente las responsables de la degradación de muchos de los compuestos presentes en estos ambientes (Madigan *et al.*, 2004).

En este estudio se evaluó mediante técnicas espectrofotométricas la capacidad de *Pseudomonas stutzeri* (aislada del piso de un taller mecánico) para realizar el proceso de desnitrificación. Se determinaron cinéticas de crecimiento del microorganismo expuesto a distintas proporciones de agua sintética salina y agua sintética residual doméstica, comparando con el efecto de remoción de nitratos en los distintos medios.

## 2. OBJETIVOS, HIPÓTESIS Y ALCANCES

### 2.1 Objetivo General

Evaluar el proceso de desnitrificación en aguas sintéticas de mar y residual doméstica empleando a *Pseudomonas stutzeri* bajo condiciones controladas de laboratorio.

### 2.2 Objetivos Particulares

- Confirmar la identificación de *Pseudomonas stutzeri* por medio de pruebas bioquímicas y técnicas de PCR.
- Determinar las condiciones experimentales para evaluar la desnitrificación por *Pseudomonas stutzeri* en aguas sintéticas de mar y residual doméstica.
- Determinar las cinéticas de crecimiento de *P. stutzeri* en aguas sintéticas de mar y residual doméstica en diferentes proporciones.
- Evaluar el proceso de desnitrificación por *P. stutzeri* bajo diferentes proporciones de los medios de ASS y ASRD bajo condiciones controladas de laboratorio.

### 2.3 Hipótesis

Si *Pseudomonas stutzeri* es una especie encontrada en el ambiente marino y ha sido ampliamente estudiada por su capacidad desnitrificante entonces será posible elaborar un modelo conceptual del proceso de desnitrificación a partir de la determinación y procesamiento adecuado de los valores de parámetros físicos, químicos y biológicos que contribuyan a la mejor comprensión del proceso desarrollado.

## 2.4 Alcances

La presente investigación tiene como finalidad determinar las condiciones experimentales para el desarrollo óptimo y mayor actividad desnitrificante de *Pseudomonas stutzeri* expuesta en medios con proporciones geométricas de aguas sintéticas salina y residual doméstica (100:0, 75:25, 50:50, 25:75, 0:100), mediante técnicas espectrofotométricas y con ello realizar el seguimiento y modelación de dicho proceso en los sistemas experimentales.

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1 Las aguas residuales en México y sus fuentes promotoras de contaminación.

En México, el agua ha sido reconocida como un asunto estratégico y de seguridad nacional, y se ha convertido en elemento central de las actuales políticas ambientales y económicas, así como un factor clave del desarrollo social. Lograr que todos los cuerpos de agua superficiales y subterráneos del país recuperen su salud, aporten caudales para satisfacer las necesidades de la población y contribuyan al crecimiento económico y calidad de vida de la población; requiere que se mantengan limpios, sin descargas de aguas residuales urbanas, industriales y agrícolas que los contaminen y afecten más allá de su capacidad natural de asimilación y dilución (BID, 2013). Para caracterizar las aguas residuales se emplean un conjunto de parámetros que permiten cuantificar los contaminantes más habituales (Martín *et al.*, 2006):

- Sólidos en Suspensión: sólidos que no pasan a través de una membrana filtrante de un tamaño determinado (0.45 micras).
- Aceites y Grasas: el contenido de éstos presentes en agua residual se determina mediante su extracción previa con un disolvente apropiado, la posterior evaporación del disolvente y el pesaje del residuo obtenido.
- Demanda Bioquímica de Oxígeno a los 5 días (DBO<sub>5</sub>): cantidad de oxígeno disuelto (mg O<sub>2</sub>/L) necesario para oxidar biológicamente la materia orgánica de las aguas residuales. En el transcurso de los cinco días de duración del ensayo se consume aproximadamente el 70 % de las sustancias biodegradables.
- Demanda Química de Oxígeno (DQO): cantidad de oxígeno (mg O<sub>2</sub>/L) necesaria para oxidar los componentes del agua recurriendo a reacciones químicas.
- Nitrógeno: se presenta en las aguas residuales en forma de amoníaco fundamentalmente y como nitratos y nitritos. Para su determinación se recurre a métodos espectrofotométricos.
- Fósforo: en las aguas residuales aparece principalmente como fosfatos orgánicos y polifosfatos. Para su determinación se emplean métodos espectrofotométricos.

- Organismos patógenos: como organismos indicadores de contaminación fecal se utilizan normalmente los Coliformes Totales y Fecales.

En nuestro país, la CONAGUA periódicamente establece estadísticas sobre las descargas de aguas residuales en cuerpos acuáticos. Con el objeto de preservar la calidad del agua, se han construido plantas de tratamiento de aguas residuales para su descarga a los ríos y cuerpos de agua. En el 2010 solamente se trataba el 35% de las aguas municipales; al 2015, las 2477 plantas municipales en operación en el país trataron 120.9 m<sup>3</sup>/s, es decir, el 57% de los 212m<sup>3</sup>/s de aguas residuales municipales recolectados en el alcantarillado, en tanto que de las aguas residuales industriales, el porcentaje de tratamiento es del 18%. Lo antes mencionado se puede apreciar en la tabla 3.1 (CONAGUA, 2016).

Tabla 3.1. Descargas de aguas residuales municipales y no municipales, 2015 (CONAGUA, 2016).

<b>Centros urbanos (descargas municipales):</b>		
<b>Volumen</b>		
Aguas residuales	7.23	Miles de hm <sup>3</sup> /año (229.1 m <sup>3</sup> /s)
Se recolectan en alcantarillado	6.69	Miles de hm <sup>3</sup> /año (212.0 m <sup>3</sup> /s)
Se tratan	3.81	Miles de hm <sup>3</sup> /año (120.9 m <sup>3</sup> /s)
<b>Carga contaminante</b>		
Se generan	1.95	Millones de toneladas de DBO <sub>5</sub> al año
Se recolectan en alcantarillado	1.81	Millones de toneladas de DBO <sub>5</sub> al año
Se mueven en los sistemas de tratamiento	0.84	Millones de toneladas de DBO <sub>5</sub> al año
<b>Usos no municipales, incluyendo a la industria:</b>		
<b>Volumen</b>		
Aguas residuales no municipales	6.77	Miles de hm <sup>3</sup> /año (214.6 m <sup>3</sup> /s)
Se tratan	2.22	Miles de hm <sup>3</sup> /año (70.5 m <sup>3</sup> /s)
<b>Carga contaminante</b>		
Se generan	10.15	Millones de toneladas de DBO <sub>5</sub> al año
Se remueven en sistemas de tratamiento	1.49	Millones de toneladas de DBO <sub>5</sub> al año

Para abordar el problema del nitrógeno deben comprenderse los procesos químicos involucrados y entender de qué manera contribuye el nitrógeno a la degradación del medio. Todo lo dañino y benéfico de este elemento aparece cuando se descomponen las moléculas

del N<sub>2</sub>. En la atmósfera da origen al ozono a ras de la tierra, cuando se presenta en forma de óxido nítrico (NO) o dióxido de nitrógeno (NO<sub>2</sub>), bajo la denominación general de NO<sub>x</sub>. La formación de ozono resulta nociva porque en la superficie del suelo constituye un gas de efecto invernadero, deteriora los tejidos vegetales limitando la capacidad de éstos de absorber dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y compensar así el calentamiento global, ver figura 3.1 (Townsend & Howarth, 2010).

Las fuentes de contaminación por nitrógeno en suelos y aguas (superficiales y subterráneas), se asocian mayoritariamente a actividades agrícolas y ganaderas; aunque en determinadas áreas, también pueden aparecer asociadas a actividades industriales. Hay muchas fuentes de contaminación de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en los suelos agrícolas, incluidos los abonos artificiales y naturales, residuos de cosechas, la deposición atmosférica y la fijación biológica de N<sub>2</sub>. Las descargas que derivan de actividades agrícolas y ganaderas, conocidas como fuentes no puntuales o difusas, se caracterizan por la gran cantidad de puntos de entrada de la contaminación en el cuerpo de agua y por la dificultad que supone hacer una localización precisa de las zonas donde se produce la entrada de los contaminantes. No obstante, también existe una contaminación por nitrógeno de tipo puntual, en el cual la fuente de contaminación es más fácil de identificar ya que se suelen localizar en zonas de extensión restringida y frecuentemente se asocian con vertidos urbanos o industriales (Kralj *et al.*, 2005).

La consecuencia de los compuestos nitrogenados y de otros contaminantes presentes en las descargas, tales como materia orgánica, ortofosfatos, microorganismos indeseables, entre otros, provocan que en el país casi el 40% de las aguas superficiales estén fuertemente contaminadas (CONAGUA, 2010).

Los usuarios del agua y demás actores involucrados en el sector, siguen satisfaciendo sus necesidades sin tomar en cuenta el impacto sobre los demás. Las diferentes actividades productivas al generar desechos diversos son las fuentes principales de contaminación de los diferentes cuerpos de agua; una grave consecuencia de las descargas de aguas residuales con exceso de sustancias nitrogenadas es el deterioro de la calidad del cuerpo de agua y la disminución de sus niveles de oxígeno; lo que se traduce en la desaparición de la vegetación natural, así como en la muerte de peces y demás animales acuáticos. Por otra parte la descarga directa a cuerpos de agua de las aguas residuales generadas en estas actividades,

limita el manejo del recurso para los diferentes usos productivos como el riego o la pesca y la agricultura; el consumo (agua potable) y recreación de contacto (BID, 2013).

Anualmente México recibe aproximadamente 1 449 471 millones de metros cúbicos de agua en forma de precipitación. De esta agua, se estima que el 72.5% se evapotranspira y regresa a la atmósfera, el 21.2% escurre por los ríos o arroyos, y el 6.3% restante se infiltra al subsuelo de forma natural y recarga los acuíferos. La figura 3.2 muestra los componentes y valores que conforman el cálculo del agua renovable en nuestro país.

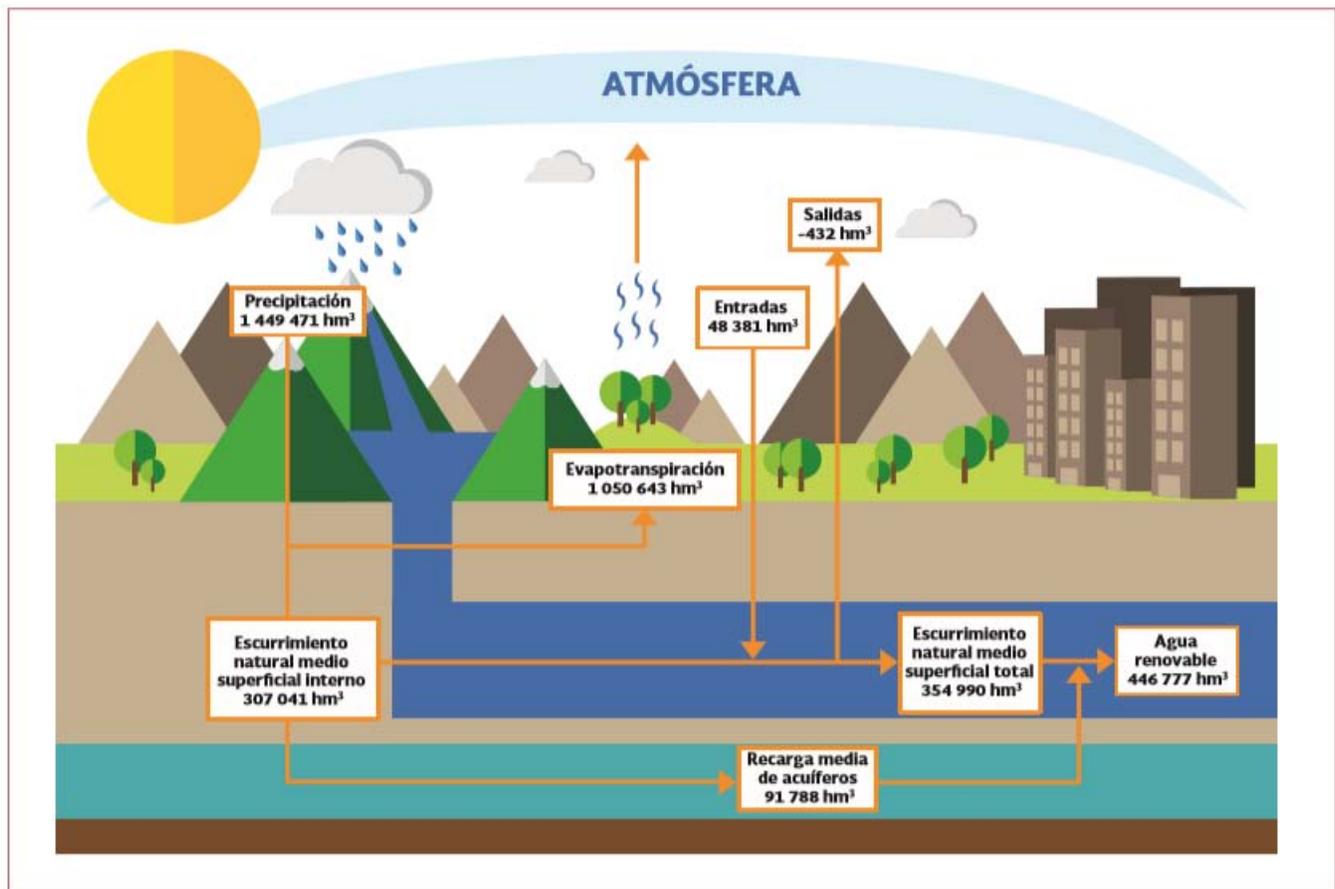


Figura 3.2 Valores medios anuales de los componentes del ciclo hidrológico en México, 2015.

(CONAGUA, 2016).



Figura 3.1. La cara oscura del nitrógeno. El gas nitrógeno  $N_2$ , el componente más abundante de la atmósfera terrestre, es inofensivo. Pero forma compuestos reactivos emitidos por las explotaciones agropecuarias y la industria y vehículos donde se queman combustibles fósiles; en tal estado, el nitrógeno constituye una gran amenaza para el entorno y la salud humana (Townsend & Howarth, 2010).

### **3.2 Tratamiento de las aguas residuales y sus diferentes alternativas.**

Existe hoy en día una gran variedad de sustancias a las que están expuestos el hombre y todos los seres vivos, incrementando con ello la posibilidad de que éstas contribuyan en términos generales en riesgos a la salud y el ambiente, por lo que la razón más poderosa por la cual se debe tratar el agua contaminada es por salud.

En nuestro país la cobertura de alcantarillado está definida por la CONAGUA, como el porcentaje de la población que habita en viviendas particulares, cuya vivienda cuenta con un desagüe conectado a la red pública de alcantarillado, a una fosa séptica, a un río, lago o mar o a una barranca o grieta. Por ello, cuando se habla de tratamiento de aguas residuales como indicador, se habla del porcentaje de aguas residuales colectadas en los sistemas formales de alcantarillado municipales que reciben tratamiento, sin considerar el tratamiento de las descargas industriales. A nivel nacional existen 2 355 sitios de descarga de aguas negras. El Estado de México, Puebla y Veracruz suman juntos el 30% del total (BID, 2013).

Las descargas de aguas residuales se clasifican en municipales e industriales. Las primeras corresponden a las que son manejadas en los sistemas de alcantarillado municipales urbanos y rurales, en tanto que las segundas son aquellas descargadas directamente a los cuerpos receptores de propiedad nacional, como es el caso de la industria autoabastecida (denominada así a aquella que toma el agua que requiere directamente de los ríos, arroyos, lagos o acuíferos del país) (CONAGUA, 2011).

El plan de recuperación y reutilización de aguas residuales debe incluir los siguientes análisis: determinación de las necesidades de tratamiento y evacuación de aguas residuales; determinación de la demanda y recursos de agua de abastecimiento; determinación de los beneficios en el abastecimiento de agua en función del potencial de reutilización; análisis del mercado para el agua residual recuperada; análisis económico e ingenieril de las posibles alternativas, accesibilidad a nivel sociocultural ambiental de la sociedad y el desarrollo del plan y análisis financiero (CONAGUA, 2007).

### 3.2.1 Niveles de tratamiento.

El tratamiento del agua puede dividirse en tres categorías principales (Manahan, 2014):

- Purificación para uso doméstico: eliminación total de microorganismos que causan enfermedades pero puede contener niveles mínimos de calcio y magnesio disueltos (dureza).
- Tratamiento para aplicaciones industriales especializadas: puede contener bacterias pero debe ser blandas para evitar incrustaciones.
- Tratamiento de las aguas residuales para hacerlas aceptables para su vertido o reutilización: requieren tratamientos menos estrictos que los anteriores.

Los procesos actuales de tratamiento de las aguas residuales son clasificados en categorías primaria, secundaria y terciaria principalmente, cada nivel de tratamiento emplea tecnologías más complejas y caras como se muestra en la figura 3.3. Las características de estos niveles consisten en lo siguiente (Manahan, 2014):

**Tratamiento primario:** puede ser físico o físico-químico y se realiza en tanques de sedimentación para la eliminación de materia insoluble como arena, grava y espuma del agua. El primer paso es generalmente el tamizado o cribado con el que se retienen los sólidos grandes que entran al sistema de alcantarillado los cuales son sometidos a procesos de trituración. El líquido resultante se deja asentar durante unas horas (puede ayudarse con adición de productos químicos) para la sedimentación de sólidos de menor tamaño, el resultado incluye material que flota y se conoce como grasas y aceites (aceites, ceras, ácidos grasos libres y jabones insolubles que contienen calcio y magnesio) que se eliminan mediante un dispositivo desespumante o desnatador. El lodo después de ser procesado es usado como abono.

Los municipios que proporcionan sólo tratamientos primarios generan agua muy contaminada cuando el efluente es vertido en los ríos debido a la gran cantidad de materia orgánica y otros nutrientes que permanecen en las aguas después del tratamiento primario.

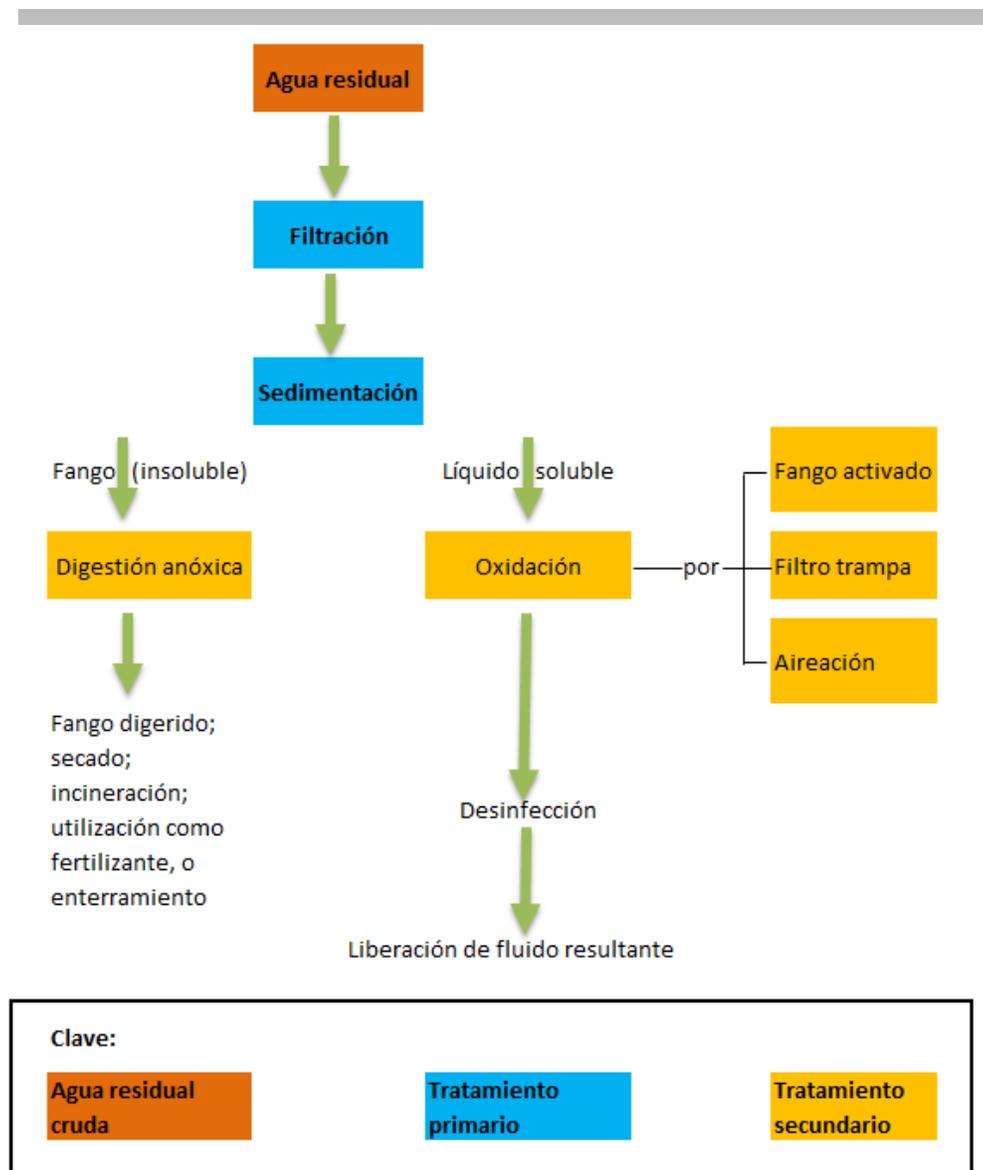


Figura 3.3. Proceso de tratamiento de aguas residuales (Madigan *et al.*, 2004).

**Tratamiento secundario:** diseñado para eliminar la materia orgánica biodegradable en el agua residual, este proceso es esencialmente biológico y las bacterias son empleadas intencionalmente para consumir parte de los contaminantes que no fueron removidos en el tratamiento primario y éste puede ser de dos tipos:

- **Anaeróbico:** comprende reacciones digestivas y fermentativas llevadas a cabo por microorganismos. La degradación se lleva a cabo en tanques cerrados llamados digestores de fangos o biorreactores y requieren la acción de microorganismos que

digieren los compuestos macromoleculares por polisacaridas, proteasas y lipasas dando como resultado componentes solubles que posteriormente serán fermentados; están compuestos por grandes discos de plástico que giran permitiendo la transformación del material biodegradable en CO<sub>2</sub> y nuevos microorganismos. La ventaja de estos procesos es su bajo consumo de energía.

