



Universidad Nacional Autónoma de México.

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA

ESTUDIO DE LOS ORGANISMOS DE LOS GENEROS
Nitrosomonas y Nitrobacter WINOGRADSKYI 1892, EN
LOS PROCESOS DE NITRIFICACION EN UN
ESTANQUE DE ESTABILIZACION EN SANTO
TOMAS ATZINGO, ESTADO DE MEXICO.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A :
ELVIA MANUELA GALLEGOS NEYRA



LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MEX.

1988



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicada afectuosamente a:

Arturo Calderón

Por su cariño, apoyo y ayuda en la
realización de esta tesis.

A mis padres

Por su amor, apoyo y estímulo
para seguir siempre adelante.

a mi familia.

Y a mis amigos:

Alfonso Lugo
Patricia Bonilla
Elizabeth Ramírez
Rosario Sánchez
Beatriz Romero
Ricardo Ortíz
Victor Rivera
Gabriela Oliver
Esperanza Robles
Gloria Vilaclara
Pedro Ramírez
Jesús Medina

AGRADECIMIENTOS:

Al Dr. Fermín Rivera Agüero, mi director de tesis por haber hecho posible la realización de este trabajo.

Al Biólogo Alfonso Lugo Vazquez por su valiosa y desinteresada ayuda y asesoría, sin la cuál hubiera sido imposible la realización de esta tesis.

A la Q.F.B. Esperanza Robles Valderrama por sus sugerencias y observaciones acerca de este trabajo.

A la Dra. Gloria Vilaclara por sus valiosas y acertadas sugerencias.

A mis revisores de Tesis: M. en C. Pedro Ramírez
M. en C. Victor Rivera
M. en C. Elizabeth Ramírez

Al personal del Proyecto de Conservación y Mejoramiento del Ambiente de la ENEPI por su cooperación y apoyo.

Con un reconocimiento especial al CONACyT que con su respaldo al proyecto de Conservación y Mejoramiento del Ambiente hizo posible la realización de esta tesis.

A mi escuela.

I N D I C E

	Página.
1 RESUMEN	1
2 OBJETIVOS	2
3 INTRODUCCION.....	3
3.1 Formas y fuentes del Nitrógeno en la naturaleza..	5
3.2 Ciclo del Nitrógeno	7
3.2.1 Fijación	8
3.2.2 Asimilación	9
3.2.3 Amonificación.....	9
3.2.4 Nitrificación	9
3.2.5 Desnitrificación	11
3.3 Impacto ambiental por descargas de materiales nitrogenados en sistemas acuáticos	12
3.3.1 Eutrofización	12
3.3.2 Toxicidad para la vida acuática	13
3.3.3 Incremento en la Demanda Bioquímica de Oxígeno	15
3.3.4 Peligro en la salud pública	15
3.3.5 Disminución de la efectividad de la desinfección por cloro	16
3.4 Estanques de estabilización	17
3.4.1 Importancia	17
3.4.2 Estanques anaerobios-lagunas anaerobias ...	19
3.4.3 Estanques de oxidación	20
3.4.3.1 Estanques facultativos	21

	página
3.4.3.2 Lagunas aerobias de alta tasa.....	22
3.4.3.3 Estanques de maduración	22
3.4.4 Lagunas de aireación	23
3.5 Descomposición de la materia orgánica	23
3.5.1 Proceso aerobio	24
3.5.2 Proceso anaerobio	26
3.6 Biología de los estanques de estabilización	28
3.6.1 Bacterias	30
3.6.2 Algas	31
3.6.3 Protozoarios y hongos	32
3.7 Nitrificación y desnitrificación como método para la remoción de Nitrógeno en las aguas de desecho.	33
3.7.1 Demanda de oxígeno	34
3.7.2 Toxicidad del amoníaco	34
3.7.3 Nutrientes de enriquecimiento	35
3.7.4 Métodos de eliminación del Nitrógeno	35
3.8 Nitrificación	38
3.8.1 Bacterias nitrificantes	38
3.8.1.1 Bacterias amoníaco-oxidantes.....	40
3.8.1.1.1 Morfología y fisiología..	41
3.8.1.1.2 Aislamiento	45
3.8.1.2 Bacterias nitrito-oxidantes	48
3.8.1.2.1 Morfología y fisiología..	50
3.8.1.2.2 Aislamiento	51
3.9 Bioquímica de la nitrificación	53

	página
3.9.1 Oxígeno disuelto	56
3.9.2 Mecanismo de la oxidación del amoníaco por <u>Nitrosomonas</u>	58
3.9.3 Mecanismo de la oxidación del nitrito por <u>Nitrobacter</u>	60
3.10 Parámetros que afectan la nitrificación	63
3.10.1 Oxígeno disuelto	64
3.10.2 Temperatura	65
3.10.3 Potencial hidrógeno	65
3.10.4 Concentración de iones amoníaco y nitrito.	67
3.10.5 Carga orgánica y tiempo de retención	68
4 METODOLOGIA	70
5 RESULTADOS Y DISCUSION	79
6 CONCLUSIONES	94
7 TABLAS	98
8 GRAFICAS	103
9 ANEXO	114
10 BIBLIOGRAFIA	119

1.