- **Aeróbico:** los procesos empleados más comunes son el filtro trampa y lodo activado. Un filtro trampa es un lecho de rocas aplastadas en cuya parte superior se añade el agua residual. El líquido pasa lentamente a través del lecho y la materia orgánica se adhiere a las rocas, en cuya superficie tiene lugar el crecimiento microbiano. La completa mineralización de la sustancia orgánica hasta dióxido de carbono, amoníaco, nitrato, sulfato y fosfato tiene lugar en el biofilm microbiano que se ha formado en la superficie de las rocas. El tratamiento más común de este tipo es el fango activado.

**Tratamiento terciario:** se considera que en los tratamientos anteriores se ha logrado eliminar un 85% de los contaminantes de las aguas residuales y lo que falta se agrupa en tres categorías generales 1) sólidos en suspensión, 2) materiales orgánicos disueltos y 3) compuestos orgánicos disueltos, éstos conforma los nutrientes que favorecen el crecimiento de la flora acuática (algas, lirios, etc.). Consiste en una serie de procesos fisicoquímicos en los que se incluyen filtraciones, desinfección, precipitaciones y cloraciones en procesos muy similares a los seguidos por la potabilización del agua. Se debe tener gran cuidado con los microorganismos empleados y arrastrados del tratamiento secundario ya que muchos de éstos son causantes de enfermedades, los principalmente encontrados son causantes de tuberculosis, bacterias causantes de disentería (*Bacillus dysenteriae*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella paradysenteriae*, *Proteus vulgari*), bacterias de cólera (*Vibrio cholerae*), causantes de paludismo (*Leptospira typhosa*, *Salmonella paratyphi*) y virus causantes de infecciones en ojos, hepatitis infecciosa, poliomeilitis, entre otras.

La Comisión Nacional del Agua resume las actividades llevadas a cabo para el tratamiento de aguas residuales industriales durante los distintos niveles de tratamiento en la tabla 3.2.

Tabla 3.2. Niveles de tratamiento de aguas residuales industriales, 2015 (CONAGUA, 2016).

Tipo de tratamiento	Propósito	Número de plantas	Gasto de operación (m <sup>3</sup> /s)	Porcentaje
PRIMARIO	Ajustar el pH y remover materiales orgánicos y/o inorgánicos en suspensión con tamaño igual o mayor a 0.1 mm.	913	27.65	39.20
SECUNDARIO	Remover materiales orgánicos coloidales y disueltos.	1 660	35.37	50.20
TERCIARIO	Remover materiales disueltos que incluyen gases, sustancias orgánicas naturales y sintéticas, iones, bacterias y virus.	85	1.47	2.10
NO IDENTIFICADO	---	174	6.02	8.50
	<b>TOTAL</b>	<b>2 832</b>	<b>70.50</b>	<b>100.00</b>

### 3.2.2 Tipos de tratamiento.

El objetivo de los diferentes tipos y niveles de tratamiento es reducir la carga de contaminantes del vertido y convertirlo en inocuo para el medio ambiente y la salud humana. Los tipos de tratamientos son clasificados en físicos, químicos y biológicos.

**Tratamientos físicos:** utilizan fuerzas físicas y son empleados generalmente en todos los niveles de tratamiento. Las operaciones físicas más usadas son:

- Tamizado
- Homogenización de caudales.
- Intercepción de aceites y grasas.
- Mezclado.
- Sedimentación.
- Flotación (natural o provocada con aire).
- Filtración (con arena, carbón, cerámicas, etc.).

**Tratamientos químicos:** son todos los procesos en los que la eliminación de los contaminantes presentes en el agua residual se lleva a cabo mediante la adición de reactivos químicos, o bien mediante las propiedades químicas de diversos compuestos. Se utilizan junto con tratamientos físicos y biológicos. Algunos tratamientos de este tipo son:

- Coagulación-floculación: agregación de pequeñas partículas usando coagulantes y floculantes (sales de hierro, aluminio, poli electrolito, etc.).
- Precipitación química: eliminación de metales pesados haciéndolos insolubles con la adición de hidróxido de sodio u otros compuestos que eleven el pH.
- Oxidación-reducción: con oxidantes como el peróxido de hidrógeno, ozono, cloro, permanganato de potasio o reductores como el sulfito de sodio.

**Tratamientos biológicos:** son aquellos facilitados por bacterias que digieren la materia orgánica presente en los fluidos residuales. El contenido del agua residual es utilizado por los microorganismos como nutrientes, los cuales son convertidos en tejido celular y diversos gases como por ejemplo  $N_2$ .

Los flóculos que se forman por agregación de microorganismos son separados en forma de lodos. Los tejidos formados son ligeramente más pesados que el agua por tanto, la separación se hace por sedimentación y decantación.

Los principales procesos biológicos según el tipo de microorganismos, se clasifican como aerobios y anaerobios. Los procesos aerobios requieren la presencia de oxígeno y los anaerobios no lo requieren. El tratamiento de las aguas residuales por la acción anaerobia ofrece la solución a los problemas del tratamiento y disposición de los desechos líquidos. Los principales procesos de tratamiento usados en plantas de tratamiento del país se muestran en la figura 3.4.

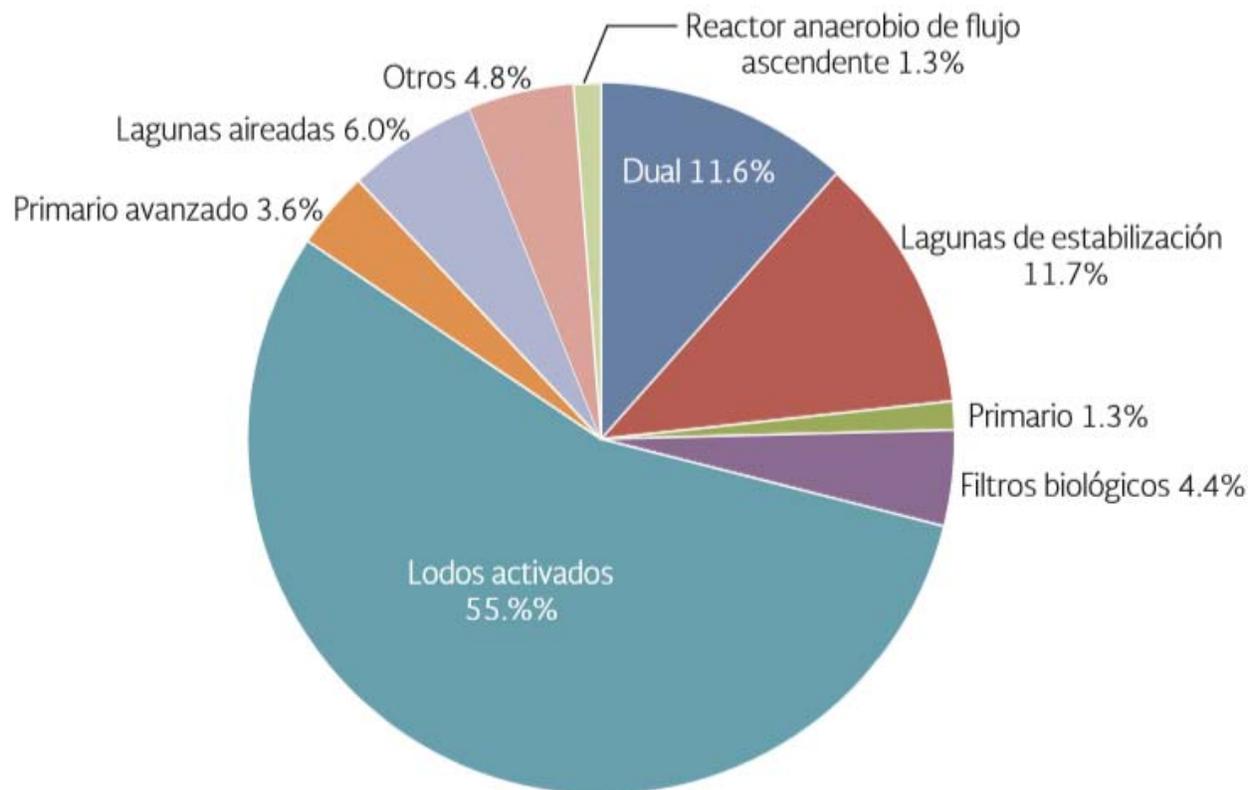


Figura 3.4. Principales procesos de tratamiento de aguas residuales municipales, por caudal tratado, 2015 (CONAGUA 2016).

### 3.3 El Nitrógeno y su ciclo.

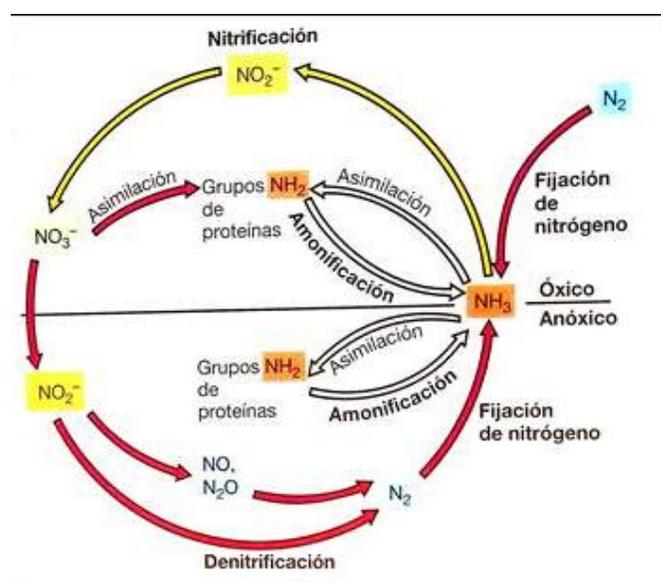
El nitrógeno, N es un elemento importante para todos los organismos y representa el 6.25% de su masa seca promedio. Es un elemento muy versátil que existe en formas orgánica e inorgánica y experimenta una variedad de estados de oxidación que oscilan desde 5+ (como en nitrato) hasta 3- (como en amoníaco), los diferentes estados de oxidación se muestran en la tabla 3.3.

En el ciclo del nitrógeno se realizan diferentes reacciones redox por diferentes organismos sean bacterias, arqueas y algunos hongos especializados, refiriéndonos a formas de vida superior, las plantas que son capaces de asimilar  $\text{NO}_3$ , como se muestra en la figura 3.5.

Tabla 3.3. Estados de oxidación de compuestos nitrogenados clave (Madigan *et al.*, 2004).

Compuesto	Estado de oxidación
N orgánico (R – NH <sub>2</sub> )	3-
Amoniaco (NH <sub>3</sub> )	3-
Gas nitrógeno (N <sub>2</sub> )	0
Óxido nitroso (N <sub>2</sub> O)	1+ (promedio por N)
Óxido de nitrógeno (NO)	2+
Nitrito (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> )	3+
Dióxido de nitrógeno (NO <sub>2</sub> )	4+
Nitrato (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	5+

Procesos clave y procariotas del ciclo del nitrógeno	
Procesos	Organismos
<b>Nitrificación</b> (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> → NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> → NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> NH <sub>2</sub> <sup>-</sup> → NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	<i>Nitrosomonas</i>
<b>Desnitrificación</b> (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> → N <sub>2</sub> )	<i>Bacillus, Paracoccus, Pseudomonas</i>
<b>Fijación del N<sub>2</sub></b> (N <sub>2</sub> + 8H → NH <sub>3</sub> + H <sub>2</sub> )	
Vida libre Aerobia Anaerobia	<i>Azotobacter, Cianobacterias</i>
Simbiótica	<i>Clostridium, bacterias fototróficas rojas y verdes</i>
	<i>Rhizobium, Brodyrhizobium, Frankia</i>
<b>Amonificación</b> (N orgánico → NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	Organismos que viven en el suelo (hongos y bacterias)

Figura 3.5. Ciclo de óxido-reducción del nitrógeno. Las reacciones de oxidación están representadas por flechas amarillas y las de reducción por rojas (Madigan *et al.*, 2004).

La asimilación del  $\text{NO}_3$  se da mediante la reducción de  $\text{NO}_3^-$  a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ). Además el  $\text{NO}_3$  actúa como fuente de átomos de N incorporado en las células a través de la asimilación del mismo. En la desasimilación se utiliza  $\text{NO}_3^-$  en lugar de oxígeno ( $\text{O}_2$ ) como aceptor de electrones bajo condiciones anaeróbicas. En el primer paso de la desasimilación el  $\text{NO}_3^-$  se reduce a  $\text{NO}_2^-$ , con la siguiente reducción de éste a óxido nítrico (NO), óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) y finalmente a dinitrógeno ( $\text{N}_2$ ) implica la acción de una secuencia de enzimas específicas. Estrictamente la desasimilación se refiere a las reacciones no asimilatorias que no están acoplados directamente a la generación de la fuerza protón-motriz. Un destino alternativo para el nitrito, que se produce típicamente en el *Enterococcus bacteriaceae*, es la reducción de  $\text{NH}_4$ , que se excreta, así este proceso se llama **amonificación**. Todas las reacciones mencionadas anteriormente implican reducción. Sin embargo, los organismos especializados pueden oxidar, ya sea  $\text{NH}_4^+$  o  $\text{NO}_2^-$  para satisfacer sus demandas de energía y reducción de los equivalentes mediante el uso de una vía llamada **nitrificación**. Por otra parte, se ha encontrado recientemente que los miembros del género *Planctomycetes* oxidan  $\text{NH}_4^+$  y utilizan  $\text{NO}_2^-$  como aceptor de electrones en un proceso llamado **anammox**. Debido a que el producto final de anammox es  $\text{N}_2$ , estos organismos ofrecen perspectivas interesantes en el tratamiento de aguas residuales. La conexión final en el ciclo de N es la fijación de nitrógeno, que permite a ciertas bacterias reducir  $\text{N}_2$  a  $\text{NH}_4^+$  para proporcionar sus requerimientos de N. Esta reacción de reducción es catalizada por la enzima llamada nitrogenasa. La fijación de  $\text{N}_2$  se lleva a cabo no sólo en procariontes de vida libre, sino también en las bacterias en simbiosis con las plantas y es, por tanto, de especial interés en la biología vegetal (Bothe *et al.*, 2007).

### 3.3.1 Desnitrificación.

La desnitrificación es la parte del ciclo del nitrógeno en la que se transforma el nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) en  $\text{N}_2$  gas. Este es un proceso reductivo y es una forma de respiración; los microorganismos desnitrificantes realizan el proceso en cuatro etapas 1) la reacción bioquímica de  $\text{NO}_3^-$  a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) generalmente catalizada por la enzima *nitrato reductasa* (*Nar*) localizada en la membrana celular; 2) la reducción de  $\text{NO}_2^-$  a óxido nítrico (NO) se encuentra catalizada por dos enzimas *nitrito reductasas* denominadas *NirS* y *NirK*, presentes en organismos desnitrificantes: 3) por otro lado, la reacción de reducción de NO a óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) se

encuentra catalizada por la enzima *óxido nítrico reductasa (Nor)*, localizada en la membrana celular, ésta juega un papel muy importante en la prevención de acumulación de NO debido a que éste es tóxico para las bacterias y; 4) finalmente la reacción de reducción de N<sub>2</sub>O a nitrógeno diatómico (N<sub>2</sub>) es catalizada por la enzima periplasmática *óxido nítrico reductasa (Nos)*, este paso constituye un proceso respiratorio independiente que puede darse en algunas bacterias que no son desnitrificantes (Claros, 2012). Todos los procesos dentro de esta ruta metabólica son catalizados por complejas metaloenzimas con sitios espectroscópicos característicos. Debe tenerse en cuenta que puede haber más de un tipo de reductasa en cada paso (Fig. 3.6). En general todas las proteínas requeridas para la desnitrificación sólo se producen bajo condiciones anaerobias, y si las células cultivadas anaerobicamente son expuestas a O<sub>2</sub> entonces su actividad enzimática es inhibida. Por lo tanto, para los organismos desnitrificantes, la respiración de O<sub>2</sub> se produce con la utilización de óxidos u oxianiones de nitrógeno, ver figura 3.7. La desnitrificación se ha estudiado principalmente en *Paracoccus denitrificans* y *Pseudomonas stutzeri* (Bothe *et al.*, 2007).

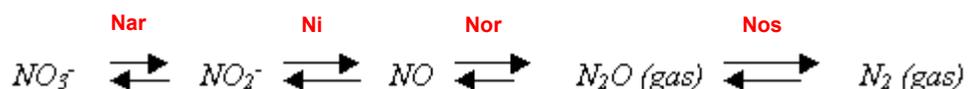


Figura 3.6. Secuencia de reducción desde nitrato hasta nitrógeno gaseoso.

Los factores más importantes que controlan la desnitrificación son: i) la presencia de un donador de electrones o fuente de energía para las bacterias desnitrificantes (carbono orgánico mayormente disponible); ii) condiciones anóxicas y iii) contenido de nitrato en el medio. Si alguna de estas condiciones no se cumple es poco probable que ocurra la desnitrificación. Los factores que afectan este proceso biológico son temperatura, pH, o la presencia de sustancias tóxicas como metales pesados o compuestos orgánicos (Bothe *et al.*, 2007).

La desnitrificación es perjudicial para la agricultura, sin embargo, para el tratamiento de aguas residuales es beneficiosa porque convierte NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en N<sub>2</sub>, disminuyendo significativamente la cantidad de nitrógeno que puede estimular el crecimiento de algas (Miyahara, 2010).

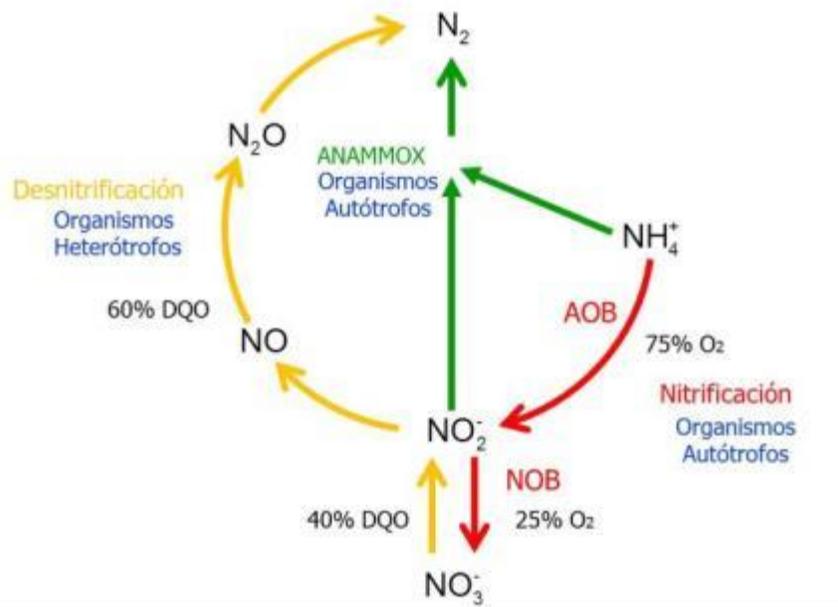


Figura 3.7. Transformación de  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{N}_2$  en agua residual (Claros, 2012).

La mayoría de los procariontes desnitrificantes pertenecen filogenéticamente a las proteobacterias y son aerobios facultativos. Muchas bacterias desnitrificantes reducen otros aceptores de electrones de forma anaeróbica, como el hierro férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) y algunos aceptores de electrones orgánicos. Las bacterias desnitrificantes son metabólicamente diversas desde el punto de vista de los mecanismos alternativos generadores de energía (Madigan *et al.*, 2004). Variedades de bacterias heterotróficas son utilizadas para la desnitrificación de aguas residuales en condiciones anóxicas (*Pseudomonas* sp., *Paracoccus* sp., *Alcaligenes* sp., *Thiobacillus*, *Bacillus*). Para que la desnitrificación sea eficaz se debe estar seguro de que hay suficiente disponibilidad de materia orgánica. Los microorganismos desnitrificantes pueden adaptarse a bajo o alto valor de pH, mantener su actividad por debajo de  $0^\circ\text{C}$  y tomar ventaja de las condiciones ambientales en ambientes hipersalinos.

Existe también una gran variedad de vías de desnitrificación incompleta, algunas bacterias desnitrificantes reducen nitrato y nitrito; otros sólo reducen nitrito. Algunas producen sólo dinitrógeno; algunos producen una mezcla de dinitrógeno y óxido nítrico; otras producen sólo el óxido nítrico (Carlson *et al.*, 1982).

### 3.3.1.1 Bajas temperaturas.

Casi un tercio de la superficie de la tierra está expuesta a temperaturas por debajo de los 0°C, una condición que prevalece durante 3-9 meses al año. Para sobrevivir a bajas temperaturas los microorganismos pueden reducir el tamaño de sus células y el espesor de la capa de polisacárido corpuscular, también pueden cambiar su composición de ácidos grasos y fosfolípidos. Su actividad metabólica es influenciada por la disponibilidad de agua líquida. El mayor nivel de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> reductasa aumenta respecto a la relación N<sub>2</sub>O/N<sub>2</sub> por la afinidad de los electrones en la cadena respiratoria. El rango óptimo de temperatura va de 0 a 50°C con un máximo de desnitrificación a 40°C (Bothe *et al.*, 2007).

### 3.3.1.2 Ambientes halofílicos.

Los hábitats salinos se pueden agrupar en dos categorías: talasohalinos y atalashalinos. El hábitat talasohalino es creado por la evaporación del agua de mar, tiene Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> y valores de pH cercanos a la neutralidad. La composición iónica de entornos atalashalinos difieren del agua de mar por las elevadas concentraciones de CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> y HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> y su pH puede exceder un valor de 10. La vegetación alrededor de este tipo de hábitats comprende a las “halófitas”. El término halófitas incluye organismos que requieren NaCl u otra sal para el crecimiento y los que crecen en ambientes salinos y no salinos, a éstos se les denomina “organismos tolerantes”. Un ejemplo de bacteria desnitrificante tolerante es *Azospirillum halopraeferens* que crece mejor en un medio con 0.25% de NaCl. Una de las estrategias de los microorganismos consiste en la acumulación de K<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> para mantener el equilibrio osmótico. Los procariontes desnitrificadores más representativos descritos en ambientes halofílicos se enuncian en la tabla 3.4. Se ha demostrado que la salinidad no regula el proceso de desnitrificación, por el contrario se ha observado disminución en el proceso cuando hay aumento de la salinidad, lo que sugiere que los microorganismos halotolerantes dominan el proceso de desnitrificación (Bothe *et al.*, 2007).

Tabla 3.4. Ejemplo de bacterias desnitrificadoras que viven en hábitats salinos (Bothe *et al.*, 2007).