RESUMEN

Se hace una revisión exhaustiva de la importancia que tiene la nitrificación en la eliminación de nitrógeno, especialmente en sistemas acuáticos, integrándola a una revisión general del Ciclo del Nitrógeno en todos sus aspectos.

Se analizan los parámetros que afectan a la nitrificación, así como las condiciones óptimas para que ésta se lleve a cabo.

El estudio se hizo en un estanque de estabilización de aguas residuales, con el fin de evaluar el papel de la nitrificación en esos sistemas.

Se relacionaron parámetros fisicoquímicos como Oxígeno Disuelto (OD), Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO), Demanda Química de Oxígeno (DQO), Amoníaco, Nitritos, Nitratos, pH, Temperatura, Acidez y Alcalinidad con la presencia de bacterias nitrificantes.

Se hicieron 15 muestreos en el lapso de Mayo a Noviembre de 1983; de los cuáles se tomaron 9 muestreos representativos.

Se aislaron las bacterias nitrificantes Nitrosomonas europaea y Nitrobacter winogradskyi.

Las condiciones fisicoquímicas del cuerpo de agua estudiado fueron tan extremas que la nitrificación, cuando ocurrió, fue en un nivel crítico.

2.

O B J E T I V O S

-Reconocer la actividad metabólica de los microorganismos de los géneros bacterianos Nitrosomonas y Nitrobacter en los procesos de nitrificación en un sistema de tratamiento de agua residual.

- Determinar el grado de la actividad nitrificante de los microorganismos de los géneros Nitrosomonas y Nitrobacter en un estanque de estabilización.

- Evaluar la importancia de la presencia de los géneros Nitrosomonas y Nitrobacter, en la remoción de productos nitrogenados del efluente del estanque de estabilización.

3.

I N T R O D U C C I O N

El rápido incremento de descargas contaminantes -sobre todo de origen doméstico- en nuestras aguas naturales ha hecho del nitrógeno uno de los principales contaminantes (Balakrishnan, 1969).

La materia orgánica de los desechos domésticos está formada en gran parte por compuestos nitrogenados (proteínas, ácidos nucleicos, etc.), al igual que muchos de los desechos agrícolas e industriales (Mc. Carty, 1971), y cuando éstos son descargados en los efluentes hacia las aguas naturales, la acción bacteriana cataliza la conversión de los productos reducidos del nitrógeno como el amoníaco, para formar productos oxidados como los nitratos. Durante este proceso se ejerce una fuerte demanda de oxígeno en el agua, que puede tener efectos deletéreos en partes del sistema.

El mecanismo de transformación del amoníaco a nitrito y posteriormente a nitrato se conoce como **Nitrificación** (Sharma, 1977).

A pesar de la gran demanda de oxígeno que se genera cuando la nitrificación se lleva a cabo -la cual es un paso vital para la remoción de nitrógeno de aguas de desecho-, la nitrificación ocurre de manera natural en pequeña y gran escala en todos los sistemas acuáticos con las condiciones ambientales propicias. Por ello, en la actualidad este tipo de tratamiento biológico nos brinda una de las alternativas más prácticas y

económicas para la solución de problemas asociados con la remoción del nitrógeno.

La nitrificación se realiza en dos etapas.

En la primera el amoníaco es oxidado a nitrito en forma casi exclusiva por microorganismos aeróbicos del género Nitrosomonas Winogradskyi 1892. Para este efecto, el amoníaco desempeña el papel de combustible aportados de energía, ya que constituye el principal donador de electrones en la respiración de estas bacterias.

La segunda etapa del proceso consiste en la oxidación del nitrito a nitrato llevado a cabo de un modo similar al anterior, pero esta vez por bacterias del género Nitrobacter Winogradskyi 1892, las cuales consiguen su energía casi exclusivamente a partir de la oxidación del nitrito (Christtensen, 1978).

Tanto Nitrosomonas como Nitrobacter obtienen del bióxido de carbono el carbono que necesitan para su desarrollo (Engel, 1961; Lehninger, 1979). Estas bacterias son las encargadas casi exclusivamente del proceso de la nitrificación.

Actualmente el estudio de la nitrificación forma parte de un intenso programa para entender uno de los ciclos más importantes en la naturaleza, el ciclo del nitrógeno (Conn, 1978; Terry, 1981). Sin embargo, falta mucho por investigar acerca del tema, sobre todo en los cuerpos de agua en los cuales por su naturaleza las condiciones pueden ser muy extremas.

La justificación para llevar a cabo este trabajo es

que en México no se han realizado tipo alguno de estudios relacionados al proceso de la nitrificación en sistemas de estanques de estabilización.

El conocimiento de la cinética química y biológica de estos estanques es pobre y la experiencia que se tiene proviene del extranjero, lo cual hace necesario desarrollar estudios de este tipo adaptados a las condiciones climatológicas de nuestro país, tanto para el desarrollo adecuado de métodos de laboratorio para el estudio de los microorganismos involucrados en la nitrificación en estos sistemas, como para la determinación del comportamiento cinético de los mismos en los procesos de la nitrificación.

3.1 FORMAS Y FUENTES DEL NITROGENO EN LA NATURALEZA

Mucho se ha hablado de que el principal componente de nuestra atmósfera es el Nitrógeno en forma gaseosa, esto es, casi 8 de cada 10 partes del aire contienen el elemento nitrógeno, y de que éste, no puede ser incorporado directamente de la atmósfera al soma de la mayoría de los organismos vivientes (Delwiche, 1970).

Sin embargo, es un hecho que el nitrógeno puede ser fijado directamente de la atmósfera por algunos microorganismos procariotas (Wetzel, 1975).

A partir de esta parte del ciclo del nitrógeno (ciclo del cual hablaremos más adelante), se suceden una gran variedad de reacciones químicas catalizadas orgánicamente que derivan en la formación de varios compuestos conteniendo el elemento nitró-

geno (EPA, 1975).

Esto no significa necesariamente que la formación de compuestos nitrogenados sea exclusivamente de origen biológico. Se ha observado que la atmósfera contribuye significativamente a la formación de sustancias a partir del nitrógeno y, más aún, el hombre, de manera espectacular, ha creado la tecnología para intervenir en la naturaleza con la fijación industrial del nitrógeno (Delwiche, 1970; Wetzell, 1975).

En los cuerpos de agua, ya sean ríos, lagos, estanques e incluso sistemas de tratamiento de aguas residuales (en estos últimos a gran escala) el nitrógeno aparece en diversas formas: molecular (N_2) por solubilización de la atmósfera; como compuestos orgánicos tipo aminoácidos, aminas, urea, proteínas, compuestos húmicos, amoníaco ionizado (NH_4^+), amoníaco libre (NH_3), nitritos (NO_2^-) y nitratos (NO_3^-) (Sharma, 1977).

Otras fuentes de nitrógeno son: precipitación, fijación tanto en el agua como en los sedimentos, por infiltración de fertilizantes hacia las aguas subterráneas, etc. (Wetzell, 1975).

De esta manera podemos clasificar las fuentes de nitrógeno del agua de la siguiente manera:

NATURALES

Fijación biológica

Arrastre de materia orgánica por lixiviación

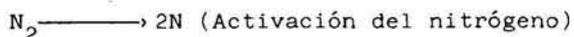
Depositación de polvo

3.2.1. FIJACION

El paso fundamental para que el relativamente inerte nitrógeno de la atmósfera sea incorporado a la vida corresponde a un selecto grupo de microorganismos, los cuales se encargan de reducir químicamente el nitrógeno con átomos de hidrógeno para formar moléculas de compuestos nitrogenados estables.

En este primer enlace intervienen microorganismos de vida independiente, así como ciertas bacterias que viven en simbiosis con plantas superiores. Del primer grupo encontramos Azotobacter, Clostridium, Rhodospirillum etc., mientras que del segundo grupo un típico ejemplo es Rhizobium (Conn, 1978).

Para que la fijación del nitrógeno molecular se lleve a cabo, se requiere de cierta cantidad de energía para activarlo. Esto significa que el nitrógeno molecular debe ser dividido en dos átomos de nitrógeno libres.



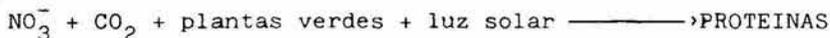
El segundo paso de la fijación se da cuando dos átomos de nitrógeno se combinan con tres moléculas de hidrógeno para formar dos moléculas de amoníaco (NH_3).