Taxón	Género y especie	Hábitat
<b>Dominio Archea</b>		
	<i>Haloarcula hispánica</i>	Mar
	<i>Haloarcula vallismostis</i>	Piscinas saladas
	<i>Haloarcula marismotui</i>	Mar Muerto
	<i>Haloferax mediterranei</i>	Agua salina concentrada
	<i>Haloferax denitrificans</i>	Agua salina concentrada
<b>Dominio Bacteria</b>		
	<i>Erythrobacter</i> sp.	Mar
Proteobacteria; subclase- $\alpha$	<i>Paracoccus halodenitrificans</i>	Salmueras
	<i>Azospirillum halopraeferens</i>	Pantanos con salinidad moderada
	<i>Spirillum</i> sp.	Mar
Proteobacteria; subclase- $\beta$	<i>Thiobacillus denitrificans</i>	Agua dulce y salada
	<i>Alteromonas denitrificans</i>	Mar
Proteobacteria; subclase- $\gamma$	<i>Halomonas subglaciescola</i>	Lagos hipersalinos
	<i>Pseudomonas náutica</i>	Mar
Gram negativas	<i>Pseudomonas putrefaciens</i>	Mar
	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Mar
	<i>Thiomicrospira denitrificans</i>	Marea baja
	<i>Bacillus halodenitrificans</i>	Agua salina concentrada
Gram positivas		

### 3.3.1.3 Efecto del pH.

La relación entre el pH y la desnitrificación es particularmente complicada para determinarla como factor de velocidad en el proceso de desnitrificación. Generalmente con valor bajo de pH la actividad general de desnitrificación es baja y la fracción de N<sub>2</sub>O producida es alta. Sin embargo, se afirma que la desnitrificación aumenta cuando hay un valor elevado de pH, disponibilidad de carbono y disminución de temperatura. El valor óptimo de pH varía con los tipos de microorganismos existentes, pero se sitúa aproximadamente entre 7.5 y 9.2. (Bothe *et al.*, 2007).

### 3.3.2 Nitratos y Nitritos. Contaminación y toxicidad.

Nitratos y nitritos son compuestos iónicos que se encuentran en la naturaleza, formando parte del ciclo del nitrógeno. El nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) es la forma estable de las estructuras oxidadas del nitrógeno, y a pesar de su baja reactividad química puede ser reducido por acción microbiológica. El nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) es oxidado con facilidad por procesos químicos o biológicos a nitrato, o bien reducido originando diversos compuestos.

El nitrato es una de las formas de nitrógeno de mayor interés en las aguas naturales, residuales y residuales tratadas, se presenta generalmente a nivel de trazas en el agua de superficie, pero puede alcanzar niveles elevados en las aguas subterráneas. Los nitratos constituyen la especie nitrogenada más abundante y de mayor interés en todos los cuerpos de agua naturales. Son típicos de las aguas residuales domésticas frescas y es muy móvil y estable en condiciones aeróbicas. La máxima preocupación en torno a la contaminación del agua por nitratos radica en el efecto que puede tener sobre la salud humana la ingesta de los mismos disueltos en agua o en los alimentos. El nitrato puede encontrarse en concentraciones de hasta 30 mg de nitrato como N/L. Es un nutriente esencial para muchos microorganismos autótrofos fotosintéticos, y en algunos casos ha sido identificado como el determinante del crecimiento de éstos. Una concentración alta de nitratos es indicio de una etapa mayor de mineralización de los compuestos nitrogenados (Secretaría de Economía, 2001).

El nitrito se encuentra en la etapa intermedia en el ciclo del nitrógeno, éste puede estar presente en el agua como resultado de la descomposición biológica de materiales con alto nivel proteínico. En aguas superficiales crudas, las huellas de nitritos indican contaminación. También se puede producir el nitrito en las plantas de tratamiento o en los sistemas de distribución de agua, como resultado de la acción de bacterias sobre el nitrógeno amoniacal. El nitrógeno de nitritos rara vez aparece en concentraciones mayores a 1 mg/L aún en efluentes de plantas de tratamiento municipales. Su concentración en aguas superficiales y subterráneas es normalmente más baja de 0,1 mg/L. Debido a que el nitrógeno es un nutriente esencial para organismos fotosintéticos, el monitoreo y control es muy importante en las descargas del mismo al ambiente (Secretaría de Economía, 2011).

Una concentración de nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) y/o nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) mayor de 10 mg/L de nitrato medido como nitrógeno, en bebés de menos de 6 meses de edad, pueden enfermarse del llamado síndrome del bebé cianótico (SSA, 1994).

Los riesgos más importantes derivados de nitratos y nitritos en la población infantil se deben a 4 razones:

- Acidez gástrica disminuida, lo que favorece la proliferación de microorganismos reductores de nitratos a nitritos antes de su total absorción.
- La ingesta de agua en niños, según su peso, es 10 veces superior a la de los adultos- por unidad de peso corporal.
- Hemoglobina fetal (60 – 80% en recién nacidos), que se oxida más fácilmente a metahemoglobina.
- Desarrollo incompleto del sistema MADH-metahemoglobina reductasa en recién nacidos y pequeños, que salvo casos raros de deficiencia enzimática hereditaria, parece desaparecer al cabo de los 3 – 4 meses de vida.
- Existen otros grupos de población de riesgo como embarazadas, ya que el nitrito atraviesa la placenta, causando metahemoglobinemia fetal, o personas con acidez gástrica disminuida o con déficit de glucosa-6P-deshidrogenasa.

Debido a las normas fijadas por la USEPA, la concentración de nitratos para consumo no debe rebasar el valor límite de 45 mg/L en forma de  $\text{NO}_3^-$ , ya que al ser mayor, promueve la enfermedad llamada metahemoglobinemia donde la reducción de nitrato hasta nitrito por microorganismos, con la subsecuente entrada de nitrito a la sangre, causan la formación de metahemoglobina, en la cual el nitrito está irreversiblemente unido a la hemoglobina, como resultado, los eritrocitos pierden parcialmente la capacidad de transportar oxígeno lo que ocasiona cianosis. Los nitratos también pueden formar nitrosaminas y nitrosamidas que son potencialmente cancerígenos (Holt, 1999). En el ambiente, cuando se encuentra presente en concentraciones superiores a 0.3 mg/L y relacionados con los ortofosfatos con concentraciones superiores a 0.01 mg/L, propicia el fenómeno de eutrofización, el cual consiste en el enriquecimiento de nutrientes (principalmente fósforo y nitrógeno) que desencadena el desarrollo de biomasa algal en un principio limitando con ello, las condiciones para el desempeño del ecosistema y provocando un decremento en la diversidad biótica del

ecosistema y en general de la calidad del cuerpo de agua e implicando un consumo excesivo del oxígeno disuelto (Arheimer y Wittgren, 2002). La concentración de nitratos en aguas residuales tratadas puede variar desde 2 – 30 mg/L, dependiendo del grado de nitrificación y desnitrificación del tratamiento. Datos recientes sugieren que absorber demasiado nitrógeno a través del agua potable podría aumentar el riesgo de padecer Alzheimer y diabetes (Townsend & Howarth, 2010).

### **3.4 Normatividad.**

Los beneficios de contar con agua de calidad son innumerables, por esta razón, en México se ha creado un marco normativo que se encarga de regular las descargas de aguas residuales a los cuerpos receptores.

El cumplimiento de una Norma Oficial Mexicana es fundamental para establecer las especificaciones que deben cumplir los productos y procesos que puedan constituir un riesgo para la integridad y la salud humana, así como un riesgo para las diferentes especies animales, vegetales y para el medio ambiente, en general, para la preservación de los recursos naturales.

La Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales en la NOM-001-SEMARNAT-1996 define como aguas residuales a las aguas de composición variada provenientes de las descargas de usos municipales, industriales, comerciales, de servicios, agrícolas, pecuarios, domésticos, incluyendo fraccionamientos y en general de cualquier otro uso, así como la mezcla de ellas. En dicha NOM se establecen los límites máximos permisibles (nitrógeno total, pH) para las descargas de aguas residuales a aguas y bienes nacionales como se muestra en la tabla 3.5.

Tabla 3.5. Límites máximos permisibles de nitrógeno y pH en aguas residuales de México.

Parámetro	RÍOS			EMBALSES NATURALES Y ARTIFICIALES		AGUAS COSTERAS
	Uso en riego agrícola	Uso público urbano	Protección de vida acuática	Uso en riego agrícola	Uso público urbano	Estuarios
<b>Nitrógeno total</b>	50	50	20	50	20	20
<b>pH</b>	5 – 10 unid.	5 – 10 unid.	5 – 10 unid.	5 – 10 unid.	5 – 10 unid.	5 – 10 unid.

En lo referente a agua para consumo, la Secretaría de Salud en la NOM-127-SSA1-1994 establece como límite permisible a la concentración o contenido máximo o intervalo de valores de un componente, que no causará efectos nocivos a la salud del consumidor, así entonces establece en lo referente a nitratos y nitritos los límites permisibles mostrados en la tabla 3.6.

Tabla 3.6. Límites permisibles de nitratos y nitritos en agua para consumo.

Parámetro	Límite (mg/L)
<b>Nitratos (como N)</b>	10.00
<b>Nitritos (como N)</b>	0.05

A continuación se presenta la tabla 3.7 con el listado de algunas normas mexicanas relacionadas con el tema del agua residual.

Tabla 3.7. Normas mexicanas relacionadas con el sector agua (CONAGUA, 2010).

Identificador	Descripción
NOM-001-SEMARNAT-1996	Límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales.
NOM-002-SEMARNAT-1996	Límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a los sistemas de alcantarillado urbano o municipal.
NOM-003-SEMARNAT-1997	Límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reúsen en servicios al público.
NOM-004-SEMARNAT-2002	Especificaciones y límites máximos permisibles de contaminantes en lodos y biosólidos para su aprovechamiento y disposición final.
NOM-127-SSA1-1994	Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano, Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización.
NOM-011-CONAGUA-2000	Conservación del recurso agua. Establece las especificaciones y el método para determinar la disponibilidad media anual de las aguas nacionales.
NMX-AA-012-SCFI-2001	Análisis de agua – Determinación de Oxígeno Disuelto en aguas naturales, residuales y residuales tratadas – Método de prueba.
NMX-AA-026-SCFI-2010	Análisis de agua – Medición de nitrógeno total Kjeldahl en aguas naturales, residuales y residuales tratadas – Método de prueba.
NMX-AA-028-SCFI-2001	Análisis de agua – Determinación de la Demanda Bioquímica de Oxígeno en aguas naturales, residuales (DBO <sub>5</sub> ) y residuales tratadas – Método de prueba.
NMX-AA-030-SCFI-2001	Análisis de agua – Determinación de la Demanda Química de Oxígeno en aguas naturales, residuales y residuales tratadas – Método de prueba.
NMX-AA-079-SCFI-2001	Análisis de aguas – Determinación de nitratos en aguas naturales, potables, residuales y residuales tratadas – Método de prueba.
NMX-AA-154-SCFI-2011	Análisis de agua – Determinación de nitrógeno de nitritos en aguas naturales, residuales, residuales tratadas y marinas – Método de prueba.

La preocupación por las descargas de las aguas residuales y sus efectos al medio ambiente ha dado lugar a la promulgación de leyes como la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente publicada el 28 de enero de 1988 y la Ley de Aguas Nacionales

publicada el 01 de diciembre de 1992, que establecen la necesidad de prevenir y controlar la contaminación del agua y proteger los recursos hídricos (BID, 2013).

Estas medidas legislativas incentivan y justifican el estudio de los procesos implicados en la eliminación de nitrógeno de las aguas residuales, no sólo en términos del cumplimiento de estándares de calidad para la prevención de la contaminación y el aprovechamiento del agua, sino en su cada vez más importante contribución al balance global del nitrógeno.

### **3.5 El género *Pseudomonas*.**

*Pseudomonas* es un género comúnmente encontrado en suelo y agua, muchas especies que lo conforman pueden degradar compuestos orgánicos complejos y tóxicos, compuestos orgánicos naturales y sintéticos. Los miembros de este género son bacilos rectos o curvados; tamaño de 0.5 – 1.0  $\mu\text{m}$  por 1.5 – 4.0  $\mu\text{m}$ ; no esporulados; Gram negativos; con flagelos polares normalmente aislados; metabolismo respiratorio no fermentativo, aunque pueden producir ligeras cantidades de ácido a partir de la glucosa en aerobiosis; utilizan compuestos de bajo peso molecular pero no polímeros; algunos son quimiolitótrofos, utilizando  $\text{H}_2$  o  $\text{CO}$  como único donador de electrones; algunos pueden utilizar nitrato como aceptor de electrones en anaerobiosis (Madigan *et al.*, 2004).

Las pseudomonas tienen requerimientos nutritivos muy simples y crecen quimioorganotróficamente a pH neutro en un rango mesofílico de temperatura. Una de las características que más llaman la atención de las pseudomonas, es el amplio abanico de compuestos que pueden utilizar como fuentes de carbono y energía. Algunas de la especies utilizan más de 100 compuestos y solamente unas pocas especies utilizan menos de 20. Debido a que el catabolismo de los sustratos orgánicos a menudo precisan la actividad de varias enzimas diferentes, las pseudomonas son ecológicamente muy significativas en suelo y agua y probablemente los responsables de la degradación de muchos compuestos en distintos ambientes (Madigan *et al.*, 2004).

El género *Pseudomonas* es uno de los mayores grupos taxonómicos de bacterias desnitrificantes conocidos. Este hecho ha favorecido en gran medida el uso de especies de

dicho género como organismos modelo para estudiar el proceso de desnitrificación. Dentro del género *Pseudomonas*, y probablemente también en los procariotas, gran parte de los trabajos pertinentes, los avances en la caracterización bioquímica, desnitrificación, y la genética esenciales utilizando enfoques interdisciplinarios altamente se han logrado con *Pseudomonas stutzeri*, ya que es un rasgo estable en esta bacteria y se ha considerado como un sistema modelo (Lalucat *et al.*, 2006).

Se necesitan estudios más extensos para evaluar la estructura de la población de poblaciones ecológicas de *P. stutzeri*, sin embargo, los resultados notificados en el presente trabajo y en la literatura son consistentes con la conclusión de que esta especie bacteriana representa un buen ejemplo de una especie ecológica fenotípicamente cosmopolita, es la especie con la diversidad genética más alta descrita hasta la fecha. (Lalucat 2006).

### **3.5.1 *Pseudomonas stutzeri*.**

*Pseudomonas stutzeri* es una bacteria Gram negativa, saprófito del suelo, fuerte desnitrificador y no fluorescente, posee un flagelo polar, es oxidasa y catalasa positivas. Aislado en algunas ocasiones de humanos y muestras ambientales pudiendo vivir saprofiticamente en el suelo. Recientemente ha sido objeto de estudio debido a dos propiedades metabólicas particulares: 1) es capaz de metabolizar compuestos aromáticos como el naftaleno y metilnaftaleno que son comúnmente encontrados en el aceite crudo y son potencialmente tóxicos; 2) ha sido propuesto como un modelo de desnitrificación por su habilidad de reducir nitrato a nitrógeno gas (Bennasar, 1998).

En condiciones de anaerobiosis, pH 4.5 e incubación a 37°C es muy buen desnitrificante. Se ha estudiado ampliamente por su capacidad de transformación. Se distribuye ampliamente en el medio ambiente ocupando diversos nichos ecológicos, uno muy importante es el fondo marino y también ha sido aislado como un patógeno oportunista de los seres humanos. En medio marino, este microorganismo se encuentra aproximadamente a 28°C y pH 7.6 (Lalucat *et al.*, 2006).

La bioquímica de la reacción desasimilatoria de nitratos se ha estudiado en diferentes microorganismos entre ellos *Escherichia coli*, donde el  $\text{NO}_3^-$  sólo es reducido a  $\text{NO}_2^-$  y en *Paracoccus denitrificans* y *Pseudomonas stutzeri*, donde se produce una verdadera desnitrificación asociado con la conservación de energía. En *P. stutzeri* se forman óxidos de nitrógeno a partir del nitrito por una serie de enzimas como la nitrito reductasa, óxido nítrico reductasa y óxido nitroso reductasa tal como se observa en la figura 3.8. Durante el transporte de electrones se establece una fuerza protón - motriz, con producción de ATP por la acción de la ATPasa. Cuando el  $\text{NO}_3^-$  es reducido a  $\text{N}_2$  se produce ATP adicional, porque la NO reductasa está ligada a la extrusión de protones (Madigan *et al.*, 2004).

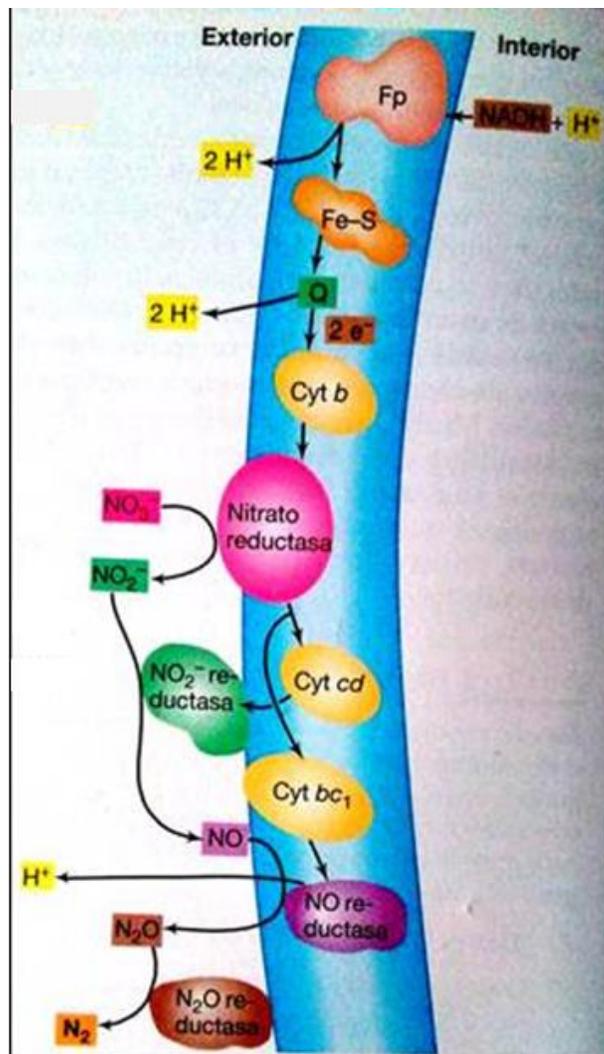


Figura 3.8. Esquema del transporte de electrones de *Pseudomonas stutzeri* durante la desnitrificación. Las nitrato y óxido reductasas se localizan en la membrana citoplasmática, en tanto que las nitrito y óxido nitroso reductasas son periplásmicas (Madigan *et al.*, 2004).

### 3.5.1.1 Hábitat y relevancia ecológica.

La notable fisiología, diversidad bioquímica y la flexibilidad de *P. stutzeri* se demuestra por su capacidad de crecer organotróficamente a través de mineralización o degradación una amplia gama de sustratos orgánicos; su capacidad de crecer anaerobicamente, utilizando diferentes aceptores terminales de electrones en un metabolismo oxidativo estrictamente; su oxidación de sustratos inorgánicos, como una forma quimiolitotrófica para obtener energía; su resistencia a metales pesados; y la variedad de fuentes de nitrógeno que puede utilizar y la amplia gama de temperaturas que permiten el crecimiento de *P. stutzeri*, esta última es una característica fisiológica importante cuando se consideran los hábitats que pueden ser colonizadas por esta especie. Su heterogeneidad fenotípica puede explicarse por gran variedad de hábitats y condiciones de crecimiento, incluyendo el cuerpo humano. La competencia natural demostrada por muchas cepas de *P. stutzeri* puede ayudar a aumentar la diversidad genética, proporciona nuevas combinaciones genéticas para colonizar nuevos hábitats o para ocupar nuevos nichos ecológicos, incluso cuando la población es esencialmente clonal. La presencia de *Pseudomonas stutzeri* es casi universal. Se ha detectado a través de secuencias de ADN específicos extraídos directamente de muestras ambientales (NIRS, nosZ, nifH, 16S rRNA). También se ha aislado intencionalmente o accidentalmente de muchos hábitats. Algunos de ellos, incluidos los hábitats extremos, se consideran a continuación (Lalucat *et al.*, 2006):

**Suelo, rizosfera y aguas subterráneas.** La composición de la población bacteriana de la rizosfera, y en particular la de las bacterias diazotróficas, es de gran interés. Los nuevos medios de aislamiento y las condiciones de enriquecimiento han sido desarrollados con bajas tensiones de oxígeno que simulan las condiciones de la rizosfera. Esto ha llevado a la conclusión de que el género *Pseudomonas* es dominante o predominante en asociación con trigo, cebada, arroz y humedales. Las cepas de *P. stutzeri* se han aislado de los sitios de suelos contaminados, donde las cepas degradadoras y contaminantes resistentes tienen que desarrollar actividades ecológicas pertinentes. Algunas cepas, como KC han demostrado su eficacia en aguas subterráneas contaminadas con combustible de aviación a través de desintoxicación por bioaugmentación.

**Agua marina, sedimentos y marismas.** La mayoría de las cepas aisladas de ambientes marinos inicialmente clasificadas en el género *Pseudomonas* se han transferido a otros géneros después de un análisis de sus filogenias. Estas transferencias incluyen *P. nautica*, *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, *Marinobacterium stanieri*, entre otras. No muchas especies dentro del género *Pseudomonas* se han detectado en las aguas marinas. Para que una cepa pueda ser considerada de origen marino tiene al menos que tolerar NaCl. *P. stutzeri*, *P. balearica*, y *P. xanthomarina* parecen ser verdaderas especies de *Pseudomonas* marinos.

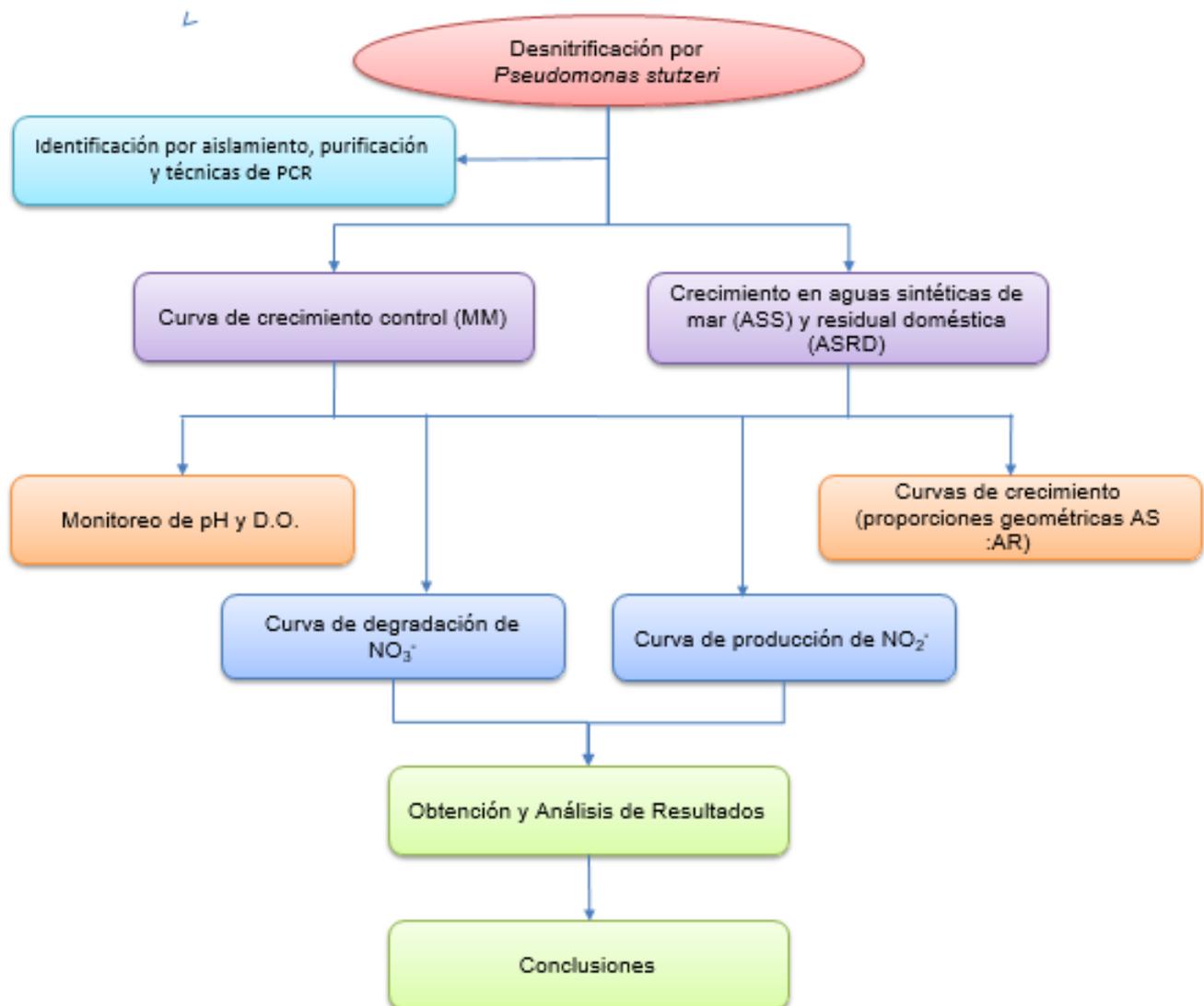
El papel ecológico de *P. stutzeri* en los pantanos *Spartina* es por su contribución a los presupuestos globales de carbono y nitrógeno. La producción primaria y la descomposición en estos pantanos se limitan al contenido de nitrógeno. En estos sistemas, la diazotrofia es una fuente clave para la desnitrificación y la fijación completa del nitrógeno en el ciclo del nitrógeno, *P. stutzeri* participa en ambos procesos.

**Plantas de tratamiento de aguas residuales.** Algunas bacterias con propiedades metabólicas inusuales, tales como la degradación de los compuestos antropogénicos con fines de biorremediación, es común para examinar las muestras tomadas de plantas de tratamiento de aguas residuales o el diseño de biorreactores que simulan las condiciones de una planta de tratamiento. Degradadores de naftaleno, oxidantes de tiosulfato, degradadores de clorobenzoato y oxidantes de cianuro se han aislado de esta manera. Se ha demostrado que *P. stutzeri* también se distribuye en las aguas residuales.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Estrategia de trabajo.

Las etapas de desarrollo del presente trabajo para la obtención de los resultados planteados se muestran en el siguiente diagrama.



## **4.2 Descripción bacteriana.**

### **4.2.1 Descripción de crecimiento, morfológica y bioquímica.**

La cepa manipulada de *Pseudomonas stutzeri* fue obtenida del acervo bacteriano del Laboratorio de Microbiología Experimental de la Facultad de Química, UNAM, la cual fue aislada de un derrame de aceite en un taller mecánico, tiene estudios que demuestran su capacidad de degradar aceite quemado de automóvil al 1 %, diésel y petróleo diáfano, efectividad en la degradación de fenol, además de su capacidad desnitrificadora (Rodríguez Ramos, 2001). En la presente investigación se realizó un análisis microscópico para la identificación de la morfología colonial; análisis microscópico que incluye tinción de Gram y morfología celular; finalmente análisis bioquímico para la determinación metabólica de la cepa en estudio, para este último se prepararon los medios necesarios para las pruebas de citrato, desnitrificación, glucosa, motilidad, producción de ácido, oxidasa.

### **4.2.2 Aislamiento, Extracción y Purificación de ADN de *Pseudomonas stutzeri*.**

El ADN de la cepa se aisló haciendo uso del kit DNAeasy *Blood and Tissue*, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El material obtenido fue sometido a un procedimiento de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).

## **4.3 Modificación de las proporciones de MM, ASS y ASRD.**

Se evaluó el efecto de los distintos medios así como su combinación por proporciones geométricas (MM + ASS; ASS + ASRD) mediante el monitoreo de nitratos y nitritos por métodos espectrofotométricos descritos en los anexos C y D respectivamente.

Las proporciones de agua empleadas se muestran en las tablas 4.1 y 4.2.

Tabla 4.1. Cantidades y proporciones de MM y ASS.

Concentración de MM (%)	Concentración de ASS (%)	Proporción
100	0	1:0
75	25	3:1
50	50	1:1
25	75	1:3
0	100	0:1

Tabla 4.2. Cantidades y proporciones ASS y ASRD.

Concentración de ASS (%)	Concentración de ASRD (%)	Proporción
100	0	1:0
75	25	3:1
50	50	1:1
25	75	1:3
0	100	0:1

#### 4.4 Crecimiento bacteriano.

##### 4.4.1 Curva de crecimiento en Medio Mineral y Agua Sintética Salina.

Para la determinación del crecimiento de *Pseudomonas stutzeri*, se inoculó la cepa por triplicado en medio mineral adicionado con glucosa (4% m/v). Los matraces en los que se llevó a cabo la experimentación se mantuvieron en agitación constante a 200 rpm y 27°C ± 1°C.

La relación entre el número aproximado de bacterias y la turbidez del medio se determinó empleando dos técnicas: 1) Mediciones de turbidez con ayuda del colorímetro fotoeléctrico Klett-Summerson modelo 2193437 (uso de matraces nefelométricos), dicha relación se determinó según la escala de McFarland (Anexo B); 2) Conteo en placa usando la técnica de cuenta por goteo. En esta última se tomó 1 mL de muestra y se agregaron a 9 mL de SSI, realizando diluciones sucesivas de 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup>. De cada tubo de dilución se tomó una alícuota de 10 µL y fue colocada en caja Petri con agar nutritivo, posterior al tiempo de

incubación se procede a realizar el conteo de colonias. La toma de muestra se realizó cada tercer día a lo largo de 17 días.

El agua sintética de mar (agua sintética salina - ASS) se preparó de acuerdo a las indicaciones de proveedor **Oceanic Sal Marina®**, las cuales se describen en el anexo A. La finalidad de la curva de crecimiento en agua salina fue asegurar el desarrollo del microorganismo al ser expuesto a ésta durante el desarrollo experimental. Los matraces en este caso, fueron mantenidos bajo las condiciones antes descritas, para la determinación de bacterias y UFC en el medio se emplearon las mismas técnicas.

#### 4.4.2 Crecimiento bacteriano en Agua Sintética Residual Doméstica.

La curva de crecimiento se realizó según lo descrito en el apartado 4.4.1, utilizando únicamente agua residual sintética, formulada según la tabla 4.3.

Tabla 4.3. Fórmula del agua sintética residual doméstica (Lolmede, *et.al.*, 2000).

COMPUESTO	CANTIDAD (g/L)
Glucosa	5.0000
NH <sub>4</sub> Cl	1.5750
NA <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3.4750
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.6750
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.0625
MnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.0625
CaCl <sub>2</sub>	0.0375
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.0375

#### 4.4.3 Curva de crecimiento en Agua Sintética Salina con Medio Mínimo (3:1) y Aguas Sintéticas Residual Doméstica con Salina (3:1).

La bacteria fue inoculada en dos medios diferentes de acuerdo a las siguientes proporciones: 1) ASS + MM (3:1); 2) ASRD + ASS (3:1); en ambos casos el inóculo agregado fue de 5 mL. Los matraces se mantuvieron bajo las mismas condiciones con un monitoreo de 17 días.

#### 4.5 Determinación de cinéticas de degradación de nitratos (NMX-AA-079-SCFI-2001).

El procedimiento realizado fue el mismo empleado en las curvas de crecimiento (pág. 22) en los medios y sus distintas combinaciones. El muestreo se realizó diario durante 13 y 17 días (proporciones ASS:MM y ASRD:ASS respectivamente) y la concentración de  $\text{NO}_3^-$  se determinó como se describe en el anexo C. Las cinéticas se determinaron con base al cambio de la concentración de nitratos a través del tiempo de acuerdo a la siguiente ecuación de primer orden.

Ecuación 4.1. Cinética de degradación de nitratos.

$$\text{Nitratos}_f = \text{Nitratos}_i e^{-kt}$$

##### 4.5.1 Curvas de producción de nitritos (NMX-AA-154-SCFI-2011).

La determinación de nitritos se realizó para los distintos medios tomando todos los días una muestra de 1 mL aforando a 10 mL en matraces volumétricos (10 mL), a éstos se les dio el tratamiento de acuerdo a la tabla D.1 del anexo D. El muestreo de se realizó durante 17 días. Las curvas obtenidas de producción de nitratos se establecieron con base en la concentración de nitritos generada a través del tiempo.

#### 4.6 Determinación del porcentaje de remoción de nitratos.

De cada uno de los matraces utilizados para las curvas de crecimiento en los distintos medios se tomó una alícuota de 1 mL del centro del matraz (para asegurar una toma homogénea) durante 13 días, considerando únicamente los días 0 y 12 para esta determinación. El porcentaje de remoción de  $\text{NO}_3^-$  con base en la concentración se calculó con la siguiente ecuación:

Ecuación 4.2. Porcentaje de remoción de nitratos (% desnitrado).

$$\% \text{Remoción} = (1 - (C_{\text{final}}/C_{\text{inicial}})) * 100$$

#### **4.7 Parámetros físico-químicos (temperatura, pH y O.D.).**

El monitoreo de temperatura, pH y O.D. de los distintos medios experimentales se realizó cada 2 días durante el proceso que duró la experimentación, obteniendo así 8 determinaciones para cada parámetro. Estas determinaciones se realizaron con ayuda del electrodo medidor de temperatura Orion 9107BNMD, electrodo medidor de pH Oakton pH 110 y electrodo medidor de oxígeno disuelto Orion 080510MD.

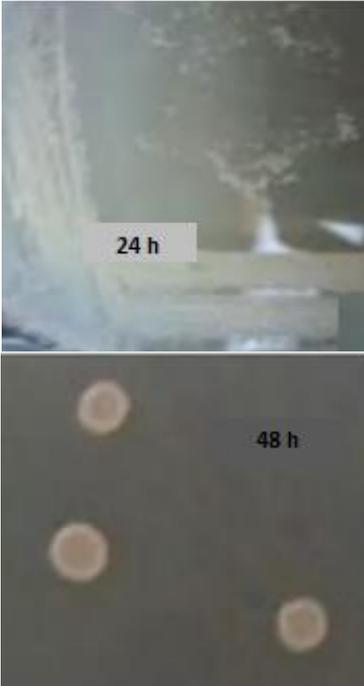
## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

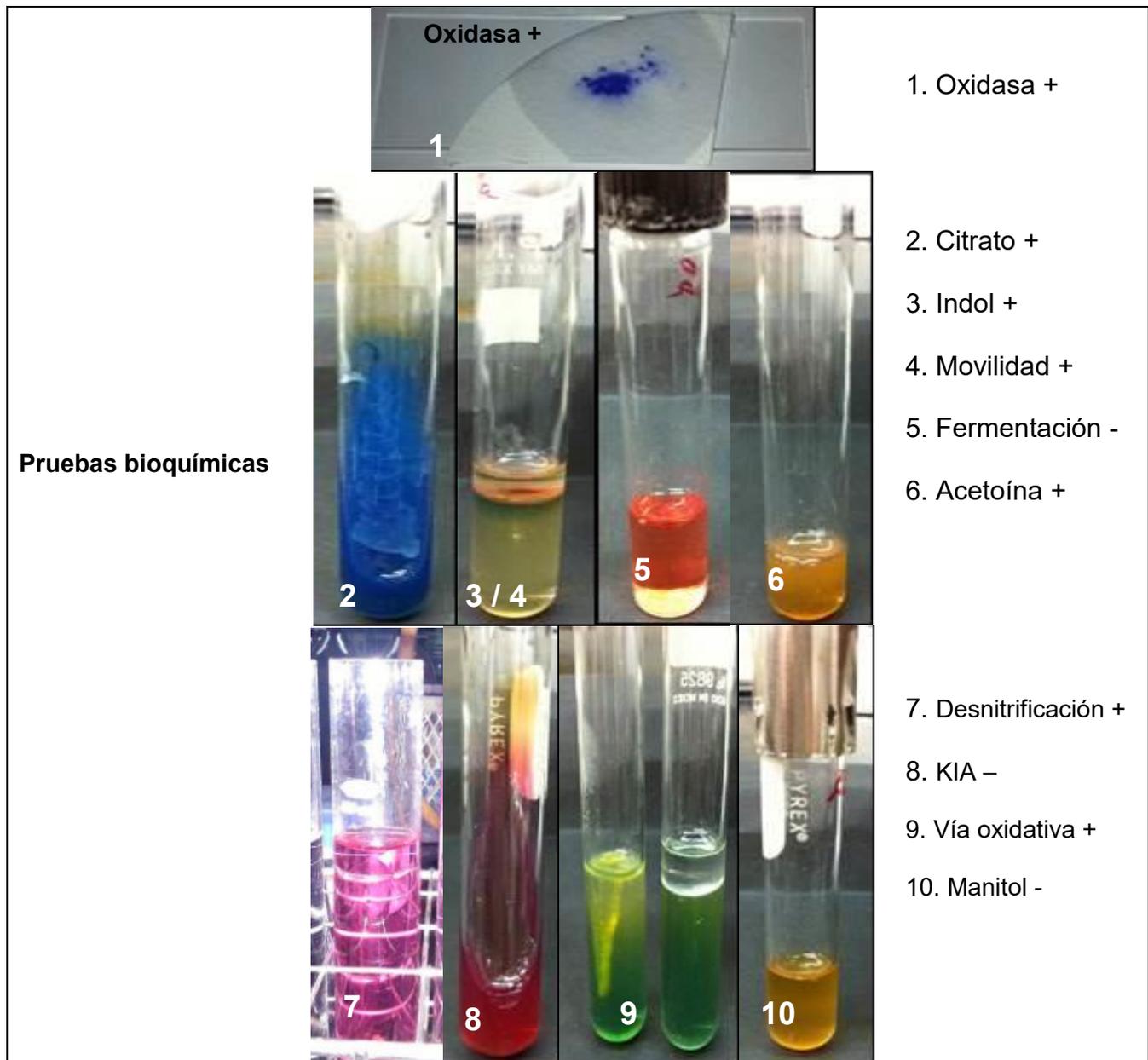
### 5.1 Descripción bacteriana.

#### 5.1.1 Descripción morfológica, bioquímica y de crecimiento.

Los resultados de las pruebas bioquímicas aplicadas a *Pseudomonas stutzeri* se describen en la tabla 5.1, los cuales se compararon con lo reportado en *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, encontrando que las pruebas son consistentes.

Tabla 5.1. Descripción macro y microscópica, bioquímica y de crecimiento de *Pseudomonas stutzeri*.

<p><b>Descripción macroscópica en agar nutritivo</b></p>		<p>24 h. Colonias pequeñas de forma circular, color beige, puntiformes, aspecto liso y húmedo.</p> <p>48 h. Colonias medianas de color beige - rosado, rugosas y secas con bordes irregulares.</p>
<p><b>Descripción microscópica</b></p>		<p>Gram negativo Bacilos cortos con puntas redondeadas. Gram negativos. Sin agrupación característica.</p>



### 5.1.2 Aislamiento, Extracción y Purificación de ADN de *Pseudomonas stutzeri*.

De manera complementaria al análisis bioquímico, se realizó la extracción, amplificación y purificación del material genético de acuerdo a lo descrito en la sección 4.2.2 y en el anexo E de la presente investigación.

Como resultado se obtuvo la banda específica de acuerdo a las 1025 pb (Coleman, 2006) establecido en la literatura, el peso experimental aproximado fue de 1000 pb, siendo éste muy

similar al antes mencionado, mostrando correspondencia entre sí y congruencia con las pb que pueden replicar los primers empleados (ver tabla E.1).

## 5.2 Crecimiento bacteriano.

### 5.2.1 Control positivo.

Se graficó la escala de McFarland de acuerdo a lo especificado en el anexo B, con un coeficiente de correlación ( $R^2$ ) de 0.996, como curva patrón que relaciona la turbidez del medio con el número aproximado de bacterias obteniendo la ecuación 5.1.

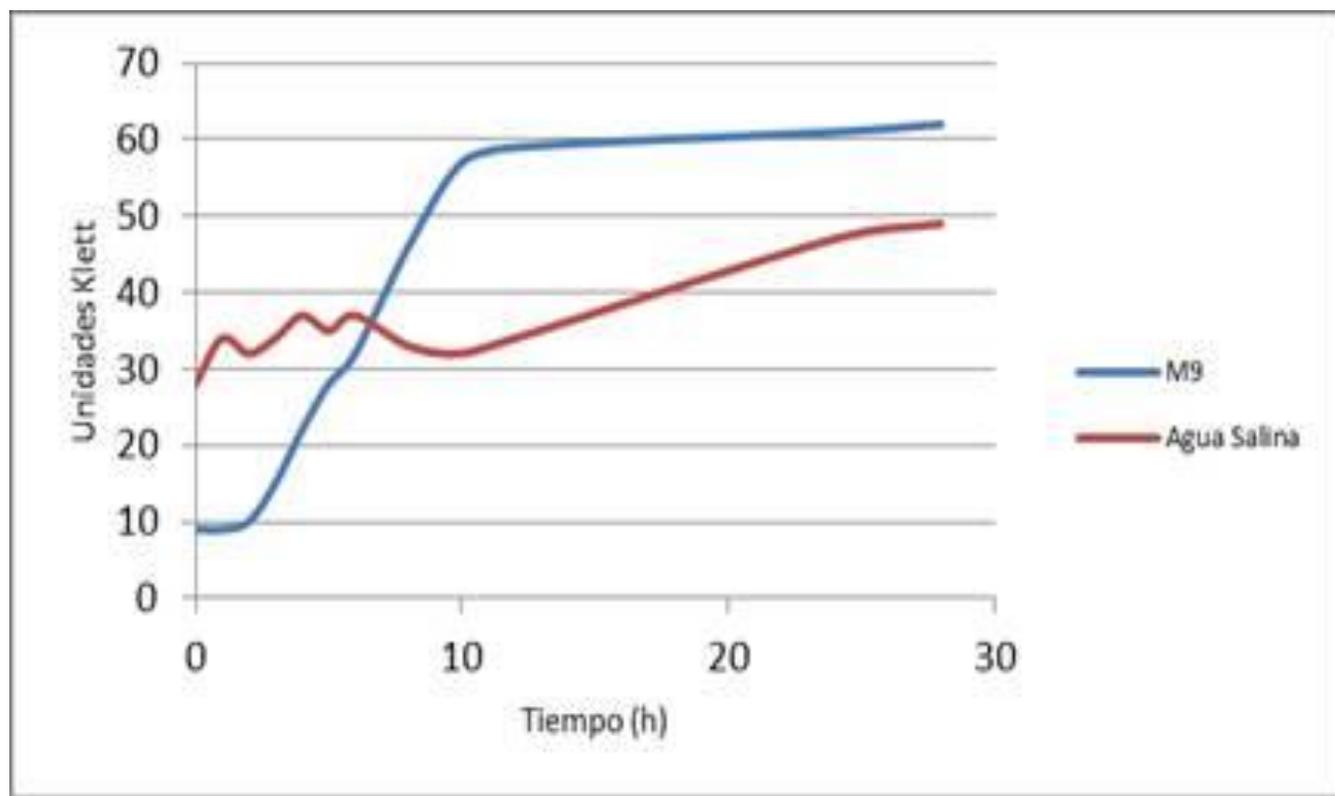
Ecuación 5.1. Número aproximado de bacterias en función de la turbidez del medio.

$$\frac{Bacterias}{mL} = \frac{Turbidez - 37.93}{1 \times 10^{-9}}$$

El control positivo inoculado en el medio mineral adicionado con glucosa al 4% se muestra en la gráfica 5.1, dicho monitoreo se realizó durante 24 h a  $30^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  y 200 rpm. Se observa que es posible obtener parámetros de crecimiento exponencial entre las 3 h y 10 h. El tiempo de duplicación del microorganismo obtenido por determinaciones de McFarland fue de 43.8 minutos. Es clave importante saber el tiempo de duplicación del microorganismo reportado en la literatura, el cual corresponde a un valor de 0.86 h (48 minutos), el valor experimental obtenido fue menor en un 8.75%, con lo que se considera un buen tratamiento del mismo.

En lo que respecta a las determinaciones en agua salina, es claro que el tiempo de duplicación se ve incrementado, éste fue de 47.3 minutos, la curva de crecimiento no es clara en un principio, al cabo de 10 h la tendencia se define. La razón por la que esto sucede es por un error en el blanco empleado el cual fue agua destilada en lugar del mismo medio y esto dio origen a los saltos marcados en las primeras horas de monitoreo, también es considerada la diferencia de nutrimentos requerida por el microorganismo y los presentes en el medio experimental, después de algunas horas transcurridas hace uso del nitrógeno presente y se adapta al mismo en condiciones de pH y salinidad y es entonces cuando se define la etapa de crecimiento. El efecto de la salinidad fue evaluado con el objeto de determinar la reducción en

la actividad del microorganismo como consecuencia de una concentración elevada de ésta, propia de sistemas biológicos de tratamiento de corrientes de agua residual.



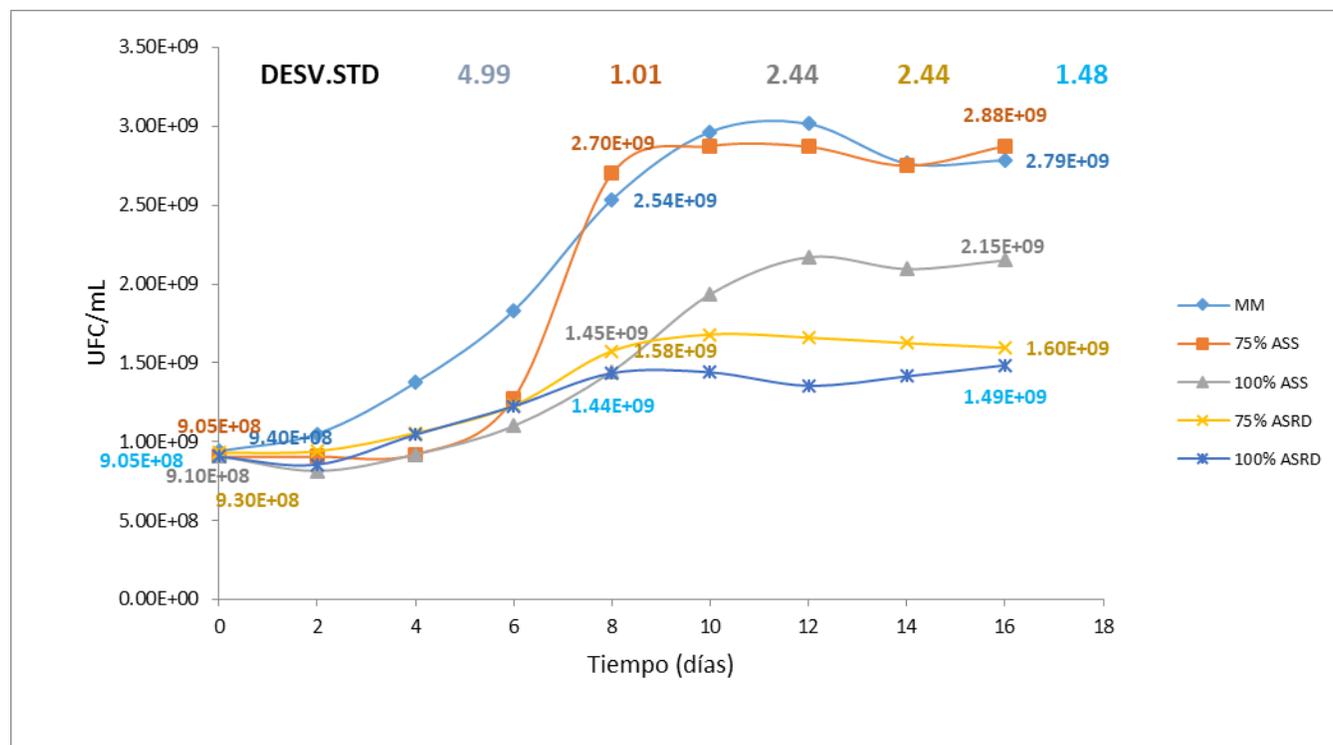
Gráfica 5.1. Crecimiento bacteriano en MM y ASS en función del tiempo. Determinación de McFarland.

En esta prueba preliminar, las determinaciones se realizaron haciendo uso de la técnica de McFarland (la lectura de la turbidez de cada muestra tomada incluye células vivas y muertas) ya que la única finalidad fue observar el comportamiento del microorganismo en los medios experimentales, sin embargo, las cinéticas de crecimiento del microorganismo establecidas en el apartado 5.2.2 se realizaron por conteo de UFC ya que con esta técnica es posible diferenciar células viables de las no viables.

### 5.2.2 Curvas de crecimiento en MM, ASS, ASRD y sus combinaciones.

La evaluación de la influencia de los distintos medios y sus combinaciones (MM + ASS; ASS + ASRD; tablas 4.1 y 4.2) en el desarrollo de *Pseudomonas stutzeri* fue monitoreada durante 17 días. Según se observa en la gráfica 5.2 el desarrollo es favorable en todos los casos, es

posible observar las fases de latencia, exponencial y estacionaria del crecimiento del microorganismo en estudio, aunque la fase exponencial no es muy notoria en 100% ASRD su proceso sigue la misma tendencia que el proceso ideal. En el caso de las curvas de MM y 75% ASS la fase exponencial es más acelerada, lo que puede deberse a la presencia de glucosa, la cual promueve un rápido crecimiento bacteriano.



Gráfica 5.2. Curvas de crecimiento de *P. stutzeri* expuesta a distintos medios experimentales (n=17).

Los tiempos de duplicación para todos los casos se muestran en la tabla 5.2.

Tabla 5.2. Tiempos de duplicación de *P. stutzeri* en distintos medios de exposición.

Medio experimental	Tiempo de generación (min.)	
	Cuenta en placa	Curva de McFarland
MM	44.1	43.8
75% ASS	44.9	ND*
100% ASS	48.1	47.3
75% ASRD	49.8	ND*
100% ASRD	50.7	ND*

\*ND = No determinado.

Considerando el tiempo de generación reportado en la literatura y haciendo una comparativa con la tabla 5.2 es notorio que el mejor resultado se obtiene con el medio que tiene todos los nutrientes necesarios para que el microorganismo crezca en condiciones óptimas, sin embargo, cabe destacar que en el resto de los medios experimentales el resultado no se aleja de la idealidad debido a que éste se adapta al medio, consiguiendo así todos sus requerimientos nutricionales para crecer. Es un microorganismo que se encuentra en diversos ambientes, y considerando el ambiente salino como uno de los principales, no le lleva mucho tiempo adaptarse a las condiciones expuestas. Refiriéndonos al medio con agua residual, hablamos de una situación más compleja por la diversidad de compuestos que la conforman, mismos a los que la cepa no había sido expuesta, *P. stutzeri* ha sido caracterizada por la diversidad de medios en los que se localiza y por su gran capacidad desnitrificante y justamente en este medio hace evidente esta capacidad al emplear el nitrógeno presente como parte de su proceso metabólico, donde se ve demostrado por el rendimiento celular limitado por el nitrato (ver apartado 5.3.1), con el paso del tiempo la biomasa se adaptó a las nuevas condiciones, incrementando su velocidad de crecimiento y mostrando su capacidad de autorregularse en el proceso.

La aclimatación bacteriana y los cambios en la estructura de la comunidad microbiana representan un papel importante en la adaptación de los organismos desnitrificantes a la alta salinidad y a las elevadas concentraciones de nitrógeno y demás componentes de las aguas residuales presentes en los diferentes medios de experimentación.

### **5.3 Remoción de Nitratos**

#### **5.3.1 Cinéticas de remoción de $\text{NO}_3^-$ en MM, ASS, ASRD y sus combinaciones.**

De acuerdo a lo descrito en el apartado 4.3, se evaluó el efecto sobre el microorganismo y su capacidad para remover nitratos en los distintos medios y sus combinaciones (MM + ASS; ASS + ASRD; ver Tablas 4.1 y 4.2) mediante el monitoreo de  $\text{NO}_3^-$ .

A la par de las mediciones de crecimiento del microorganismo, se realizaron las determinaciones espectrofotométricas para conocer la concentración de nitratos en los medios en función del tiempo. Los resultados se muestran en las tablas 5.3 y 5.4. Cabe mencionar, que para cada medio empleado se contó con el blanco correspondiente (medio sin inóculo) sin embargo, los datos no se reportaron en las tablas por fluidez de información, es decir, evitar que el comparativo entre los datos no fuera clara.

Tabla 5.3. Concentración de nitratos en los medios modificados con agua salina en función del tiempo.

<b>Concentración de nitratos (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>					
<b>DÍA</b>	<b>MM</b>	<b>25% ASS</b>	<b>50% ASS</b>	<b>75% ASS</b>	<b>100% ASS</b>
<b>0*</b>	6.464	6.581	6.482	6.181	6.425
<b>1</b>	5.880	6.073	6.280	6.143	6.419
<b>2</b>	5.685	4.950	4.984	5.824	6.012
<b>3</b>	5.432	4.125	2.973	3.781	5.466
<b>4</b>	5.140	3.461	2.430	2.896	4.428
<b>5</b>	4.034	2.120	1.545	2.889	3.846
<b>6</b>	3.140	1.229	1.378	2.509	3.898
<b>7</b>	1.966	0.835	1.296	1.909	3.591
<b>8</b>	1.208	0.534	1.147	0.918	3.185
<b>9</b>	0.679	0.360	0.864	0.864	2.308
<b>10</b>	0.342	0.140	0.685	0.530	1.930
<b>11</b>	0.280	0.159	0.645	0.557	1.590
<b>12*</b>	0.269	0.235	0.444	0.505	1.331
<b>DE</b>	2.473	1.972	2.150	2.166	1.799

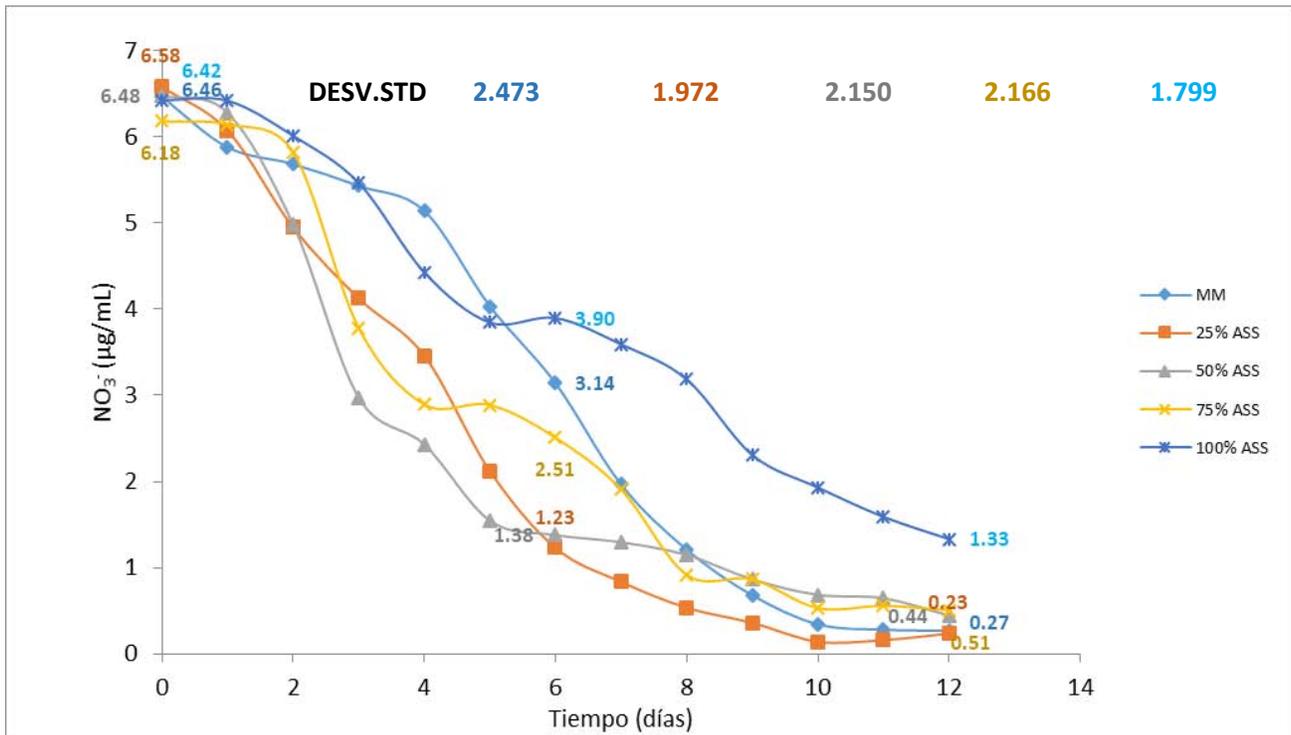
\*Concentraciones tomadas para la determinación de %Remoción de nitratos

Tabla 5.4. Concentración de nitratos en los medios modificados con agua residual en función del tiempo.

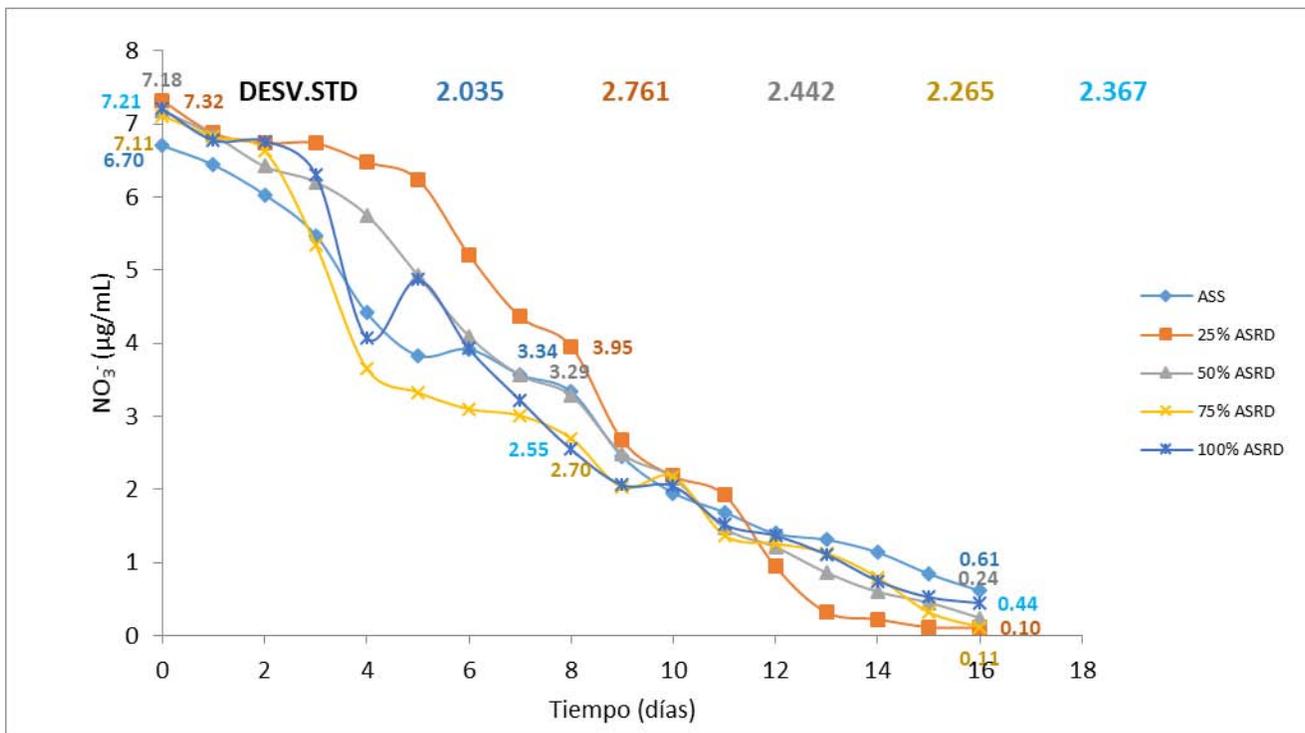
<b>Concentración de nitratos (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>					
<b>DÍA</b>	<b>ASS</b>	<b>25% ASRD</b>	<b>50% ASRD</b>	<b>75% ASRD</b>	<b>100% ASRD</b>
<b>0*</b>	6.703	7.317	7.180	7.113	7.208
<b>1</b>	6.439	6.874	6.847	6.829	6.776
<b>2</b>	6.031	6.738	6.419	6.632	6.767
<b>3</b>	5.475	6.738	6.208	5.342	6.308
<b>4</b>	4.415	6.477	5.752	3.652	4.071
<b>5</b>	3.831	6.242	4.927	3.326	4.869
<b>6</b>	3.916	5.208	4.095	3.098	3.923
<b>7</b>	3.566	4.362	3.563	3.009	3.219
<b>8</b>	3.335	3.954	3.286	2.696	2.546
<b>9</b>	2.448	2.670	2.486	2.029	2.060
<b>10</b>	1.951	2.180	2.158	2.175	2.0419
<b>11</b>	1.687	1.923	1.470	1.370	1.515
<b>12*</b>	1.393	0.940	1.209	1.257	1.364
<b>13</b>	1.310	0.317	0.858	1.129	1.107
<b>14</b>	1.137	0.220	0.597	0.794	0.747
<b>15</b>	0.843	0.113	0.450	0.317	0.523
<b>16</b>	0.610	0.104	0.240	0.115	0.443
<b>DE</b>	2.035	2.761	2.443	2.265	2.367

\*Concentraciones tomadas para la determinación de %Remoción de nitratos.

Los datos de las tablas 5.3 y 5.4 se representan en las gráficas 5.3 y 5.4 respectivamente.



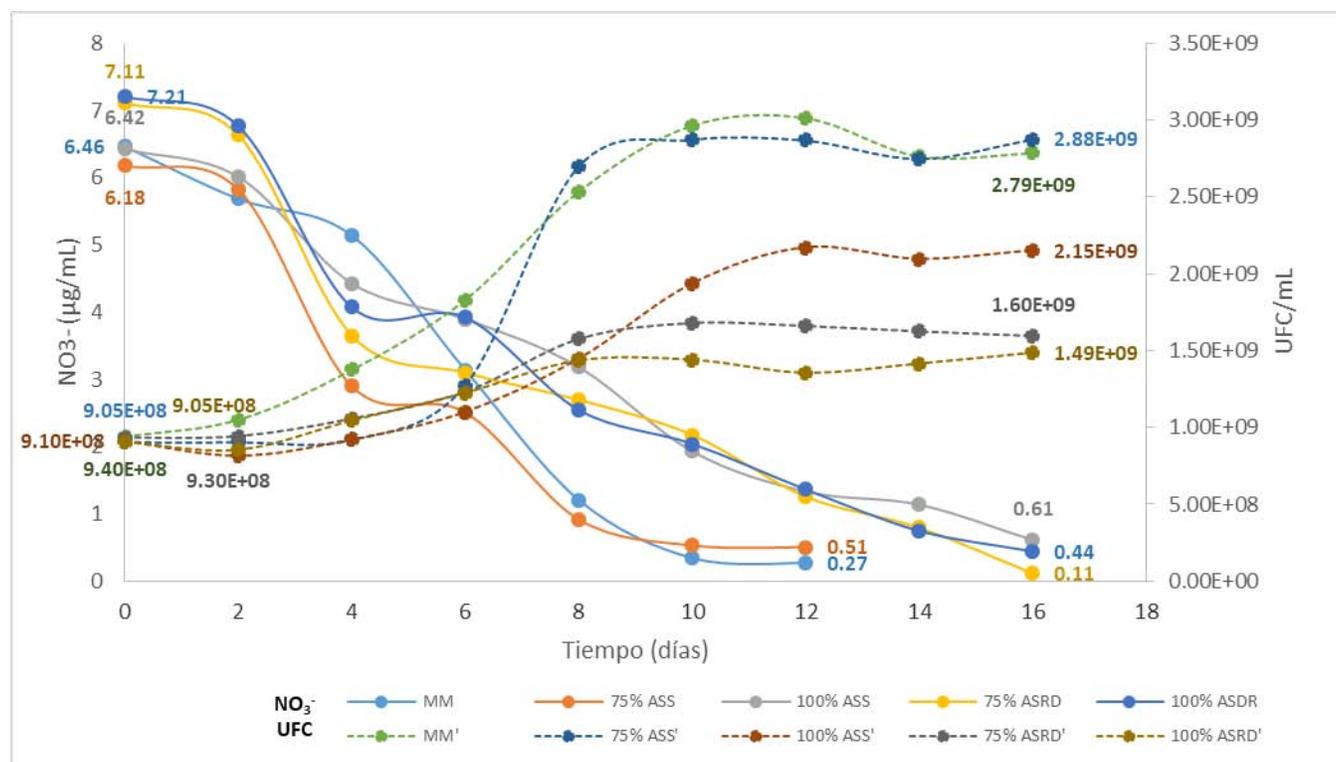
Gráfica 5.3 Curva de concentración de nitratos en función del tiempo (agua sintética salina).



Gráfica 5.4. Curva de concentración de nitratos en función del tiempo (agua sintética residual doméstica).

En la gráfica 5.3 se observa que a partir del día 4 el proceso de reducción de nitratos se da en mayor proporción en todos los casos y al cabo del día 12 ésta ha llegado casi a su final, excepto para el medio 100% salino. El efecto de la salinidad sobre el microorganismo desnitrificante ha mostrado que la alta presión osmótica puede llegar a inhibir la desnitrificación que puede ser parcialmente aliviada por la presencia de otros iones, como sucede en el medio ASRD (gráfica 5.4) donde la presencia de los iones potasio permiten regular la cantidad de agua en el citoplasma celular mediante su acumulación en el interior de la bacteria y así continuar con el proceso desnitrificante.

En la gráfica 5.5 se muestra que con la relación de construcción de curvas de concentración de nitrato vs tiempo es posible determinar la velocidad de crecimiento del microorganismo confirmando lo dicho por Monod, quien establece una relación inversamente proporcional entre el sustrato y el crecimiento de la biomasa definida como  $S_0/X_0$ , esta relación afecta la velocidad de desnitratación en cada ensayo realizado. Las líneas punteadas representan el crecimiento de la biomasa, mientras las líneas continuas el decrecimiento en la concentración de nitrato.



Gráfica 5.5. Concentración del nitrato inversamente proporcional al crecimiento del microorganismo.

El ascenso de la población bacteriana se registró asociado al agotamiento del sustrato por la reducción de la molécula de nitrato a nitrito. La finalización del proceso de desnitrificación puede ser identificada por la estabilización del pH (ver apartado 5.3.3), esta estabilidad puede ser debida a la reducción total del nitrito producido (ver apartado 5.3.1.1).

Los resultados representados en la gráfica 5.5 evidencian que las dinámicas de desnitrificación están en función de la comunidad microbiológica desarrollada en los medios evaluados, de manera que los microorganismos desnitrificantes permiten la transformación de  $\text{NO}_3^-$  a otros estados de oxidación evitando una acumulación nociva de otros productos dañinos. *Pseudomonas stutzeri* lleva a cabo una desnitrificación biológica completa porque es capaz de reducir el nitrato hasta nitrógeno molecular (no acumula gases intermedios dañinos como óxido nitroso producido en la desnitrificación de *P. aeruginosa* o *Paracoccus denitrificans*), este dinitrógeno en una corriente de agua tratada se puede eliminar con un simple proceso de aireación (Claros, 2012), en este caso, el gas producido fue expulsado de manera inmediata durante las diferentes tomas de muestra al haber agitación y retirando los tapones de los contenedores de los diversos medios.

Los resultados obtenidos permiten analizar el proceso de desnitrificación en los sistemas experimentales, el estudio de las comunidades bacterianas, conocer las dinámicas poblacionales y su influencia en las cinéticas de degradación y transformación de los compuestos nitrogenados que intervienen en la desnitrificación.

En términos generales, se cumple con las expectativas planteadas, reflejando en gran medida las dinámicas e interacciones de los parámetros evaluados dentro del proceso de desnitrificación, lo que permite estimar el crecimiento poblacional bacteriano con base en el número de organismos generados en función del sustrato empleado.

#### **5.3.1.1 Curvas de producción de nitritos.**

Conforme a lo descrito en el apartado 4.5.1, el monitoreo de la producción de nitritos se realizó como complemento para verificar el cumplimiento del ciclo del nitrógeno en la

reducción de nitratos. Las curvas obtenidas del monitoreo de este proceso se establecieron con base a la concentración de nitritos generada a través del tiempo.

Las tablas 5.5 y 5.6 representan las concentraciones de nitritos medidas al mismo tiempo que se realizaron las determinaciones de crecimiento del microorganismo y de remoción de nitratos.

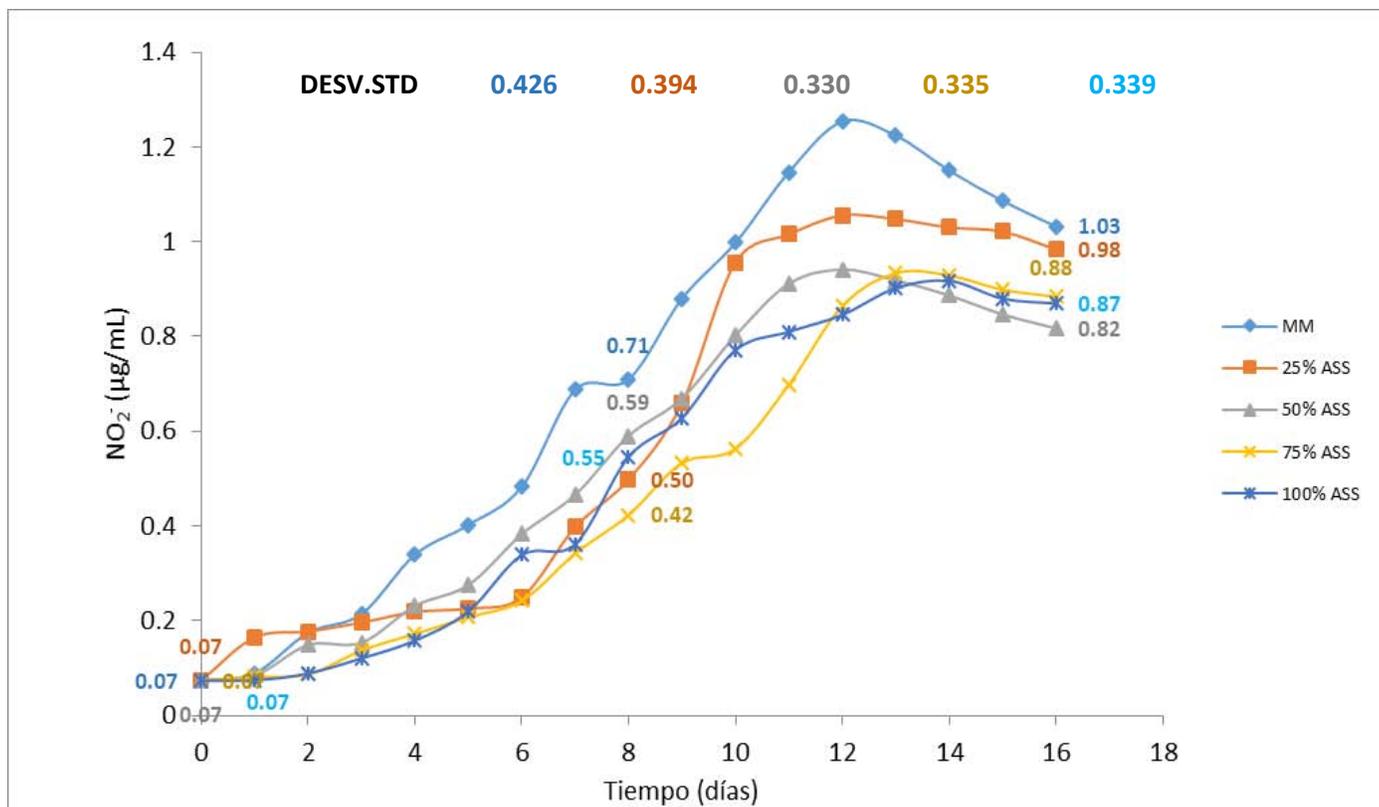
Tabla 5.5. Concentración de nitritos en los medios modificados con agua salina en función del tiempo.

<b>Concentración de nitritos (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>					
<b>DÍA</b>	<b>MM</b>	<b>25% ASS</b>	<b>50% ASS</b>	<b>75% ASS</b>	<b>100% ASS</b>
<b>0</b>	0.074	0.074	0.074	0.074	0.073
<b>1</b>	0.089	0.165	0.085	0.081	0.074
<b>2</b>	0.175	0.177	0.149	0.087	0.089
<b>3</b>	0.214	0.196	0.154	0.137	0.121
<b>4</b>	0.339	0.218	0.231	0.172	0.158
<b>5</b>	0.402	0.226	0.276	0.207	0.220
<b>6</b>	0.483	0.249	0.383	0.242	0.339
<b>7</b>	0.688	0.398	0.466	0.342	0.362
<b>8</b>	0.710	0.498	0.590	0.423	0.546
<b>9</b>	0.880	0.659	0.669	0.533	0.628
<b>10</b>	0.998	0.956	0.802	0.563	0.771
<b>11</b>	1.147	1.015	0.911	0.699	0.810
<b>12</b>	1.254	1.056	0.941	0.864	0.846
<b>13</b>	1.255	1.048	0.919	0.934	0.902
<b>14</b>	1.162	1.030	0.887	0.929	0.918
<b>15</b>	1.112	1.021	0.847	0.899	0.880
<b>16</b>	1.086	0.984	0.817	0.884	0.869
<b>DE</b>	0.426	0.394	0.330	0.335	0.339

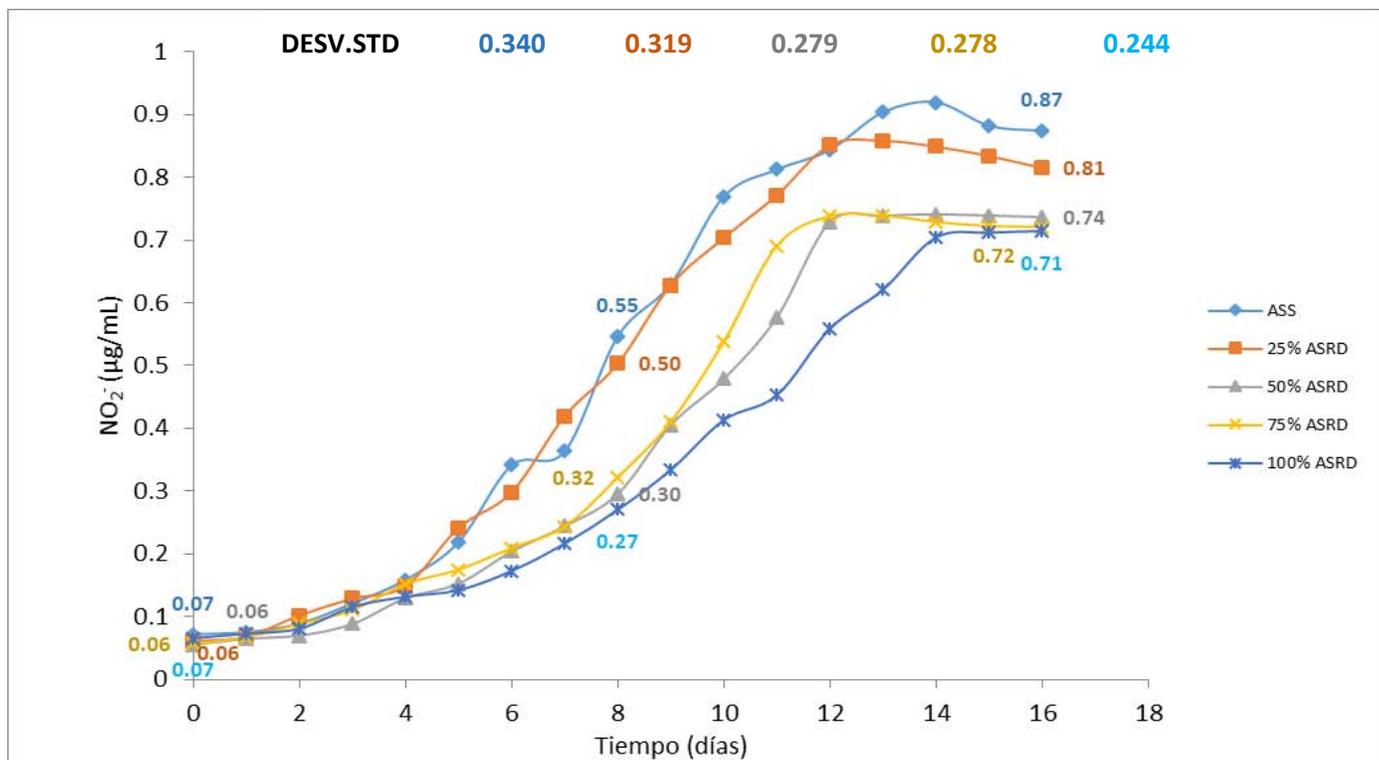
Tabla 5.6. Concentración de nitritos en los medios modificados con agua residual en función del tiempo.

<b>Concentración de nitritos (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>					
<b>DÍA</b>	<b>ASS</b>	<b>25% ASRD</b>	<b>50% ASRD</b>	<b>75% ASRD</b>	<b>100% ASRD</b>
<b>0</b>	0.072	0.061	0.055	0.056	0.065
<b>1</b>	0.075	0.068	0.065	0.068	0.073
<b>2</b>	0.089	0.102	0.070	0.088	0.081
<b>3</b>	0.121	0.129	0.088	0.111	0.115
<b>4</b>	0.159	0.149	0.129	0.152	0.132
<b>5</b>	0.219	0.241	0.153	0.175	0.142
<b>6</b>	0.341	0.298	0.204	0.209	0.173
<b>7</b>	0.363	0.419	0.244	0.244	0.217
<b>8</b>	0.546	0.503	0.295	0.322	0.270
<b>9</b>	0.630	0.628	0.405	0.411	0.334
<b>10</b>	0.769	0.704	0.479	0.538	0.413
<b>11</b>	0.812	0.771	0.577	0.691	0.453
<b>12</b>	0.844	0.851	0.728	0.738	0.559
<b>13</b>	0.904	0.858	0.738	0.739	0.621
<b>14</b>	0.919	0.849	0.741	0.729	0.704
<b>15</b>	0.882	0.834	0.739	0.723	0.712
<b>16</b>	0.874	0.815	0.737	0.721	0.714
<b>DE</b>	0.340	0.319	0.279	0.278	0.244

La producción de nitritos, considerada como una reducción parcial de nitratos, aumenta con la concentración efluente de nitratos, esta razón es mayormente visible en la representación gráfica de las tablas anteriores la cual se muestra continuación (los datos de las tablas 5.5 y 5.6 se ven representados en las gráficas 5.6 y 5.7 respectivamente).

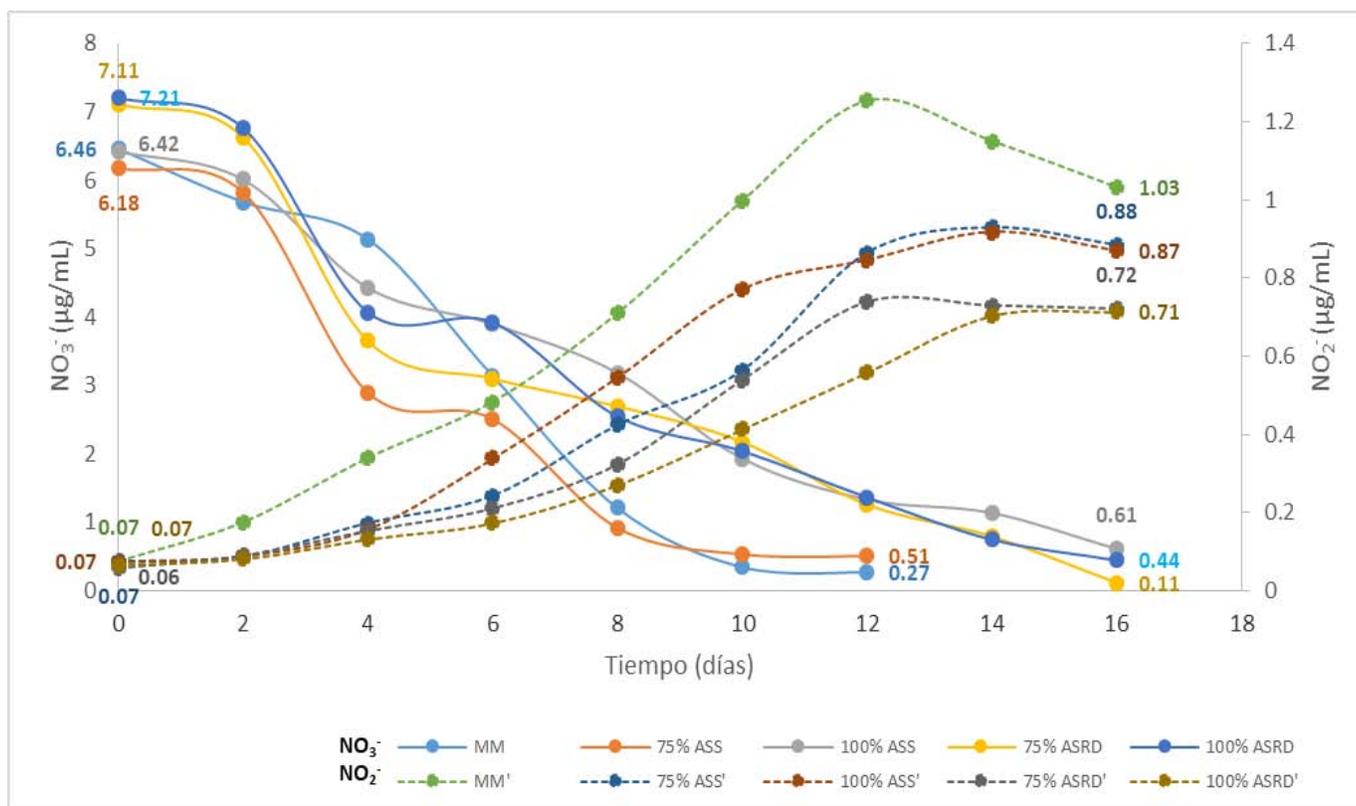


Gráfica 5.6. Curva de concentración de nitritos en función del tiempo (agua salina).



Gráfica 5.7. Curva de concentración de nitritos en función del tiempo (agua residual).

La degradación de nitrato con la consecuente producción de nitrito es resultado de la actividad metabólica de los organismos desnitrificantes, por lo tanto, el seguimiento de las dinámicas poblacionales de *Pseudomonas stutzeri* evidencian la existencia de una fuerte correlación y especificidad del nitrato como fuente de energía.



Gráfica 5.8. Reducción de nitratos y la simultánea producción de nitritos.

En la gráfica 5.8 podemos observar un periodo de estabilización que comprende los dos primeros días de la experimentación, éste es el tiempo en el cual el microorganismo tarda en adaptarse al medio y hacer uso de los nutrientes presentes y con ellos llevar a cabo el proceso desnitrificante (ver sección 5.2.2 Curvas de crecimiento en MM, ASS, ASRD y sus combinaciones). Durante este período las concentraciones de nitritos fueron bajas o indetectables.

Durante el proceso experimental las concentraciones de nitratos fueron bajando hasta ser indetectables y a su vez los nitritos iban en aumento, en la gráfica 5.8 se observa que los

nitritos no alcanzaron una concentración tan elevada como la que se tenía de nitratos al inicio de proceso reductivo, esto se debe a que *Pseudomonas stutzeri* a diferencia de otros microorganismos lleva a cabo una desnitrificación completa, durante dicho proceso se forman óxidos de nitrógeno a partir del nitrito hasta la completa reducción a  $N_2$ , estos compuestos nitrogenados se forman de manera casi inmediata por una serie de enzimas como la nitrito reductasa, óxido nítrico reductasa y óxido nitroso reductasa (Madigan *et al.*, 2004) lo que impide la acumulación de nitritos en los medios experimentales y con ello la formación de otros compuestos nitrogenados no detectados (compuestos que no fueron objeto de estudio en el presente trabajo). Como se mencionó en la sección 5.3.1, el nitrógeno gaseoso fue eliminado de manera simple con un proceso de aireación producido al retirar los tapones de los contenedores y la agitación constante a la que estaban sometidos.

### **5.3.2 Validación estadística del método (ANOVA).**

La validación estadística permitió medir cuantitativamente la relación que guardan los efectos directos e indirectos de los componentes de los diferentes medios con el microorganismo en estudio así como las interacciones entre éstos que influyen de forma significativa durante la degradación del nitrato y el efecto que tienen en el proceso de desnitrificación en los sistemas experimentales. El análisis mediante ANOVA facilita la determinación de diferencias significativas en los medios experimentales de diversa composición de los valores obtenidos del nitrato removido.

Un análisis estadístico establece dos hipótesis sobre las cuales se evalúa la efectividad o no efectividad de un método a prueba estableciendo un nivel de significancia sobre el cual se evalúan los resultados obtenidos, en este caso se empleó un nivel de significancia del 95%, la hipótesis nula ( $H_0$ ) establece que no existe diferencia significativa en la remoción de nitratos para los distintos medios experimentales, por el contrario la hipótesis alternativa ( $H_1$ ) establece que no todas las medias son iguales y por ende existe diferencia significativa entre los diversos medios en cuanto a desnitratación se refiere. Los resultados del análisis ANOVA se muestran en la tabla 5.7.

Ho:  $\mu_B = \mu_{MM} = \mu_{AS} = \mu_{AR} = \mu_{AS:AD} = \mu_{AR:AS}$   
 H1:  $\mu_B \neq \mu_{MM} \neq \mu_{AS} \neq \mu_{AR} \neq \mu_{AS:AD} \neq \mu_{AR:AS}$   
 Las medias son diferentes de  $\mu_B$  (bco)

Tabla 5.7. Resultados Análisis de Varianza (resumen estadístico).

FV	SC	GL	CM	FC
Tratamientos	3562.418	5	712.484	686.619
Error	2276.050	88	25.864	
Total	1286.369	93		

La interpretación de los resultados establece que no existe evidencia suficiente para rechazar H1 (las medias de las mezclas geométricas difieren de la media del blanco), por lo tanto se da un segundo tratamiento con la prueba de Turkey a los datos para establecer diferencias de los medios antes sí. Los resultados aparecen en la tabla 5.8 para la cual se considera una  $DMS = \pm 3.44503967$  y en base a ésta tomar la decisión correspondiente, el nivel de significancia continúa siendo 95%.

Tabla 5.8. Diferencia mínima significativa entre los medios experimentales y toma de decisión.

	Diferencia	DMS	Decisión
<b>MM vs ASS</b>	0.124	1.647	<b>Ho</b>
<b>MM vs ASRD</b>	0.147	1.670	<b>Ho</b>
<b>MM vs ASS:AD</b>	0.385	2.007	<b>Ho</b>
<b>MM vs ASRD:ASS</b>	0.124	1.646	<b>Ho</b>
<b>MM vs BCO</b>	3.685	5.207	<b>H1</b>
<b>ASS vs ASRD</b>	0.023	1.441	<b>Ho</b>
<b>ASS vs ASS:AD</b>	0.510	2.032	<b>Ho</b>
<b>ASS vs ASRD:ASS</b>	0.248	1.666	<b>Ho</b>
<b>ASS vs BCO</b>	3.560	4.978	<b>H1</b>
<b>ASRD vs ASS:AD</b>	0.533	2.055	<b>Ho</b>
<b>ASRD vs ASRD:ASS</b>	0.271	1.688	<b>Ho</b>
<b>ASRD vs BCO</b>	3.537	4.955	<b>H1</b>
<b>ASS:AD vs ASRD:ASS</b>	0.262	1.785	<b>Ho</b>
<b>ASS:AD vs BCO</b>	4.070	5.593	<b>H1</b>
<b>ASRD:ASS vs BCO</b>	3.808	5.226	<b>H1</b>

La tabla anterior establece que existe diferencia significativa entre todos los medios respecto al blanco y que no existe diferencia significativa entre sí de los medios evaluados en cuanto a la degradación del nitrato, lo cual pone de manifiesto que la desnitratación en todos los sistemas es efectiva por la actividad de la bacteria desnitrificante en estudio, la que demuestra su capacidad de reducir el nitrato a nitrito e incluso hasta nitrógeno molecular.

La información generada en el presente análisis estadístico permitió demostrar que las diferencias en la remoción de nitratos en los distintos medios fueron significativas, sin embargo, debido a la naturaleza de las relaciones multivariadas existentes no es posible medir por métodos de análisis convencionales (p. ej.: matrices de análisis de correlación de Pearson) el efecto de todos los parámetros sobre la degradación y formación de diversos compuestos nitrogenados durante la desnitrificación.

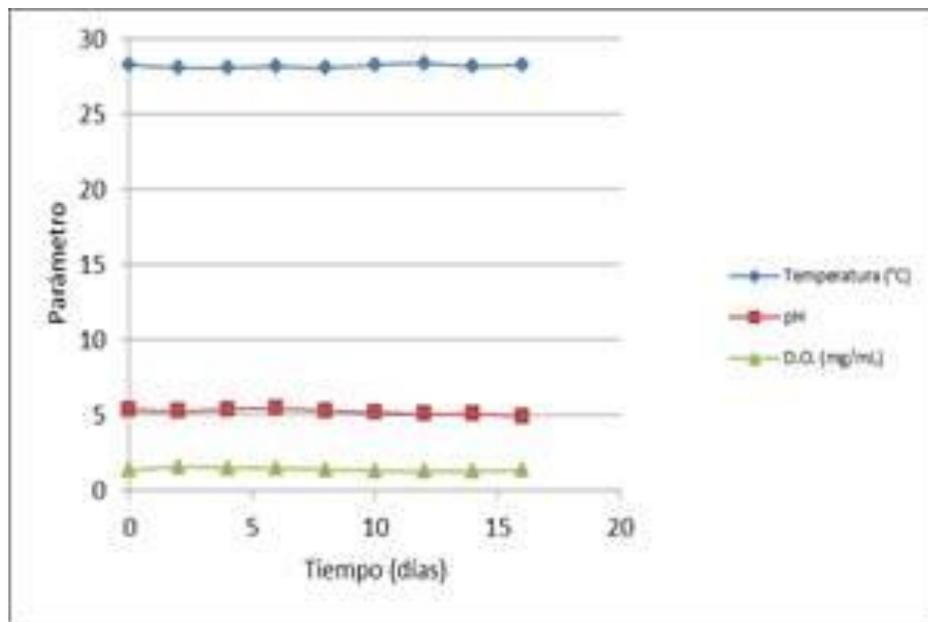
### 5.3.3 Determinación de temperatura, pH y O.D.

En lo que respecta al monitoreo de temperatura, pH y O.D., los datos obtenidos quedaron registrados en la tabla 5.9 donde se observa que los valores para estos parámetros se mantuvieron constantes, la temperatura registrada fue de  $28.1^{\circ}\text{C} \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ , el pH oscila entre 4.96 y 5.44 unidades. El O.D. mantuvo su concentración en un intervalo de 1.26 – 1.57 mg/mL. Dicho registro corresponde a los valores promedio de los diversos medios ya que no hubo variación entre ellos en lo que respecta a los parámetros mencionados, las condiciones a las que se sometieron fueron las mismas. Los datos de la tabla 5.9 se representan en la gráfica 5.9.

Los resultados presentados ponen en evidencia la dependencia de variables sobre la reducción de nitrato a nitrito en función de la biomasa y por consecuencia de su actividad biológica. Valores mayores o menores de cada uno de los parámetros determinados obligarían a que el proceso desnitrificante en vez de ser anaerobio fuera aerobio. Lalucat *et al.*, 2006, establece que *Pseudomonas stutzeri* es excelente desnitrificante en condiciones de pH 4.5 y temperatura de  $28^{\circ}\text{C} - 37^{\circ}\text{C}$ .

Tabla 5.9. Registro de temperatura, pH y O.D.

DÍA	Temperatura (°C)	pH	O.D. (mg/mL)
0	28.3	5.36	1.33
2	28.1	5.25	1.57
4	28.1	5.39	1.48
6	28.2	5.44	1.47
8	28.1	5.28	1.38
10	28.3	5.19	1.32
12	28.4	5.06	1.26
14	28.2	5.08	1.28
16	28.3	4.96	1.33



Gráfica 5.9. Tendencia de parámetros (T°, pH, O.D.).

Refiriéndonos a la temperatura, ésta es considerada uno de los factores ambientales más importantes en el proceso de eliminación biológica de nitrógeno de las aguas residuales. La temperatura que recibieron los contenedores de los medios al encontrarse en el intervalo óptimo para el desarrollo del microorganismo, permite que la velocidad de crecimiento bacteriano sea adecuada consiguiendo un equilibrio con el proceso de desnitratación.

Algunas características importantes de las aguas residuales son el contenido total de sólidos, olor, color, densidad. Dentro de la materia inorgánica presente es importante hablar de la concentración de ion hidrógeno (pH) ya que en altas concentraciones presenta dificultades para el tratamiento de aguas naturales y residuales, es considerado como uno de los factores durante la puesta en marcha y operación del proceso en estos tratamientos (Claros, 2012). Este parámetro regula el equilibrio químico entre el sustrato de los microorganismos desnitrificantes y por sí mismo es inhibidor del proceso a valores relativamente altos o extremadamente bajos. En este estudio los resultados demuestran que no es necesario controlar el pH mediante la adición de ácidos o bases lo cual reduce costes económicos, la propia capacidad de autorregulación bacteriana y la relación molar entre los distintos compuestos de nitrógeno producidos a lo largo de la reducción de nitratos es suficiente para alcanzar una desnitratación estable. Los resultados sobre el efecto del pH sobre la actividad de *P. stutzeri* muestran que el intervalo de pH en el que la actividad de la bacteria es máxima se encuentra entre 5.28 – 5.44.

La concentración de O.D. en un reactor es un parámetro de operación muy importante para los organismos desnitrificantes. La afinidad por el oxígeno que presentan los diversos grupos de bacterias nitrificantes y desnitrificantes puede variar en función de aspectos como las especies de organismos involucradas, tipo de proceso y grado de aclimatación al reactor y medio al que son expuestos. La concentración de oxígeno disuelto tiene un efecto doble sobre el rendimiento del proceso de remoción de componentes de nitrógeno, por una parte, la baja concentración de oxígeno disuelto suprime el proceso de nitrificación, mientras que en una concentración mayor que 2 mg/L inhibe el proceso de desnitrificación, y con ello favorecer la reacción aerobia de oxidación del carbono, altas concentraciones de oxígeno disuelto inhiben el proceso de desnitrificación (Lolmede *et al.*2000,).

El modelo estadístico de la sección 5.3.2 estableció que la producción de nitritos es inversamente proporcional a la reducción de nitrato y es modificada directamente por la cantidad de microorganismos desnitrificantes, los cuales se ven influenciados en sus dinámicas poblacionales por la relación de concentraciones de nitrato, temperatura, pH y O.D.

### 5.3.4 Porcentajes de remoción de nitratos en los diferentes medios y sus combinaciones.

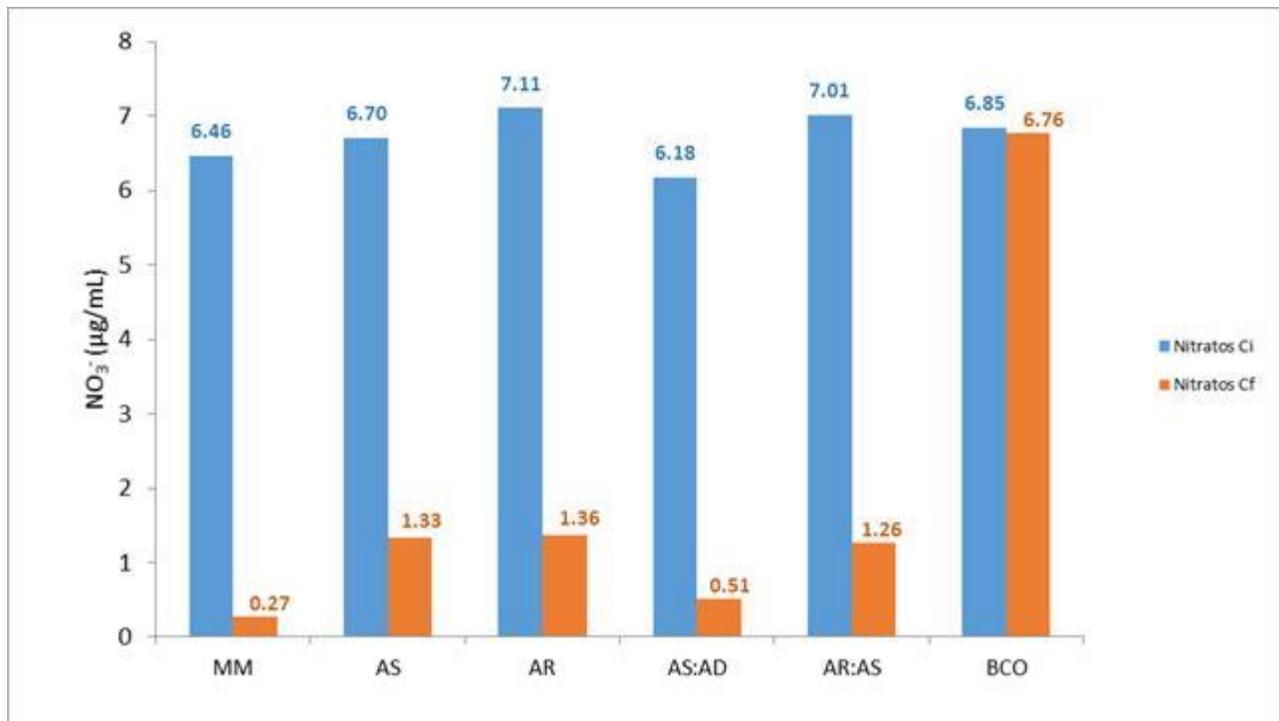
El porcentaje de remoción de nitratos se calculó con la finalidad de obtener un control cuantitativo de las técnicas analíticas empleadas. Obteniendo los resultados que quedaron registrados en la tabla 5.10. Los datos correspondientes al blanco, son un promedio obtenido de los blancos usados para cada medio tal como se indicó en el punto 5.3.1.

Los resultados obtenidos de acuerdo a lo visto en la sección 5.3.1, el porcentaje de degradación de nitratos en agua residual sintética disminuyó respecto a lo obtenido en los otros medios, principalmente en el medio mineral, pues las especies como *P. stutzeri* poseen un metabolismo tan versátil que les permite realizar una asimilación jerárquica de las fuentes de carbono y nitrógeno individuales, favoreciendo el uso de ciertos compuestos sobre otros substratos.

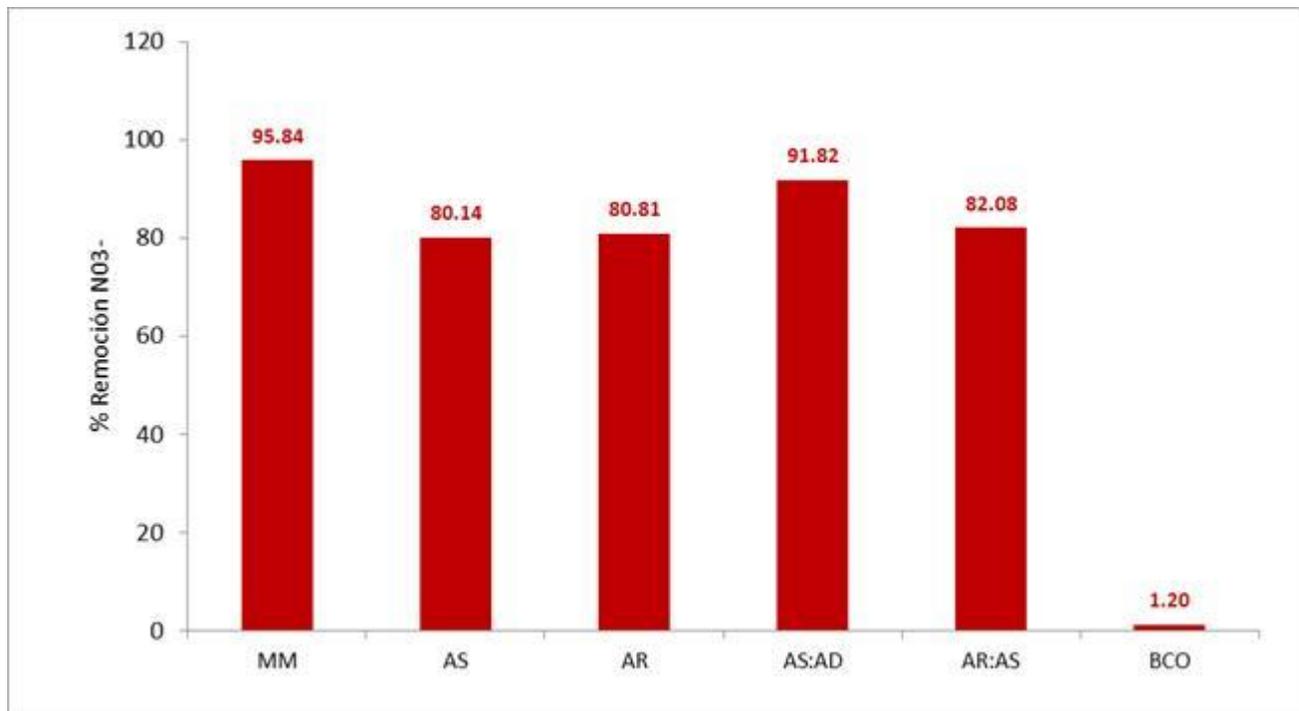
Tabla 5.10. Porcentajes de remoción de nitratos en MM, ASS, ASRD y sus distintas combinaciones (día 0-12).

	MM	ASS	ASRD	ASS:AD (3:1)	ASRD:ASS (3:1)	BLANCO
Nitratos $C_i$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	6.464	6.703	7.208	6.181	7.113	6.847
Nitratos $C_f$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	0.269	1.331	1.364	0.505	1.257	6.765
Porcentaje de remoción	95.841	90.897	80.805	91.824	82.078	1.196

Los datos de la tabla 5.10 se representan de manera gráfica como sigue, donde la gráfica 5.10 muestra la comparación de concentraciones inicial y final de nitratos durante el proceso experimental y la gráfica 5.11 representa los porcentajes de biodegradación en cada medio.



Gráfica 5.10. Concentración inicial y final de nitratos en los medios de exposición.



Gráfica 5.11. Porcentaje de remoción de nitratos en los medios de exposición.

La gráfica 5.10 representa una comparativa entre las concentraciones inicial y final de nitratos en cada uno de los medios experimentales a los que fue expuesto el microorganismo. El análisis estadístico realizado mediante pruebas de hipótesis con método de T de student con nivel de significancia del 95%, estableciendo como hipótesis nula ( $H_0$ ) que no existían diferencias significativas entre las concentraciones inicial y final de nitratos en cada medio experimental al que fue expuesto el microorganismo. Por el contrario, la hipótesis alternativa ( $H_1$ ) enuncia una diferencia significativamente menor de la concentración final respecto a la concentración inicial. Los resultados registrados en la tabla 5.11 permiten establecer que no existe evidencia suficiente para rechazar  $H_1$ .

$$H_0: (C_iB=C_fB)=(C_iMM=C_fMM)=(C_iASS=C_fASS)=(C_iASRD=C_fASRD)=(C_iASS:AD=C_fASS:AD) \\ = (C_iASRD:ASS=C_fASRD:ASS)$$

$$H_1: (C_iB \neq C_fB) \neq (C_iMM \neq C_fMM) \neq (C_iASS \neq C_fASS) \neq (C_iASRD \neq C_fASRD) \neq (C_iASS:AD \neq C_fASS:AD) \\ \neq (C_iASRD:ASS \neq C_fASRD:ASS)$$

Tabla 5.11. Análisis estadístico de la tabla 5.10 y gráfica 5.10.  $H_0: C_f=C_i$  /  $H_1: C_f < C_i$ . T student  $n=5$ ,  $v=4$ ,  $\alpha=5\%$ .

	MM	ASS	ASRD	ASS:AD (3:1)	ASRD:ASS (3:1)	BLANCO
$t_{0,05;4}=-2.132$	-3.294	-2.869	-3.061	-3.026	-3.067	-0.199
<b>Rechazar <math>H_0</math></b>	✓	✓	✓	✓	✓	-

Para el porcentaje total de remoción de nitratos en cada uno de los medios experimentales representados en la gráfica 5.11, se realizó el pertinente análisis estadístico donde las pruebas de hipótesis se realizaron comparando los resultados con el blanco (AD). La hipótesis nula ( $H_0$ ) establecía que no existían diferencias significativas de porcentaje de remoción entre el blanco y los demás medios, y la hipótesis alternativa ( $H_1$ ) que el porcentaje de remoción de los medios experimentales era significativamente mayor que el obtenido en el blanco.

Tomando en consideración los resultados agrupados en la tabla 5.12 se establece que no existe evidencia suficiente para rechazar  $H_1$  en todos los medios experimentales.

$H_0$ : %R B=%R MM=%R ASS=%R ASRD=%R ASS:AD=%R ASRD:ASS  
 $H_1$ : %R B≠%R MM≠%R ASS≠%R ASRD≠%R ASS:AD≠%R ASRD:ASS

Tabla 5.12. Análisis estadístico de gráfica 5.11.  $H_0$ : %R<sub>E</sub>=%R<sub>B</sub> /  $H_1$ : %R<sub>E</sub><%R<sub>B</sub>. T student n=5, v=4,  $\alpha$ =5%.

	MM	ASS	ASRD	ASS:AD (3:1)	ASRD:ASS (3:1)	BLANCO
$t_{0,05;4}=2.132$	20.444	17.281	17.416	19.635	17.673	-5.670
<b>Rechazar <math>H_0</math></b>	✓	✓	✓	✓	✓	-

Considerando los resultados de crecimiento (ver apartado 5.2.2) y remoción total de nitratos, se puede establecer un listado en orden descendente de los medios experimentales que indique la mejor actividad desnitrificante del microorganismo considerando que todos se mantuvieron bajo las mismas condiciones, dicho listado queda de la siguiente manera: 1° MM; 2° **ASS:AD (3:1)**; 3° ASS; 4° ASRD:ASS (3:1) Y 5° ASRD.

En el caso de ASS:AD (3:1) se observa en la gráfica 5.3 que al cabo del día 12 parece que este medio es el menos adecuado para el desarrollo del microorganismo, sin embargo al continuar el monitoreo, en la gráfica 5.4 es notorio que el microorganismo se adecúa perfectamente a las propiedades del medio y remueve los nitratos llegando a los mismos niveles que en el resto de los medios. Esto se hace evidente en el análisis del porcentaje de remoción donde después del medio mineral es el segundo valor con porcentaje más elevado para la remoción total del nitrato. El resto de los medios sólo tienen diferencia con el medio mineral en un 10 – 15% del que éste presenta con lo que se consideran totalmente adecuados.

Aunado a lo anterior y considerando la sección 5.2.2 de las cinéticas de crecimiento de *P. stutzeri* una aportación importante es que permite estimar el crecimiento poblacional bacteriano en función del número de organismos generados en función del sustrato facilitando

con esto la dinámica bacteriana y con ello predecir de forma significativa el proceso de desnitrificación.

### 5.3.5 Comentarios finales.

En la presente investigación se confirmó la actividad desnitrificadora de *Pseudomonas stutzeri* en condiciones de laboratorio, con ello y la importancia plasmada en el análisis previo hemos de considerar que debido a la elevada carga de contaminantes y la escasés de recursos para el tratamiento de aguas residuales los principales beneficios de atender esta problemática se consideran intangibles y difíciles de valorar económicamente. Los resultados obtenidos aportan datos para ser considerados en el diseño y operación con el fin de obtener una reducción en el aporte de nitrógeno de aguas residuales de tipo doméstico, industrial o agrícola a los cuerpos de agua, de tal manera que se reduzca el riesgo de eutrofización. Esto es un claro ejemplo de que se pueden montar sistemas biológicos de gran utilidad para mejorar la calidad del agua de mar deteriorada por la gran cantidad de aguas residuales que ahí desembocan. La consecuencia de no tratar las aguas residuales ocasiona pérdidas económicas, daños a la salud humana, al ambiente e inclusive la pérdida de biodiversidad. El tratamiento de aguas residuales antes de ser descargadas implica la coordinación de trabajo conjunto de tres órdenes: gobierno, iniciativa privada y sociedad. Hoy en día, la mayor preocupación es el papel de la diversidad desnitrificadora para el funcionamiento del ecosistema y en especial para flujos de N y N<sub>2</sub>O. . La descarga de aguas contaminadas hacia el mar debe dejar de ser una práctica común porque aunque existen métodos que permiten la eliminación de nitratos, al día de hoy no son suficientes y este es un campo en pleno desarrollo. El paso siguiente del protocolo desarrollado es retar al microorganismo en un medio natural, por ejemplo exponerlo al agua residual urbana tomada alguna desembocadura y en primera instancia someterla bajo las mismas variables y posterior directamente sobre el medio contaminado en condiciones reales y determinar su comportamiento.

## 6. CONCLUSIONES

Los objetivos planteados al inicio del presente trabajo se cumplieron corroborando así la hipótesis establecida, puesto que:

Se confirmó la identidad de *Pseudomonas stutzeri* mediante el uso de pruebas bioquímicas y moleculares.

Se determinaron las condiciones óptimas de desarrollo del microorganismo (medio de crecimiento, condiciones de temperatura y nutricionales), posteriormente fue sometido a las mezclas experimentales (ASS vs ASRD en proporciones geométricas) bajo las mismas condiciones, donde se pudo determinar su capacidad de adaptación y desarrollo mediante el monitoreo del porcentaje de remoción de nitratos en cada uno, observando que las diversas combinaciones hechas con los medios experimentales no afectan su desarrollo ni su actividad metabólica ya que usan el nitrato como parte de su proceso metabólico.

Se determinó el tiempo de duplicación del microorganismo en un medio experimental (ASS) y en medio óptimo obteniendo resultados apegados con mínima diferencia respecto del dato reportado en la literatura con lo cual se consideró adecuado para el desarrollo experimental. Asimismo se determinaron cinéticas de crecimiento en todos los casos en que se monitoreó la desnitratación evidenciando el crecimiento de la biomasa contra la reducción de nitratos. Las fases de crecimiento plasmadas en las gráficas son claras, la fase de crecimiento en todos los casos es corta y la fase estacionaria es prolongada, la cual representa la relación directamente proporcional de la cantidad de biomasa con la cantidad de nitratos removidos.

En los medios experimentales observamos un elevado porcentaje de remoción de nitratos, particularmente en el contenedor con ASRD al 100% se observó una disminución en la actividad de remoción, esta disminución se hizo evidente al comparar con los resultados obtenidos en el medio mineral o medio óptimo de desarrollo del microorganismo, sin embargo, los resultados arrojan únicamente una diferencia en porcentaje del 15% con lo cual se confirma que *P. stutzeri* puede adaptar su proceso metabólico y reproducirse aún en medios a los que nunca antes había sido expuesto y llevar a cabo el proceso desnitrificante ideal.

La construcción y diseño de los sistemas experimentales a escala de laboratorio fue adecuada y permitió el análisis bajo condiciones controladas del proceso de desnitrificación. La transformación de nitratos está fuertemente relacionada con los valores de pH y la concentración de O.D., el pH se asocia con la degradación de nitratos y nitritos debida a la actividad microbológica. La temperatura al mantenerse constante en promedio de 28°C permitió el desarrollo y la actividad óptima de *P. stutzeri*. Los resultados de los modelos estadísticos permitieron establecer de manera puntual los efectos directos e interacciones que influyen de forma significativa en el proceso reductivo del nitrato, facilitando con ello el planteamiento de las interacciones dinámicas que se establecieron para la simulación del proceso desnitrificante en sistemas experimentales.

## 7. ANEXOS

### Anexo A. Preparación de agua de sal marina sintética (ASS).

**Oceanic sal marina® libre de nitratos y fosfatos**, provee todos los elementos esenciales que se pueden encontrar en el agua marina natural, además de un nivel óptimo de elementos traza necesarios para el desarrollo de bacterias y corales. Las indicaciones de su preparación se describen a continuación, y su composición se muestra en la tabla A.1.

#### Instrucciones

- Mezclar la sal en un contenedor.
- Utilizar agua destilada.
- Agregar 34 g de sal por litro de agua y agitar vigorosamente hasta completa disolución.
- Ajustar la salinidad (1.021 – 1.023 a 25°C).

Tabla A.1. Propiedades del agua de mar sintética (ASS).

Característica	Parámetro (unidad/litro)
Gravedad específica (salinidad)	1.021 – 1.023
pH	8.3 – 8.4
Calcio	400 – 420 ppm
Magnesio	1070 – 1100 ppm
Fosfato	---
Nitrato	---

### Anexo B. Preparación de la curva de McFarland (Ramírez-Gama, *et al.* 2008)

Para las determinaciones de turbidez por método de McFarland, se preparó una curva estándar en la que se mezclan diferentes concentraciones de cloruro de bario y ácido sulfúrico para obtener variación de turbidez en cada tubo por la formación de sulfato de bario. La turbidez generada es equivalente a determinado número de bacterias en el medio, la tabla B.1 muestra dicha relación.

Las lecturas se realizaron por triplicado graficando el promedio. La ecuación resultante de la regresión lineal fue empleada para relacionar la turbidez del medio con el número de bacterias presentes.

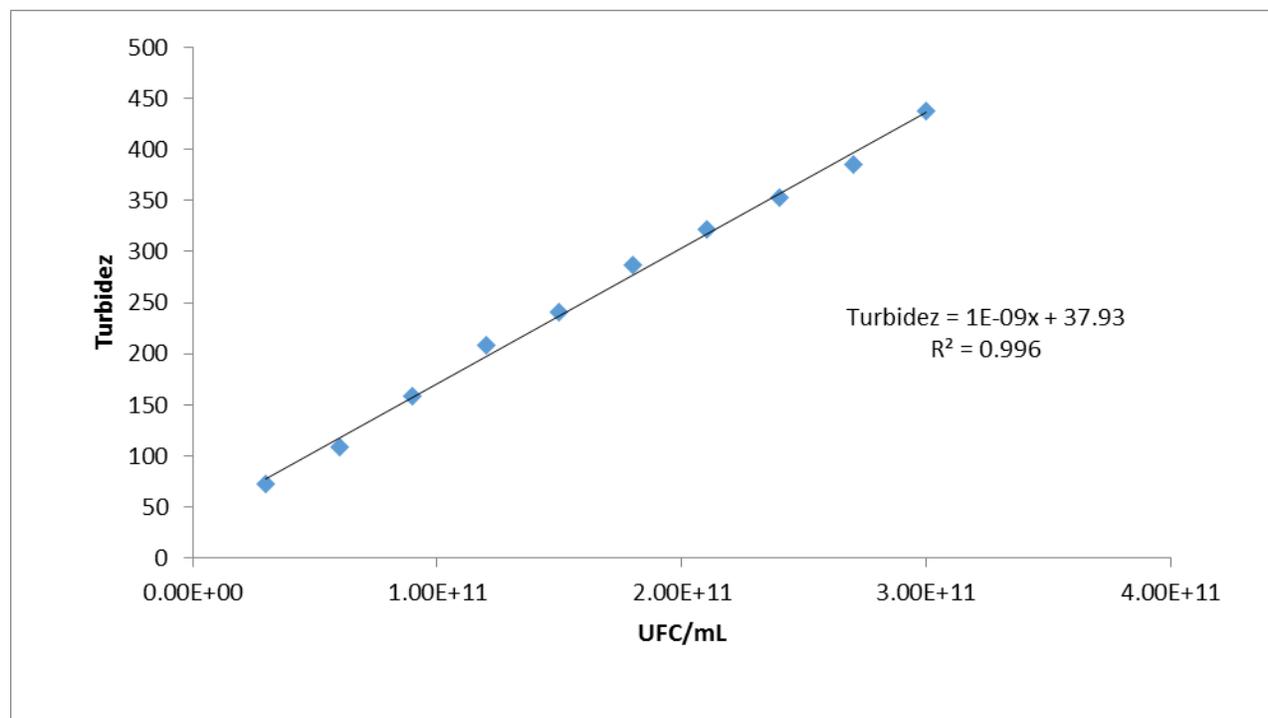
#### Materiales y Reactivos

- 1 celda nefelométrica
- 1 pipeta de 1.0mL
- 1 pipeta de 10.0mL
- Espectrofotómetro
- Ácido sulfúrico al 1.0%
- Solución de cloruro de bario al 1.0%

Tabla B.1. Cantidades de cloruro de bario y ácido sulfúrico utilizadas en la escala de McFarland y su equivalencia con No. bacterias/mL.

Tubo	BaCl <sub>2</sub> 1.0% (mL)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1.0% (mL)	No. aprox. Bacterias/mL x 10 <sup>8</sup>
1	0.1	9.9	300
2	0.2	9.8	600
3	0.3	9.7	900
4	0.4	9.6	1200
5	0.5	9.5	1500
6	0.6	9.4	1800
7	0.7	9.3	2100
8	0.8	9.2	2400
9	0.9	9.1	2700
10	1.0	9.0	3000

La gráfica B.1 representa los datos de la tabla B.1, la cual relaciona la turbidez del medio con el número aproximado de bacterias por mililitro.



Gráfica B.1. Curva de McFarland

### Anexo C. Determinación de nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) mediante Absorción-UV. Curva patrón (NMX-AA-079-SCFI-2001).

Las medidas de Absorbancia - UV a 220 nm permiten la determinación de nitratos, que son absorbentes a esta longitud de onda. No obstante, dado que las materias orgánicas también pueden hacerlo a esta longitud de onda, se hizo una segunda lectura a 275 nm para obtener la medida relativa sólo a nitratos. Este método tiene un máximo de detección de 7 ppm.

Las lecturas se realizaron por triplicado graficando el promedio. La ecuación resultante de la regresión lineal fue empleada para relacionar la absorbancia con la concentración de nitratos ( $\mu\text{g/mL}$ ), esta relación se muestra en la tabla C.1.

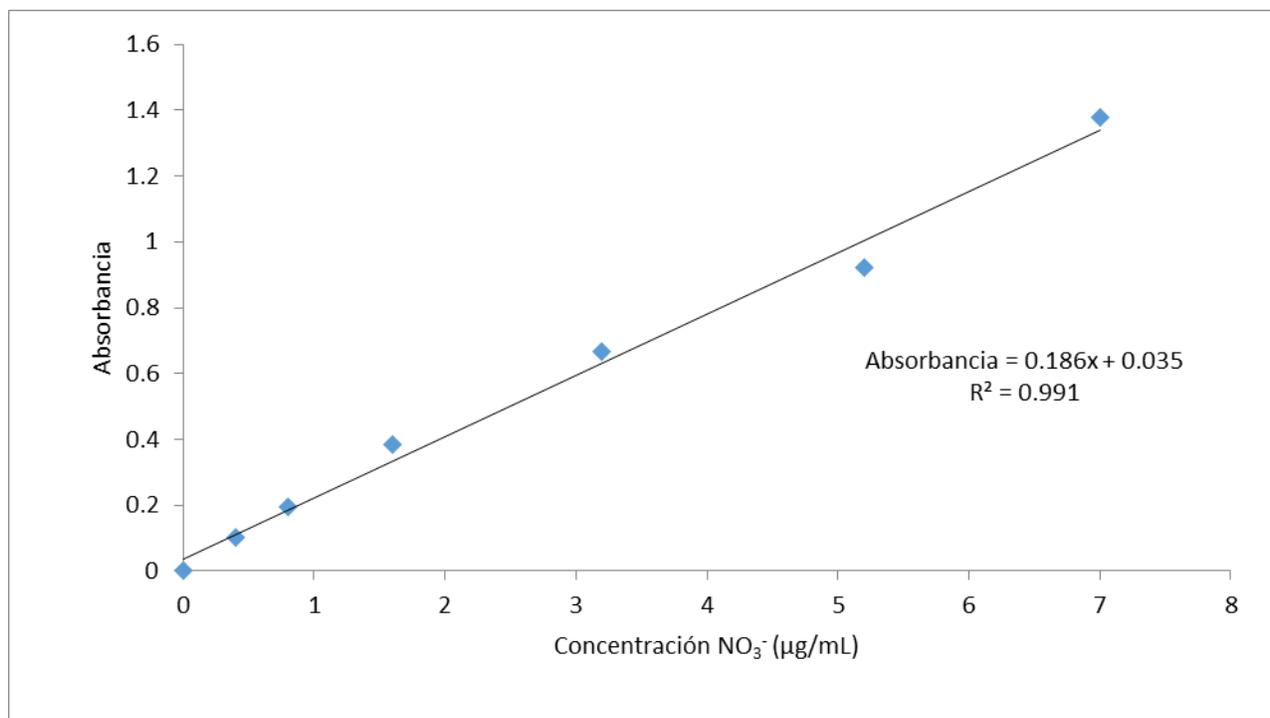
#### Materiales y Reactivos

- Espectrofotómetro UV
- Celda de cuarzo de 1cm
- 6 tubos Nessler aforados 50 mL
- Agua destilada exenta de nitratos
- Disolución de HCl 1N
- Disolución madre de nitratos (100 ppm)
- Disoluciones diluidas de nitratos (concentraciones de 1 – 10ppm)

Tabla C.1. Cantidades de solución de nitratos utilizadas para la curva de calibrado y su equivalencia con la concentración de  $\mu\text{g NO}_3^-/\text{mL}$ .

Tubo	Solución hija 10 $\mu\text{g/mL}$ (mL)	Agua destilada (mL)	HCl 1 N (mL)	Concentración de $\text{NO}_3^-$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
1	0	50	1	0.0
2	2	48	1	0.4
3	9	41	1	1.8
4	18	32	1	3.6
5	26	24	1	5.2
6	35	15	1	7.0

La gráfica C.1 representa los datos de la tabla C.1 que relacionan la absorbancia del medio con la concentración presente de nitratos por mililitro.



Gráfica C.1. Curva patrón de nitratos ( $\text{NO}_3^-$ )

### Anexo D. Determinación de nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) método de Sulfanilamida. Curva patrón (NMX-AA-154-SCFI-2011).

La disociación de la sulfanilamida en medio ácido y su unión con la N-(1-naftil)-etilen-diamina da un complejo colorido púrpura susceptible a la determinación colorimétrica. La determinación espectrofotométrica se realiza a 543 nm. Máximo de detección 25 ppm.

Las lecturas se realizaron por triplicado graficando el promedio. La ecuación resultante de la regresión lineal fue empleada para relacionar la absorbancia con la concentración de nitritos ( $\mu\text{g/mL}$ ), esta relación se muestra en la tabla D.1.

#### Materiales y Reactivos

- Espectrofotómetro UV
- Celda de cuarzo de 1 cm
- 6 tubos Nessler 50 mL
- Reactivo de color 1 (sulfanilamida)
- Reactivo de color 2 (N-(1-naftil)-etilen-diamina)
- Agua destilada

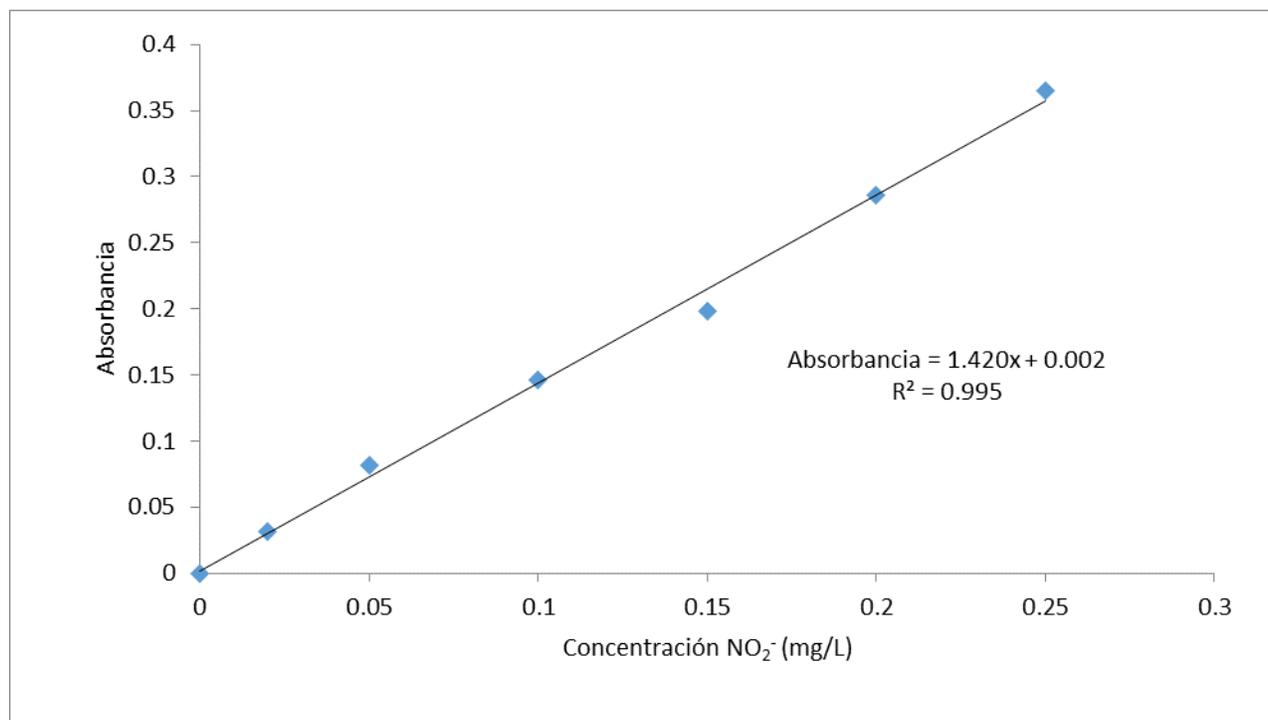
Tabla D.1. Cantidades de solución de nitratos y reactivos de color utilizados para la curva patrón y su equivalencia con la concentración de  $\text{mg NO}_2^-/\text{L}$ .

Tubo	Solución hija 0,1 g/L (mL)	Agua destilada (mL)	Sulfanilamida <sup>1</sup> (mL)	N(1-naftil)-etilen-diamina <sup>2</sup> (mL)	Concentración de $\text{NO}_2^-$ (mg/L)
1	0	50	1	1	0.00
2	2	48	1	1	0.02
3	8	42	1	1	0.05
4	15	35	1	1	0.10
5	20	30	1	1	0.15
6	35	15	1	1	0.20

<sup>1</sup> Después de adicionar la sulfanilamida agitar vigorosamente y esperar 5 min.

<sup>2</sup> Agitar y esperar 10 min para posteriormente leer a 543 nm.

La gráfica D.1 representa los datos de la tabla D.1 que relaciona la absorbancia del medio con la concentración presente de nitritos por litro.



Gráfica D.1. Curva patrón de nitritos ( $\text{NO}_2^-$ )

## Anexo E. Amplificación del 16S rRNA

El procedimiento para la amplificación del DNA se realizó mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) usando 1.5µL (20pmol/µL) de los cebadores para 16S rRNA bacteriano cuyas secuencias se describen en la tabla E.1. La mezcla final que fue expuesta para la amplificación del material genético fue llevada a un volumen total de 25µL de la siguiente manera: 5µL de muestra de DNA extraído, 1.5µL de amortiguador 10x, 1.5µL de MgCl<sub>2</sub>, 1.5µL de dNTPs 200pmol/µL y 1.25µL de Taq polimerasa completando el volumen con agua Mq.

El ciclo a seguir durante la PCR fue precalentar a 95°C durante 1 minuto, continuando con 16 ciclos a 60°C de 1 minuto, incubar para la reacción de hibridación a 72°C durante 1 minuto, posterior se repite el primero ciclo 14 veces durante 1 minuto y al final con extensión a 72°C durante 6 minutos, enfriamiento a 4°C.

Tabla E.1. Cebadores 16S rRNA bacteriano.

Nombre	Secuencia (5' - 3')
<b>1401GR</b>	TCCTACGGGAGGCAGCAG
<b>T341f</b>	CGGTGTGTACAAGACCCG

---

## 8. REFERENCIAS

1. Atlas R.M., Bartha R. 2001. **Ecología microbiana y microbiología ambiental**. 4ta. Edición. Edit. Addison Wesley. España. 696 pp.
2. Arheimer B. y Wittgren H. 2002. **Modelling nitrogen removal in potential wetlands at the catchment scale**. *Ecol. Eng.* 63-80 pp.
3. Barragán M., Roeckel E., Aspé M. C. 2009. **Efecto de la carga orgánica sobre la desnitrificación de vertidos proteicos salinos**. Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Concepción. Chile.
4. Bennasar A., Guasp C., Lalucat J. 1998. **Molecular Methods for the Detection and Identification of *Pseudomonas stutzeri* in Pure Culture and Environmental Samples** in *Microbial Ecology*. Vol. 35, Issue 1, Springer-Verlag New York, 22–33 pp.
5. Beristaina R., 2004. **Eliminación anóxica de carbono, nitrógeno y azufre por medio de un reactor de lecho fluidificado inverso**. Tesis de Maestría, Laboratorio de Fisiología Microbiana del Depto. de Biotecnología de la UAM Unidad Iztapalapa. México.
6. BID, 2013. Banco Interamericano de Desarrollo. Sector de Infraestructura y Medio Ambiente. De la Peña M.E., Ducci J., Zamora V. **Tratamiento de aguas residuales en México**. México.
7. Bothe H., Ferguson S.J., Newton W.E. 2007. **Biology of the Nitrogen Cycle**. 1a. Edición. Edit. Elsevier.UK. 1-6; 313 – 376 pp.
8. Claros Bedoya J.A., 2012. **Estudio del proceso de Nitrificación y Desnitrificación vía nitrito para el tratamiento biológico de corrientes de agua residual con alta carga de nitrógeno amoniacal**. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. 26-70 pp.
9. Coleman Nicholas V., Holmes Andrew J., 2006. **The native *Pseudomonas stutzeri* strain Q chromosomal integron can capture and express cassette-associated genes**. Sydney, Australia

10. Comisión Nacional del Agua, 2007. **Manual de Agua Potable, Alcantarillado y Saneamiento**. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.
11. Comisión Nacional del Agua, 2010. **Estadísticas del Agua en México 2010**. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.
12. Comisión Nacional del Agua, 2011. **Estadísticas del Agua en México 2011**. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.
13. Comisión Nacional del Agua, 2016. **Estadísticas del Agua en México 2016**. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.
14. Carlson Curtis A, Ingraham John L., 1982. **Comparison of Denitrification by *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Paracoccus denitrificans*** in Applied and Environmental Microbiology. Vol. 45, No. 4. California. 1247 – 1253 pp.
15. Kralj D., Zorko J., Goricanec Darko. 2005. **A system approach to waste-water cleaning facilities managemen** in Ecosystems and Development. Venice, Italy. 193 – 198 pp.
16. Lalucat J., Bennasar A., Bosch R., García-Valdés E., J. Palleroni N. 2006. **Biology of *Pseudomonas stutzeri*** in Microbiology and Molecular Biology Review, Vol. 70. España. 510 – 570 pp.
17. Lolmede Ph., Jácome A., Vidart T., Tejero I. 2000. **Tratamiento de agua residual con elevando contenido de nitratos utilizando reactores de membrana aireados** en Ingeniería del Agua, Vol. 7. Universidad de Cantabria. España. 243 – 254 pp.
18. Manahan S. E., 2014. **Introducción a la Química Ambiental**. 1ª. Edición. Editorial Reverté. México, D.F. 123 – 127 pp., 205 – 246 pp.
19. Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. 2004. **Brock. Biología de los Microorganismos**. 10ª. Edición. Edit. Pearson Education. Madrid, España. 368 – 371; 826 - 941 pp.
20. Martín I. G., Betancourt J. R., Salas J.R., Peñate B. S., Pidre J. B., Sardón N. M. 2006. **Guía sobre tratamientos de aguas urbanas para pequeños núcleos de población**. 1ª. Edición. Edit. ITC. España.

21. Miyara Morio, Sang-Wan Kim, Shinya Fushinobu, 2010. **Potential of Aerobic Denitrification by *Pseudomonas stutzeri* TR2 to Reduce Nitrous Oxide Emissions from Wastewater Treatment Plants** by Applied and Environmental Microbiology, Vol. 76, No. 14; pp. 4619 – 4625.
22. Ramírez-Gama R. M., Luna Millán B., Velázquez Madrazo O., Vierna García L., Mejía Chávez A., Tsuzuki Reyes G., Hernández Gómez L., Mûggenburg I., Camacho Cruz A., Urzúa Hernández M. del C. 2008. **Manual de Prácticas de Microbiología General**. Facultad de Química, UNAM. 158-159; 163-164 pp.
23. Rodríguez Ramos, Hernández Gómez L. 2001. **Aislamiento e Identificación de bacterias que degradan hidrocarburos de una muestra de suelo tomadas en un taller mecánico del Sur de la Ciudad de México**.
24. SEMARNAT, 1996. 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. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos naturales. DOF.
25. Secretaría de Salud, 1994. Norma Oficial Mexicana **NOM-127-SSA1-1994**, Salud Ambiental, agua para uso y consumo humano- Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización.
26. Secretaría de Economía, 2001. Norma Mexicana **NMX-AA-079-SCFI-2001**, Análisis de aguas – Determinación de nitratos en aguas naturales, potables, residuales y residuales tratadas – Método de prueba.
27. Secretaría de Economía, 2011. Norma Mexicana **NMX-AA-154-SCFI-2011**, Análisis de agua – Determinación de nitrógeno de nitritos en aguas naturales, residuales, residuales tratadas y marinas – Métodos de Prueba.
28. Townsend A. R. Howarth R. W., 2010. **Fixing The Global Problem Nitrogen Problem** in Scientific American. 32 -39 pp.
29. USEPA, 2000. **Constructed wetlands treatment of municipal waste waters**. Environmental Protection Agency. United States.