Posteriormente es aminado en compuestos de importancia vital, durante el metabolismo de estos organismos, siendo liberado en forma de amoníaco (NH_4^+) y de una gran variedad de compuestos orgánicos a su muerte o su excreción (Postgate, 1972).

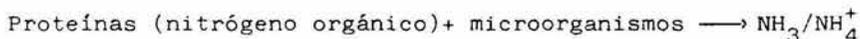
3.2.2. ASIMILACION

Este proceso se refiere a la utilización de los compuestos amoniacos a nitrato para formar las proteínas vegetales u otro tipo de compuestos nitrogenados (EPA, 1975):



3.2.3. AMONIFICACION

Las excreciones o los organismos a su muerte entran en un proceso de descomposición en el cual las proteínas son degradadas por las enzimas proteolíticas de algunas bacterias y convertidas en aminoácidos. Posteriormente, estos aminoácidos son desaminados transfiriendo iones amoniacos al ambiente para ser utilizados en diferentes reacciones como, por ejemplo, en la asimilación (Con, 1976). Por ello, la amonificación se define como el cambio del nitrógeno orgánico a la forma de amoniacos ($\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$) (EPA, 1975).

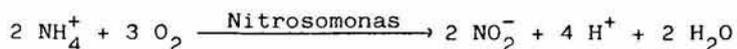


3.2.4. NITRIFICACION

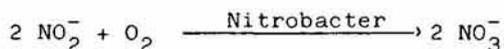
Para incorporar nitrógeno a su biomasa, los vegetales requieren como fuente del mismo al amoniacos, el cual puede asimilarse directamente del ambiente. Sin embargo se ha encontrado

que el amoníaco, el cual debería ser muy abundante como producto de la amonificación, es relativamente escaso. Esto se debe a la presencia de un grupo de bacterias aerobias quimioautotróficas muy activas que oxidan casi instantáneamente el amoníaco disponible a su alrededor, a nitritos y posteriormente a nitratos (Prakasam, 1972 y 1974; Conn, 1978).

De manera general, las bacterias del género Nitrosomonas son las responsables de convertir el amoníaco a nitritos mediante un proceso de oxidación:



En el siguiente paso, la reacción es catalizada también en condiciones aerobias por otra bacteria del género Nitrobacter, convirtiendo los nitritos formados por Nitrosomonas a nitratos (Sharma, 1977; Christtensen, 1978):



De manera que la reacción total para expresar la nitrificación es (Huang, 1974; Lehninger, 1979):

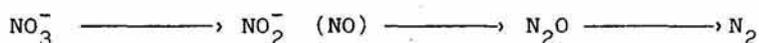


3.2.5. DESNITRIFICACION

La desnitrificación es un proceso importante en términos ecológicos y geoquímicos, ya que es la ruta de formación de casi todo en nitrógeno atmosférico (N_2). Desde el punto de vista antropogénico la desnitrificación es responsable de grandes pérdidas de fertilizante nitrogenado de campos de cultivo.

Por medio de este proceso se reduce el contenido de nitrógeno fijado en los efluentes de plantas de tratamiento y por lo tanto se reducen los peligros de eutrofización de los cuerpos receptores de agua (Delwiche, 1970).

La desnitrificación es usualmente definida como la reducción del nitrato a nitrito, a amoníaco y finalmente a compuestos gaseosos del nitrógeno (N_2 , N_2O).



A diferencia de la flora nitrificante, constituida por un número restringido de microorganismos quimiolitótrofos muy especializados, la flora nitrato-reductora comprende numerosos organismos heterótrofos, por ejemplo: Pseudomonas denitrificans, Clostridium sp., Escherichia coli, Actinomyces sp., Klebsiella sp., Proteus sp., Bacillus sp., Thiobacillus sp., etc.

La finalidad biológica de la desnitrificación es la generación de ATP a través de la respiración anaerobia. Los nitratos sirven como los aceptores terminales de electrones en

una cadena de transporte electrónico. Después de la reducción del nitrato, otros óxidos nitrogenados son generados y sirven también como aceptores terminales de electrones. Así, la desnitrificación es una cascada de procesos de respiración anaerobia, por los cuales el nitrato es reducido a nitrógeno gaseoso (Mortimer, 1981).

3.3 IMPACTO AMBIENTAL POR DESCARGAS DE MATERIALES NITROGENADOS EN SISTEMAS ACUATICOS

Cuando los compuestos nitrogenados domésticos generados por una población deben ser desechados, la manera más fácil de lograrlo es descargándolos a ríos, lagos o al mar, lo cual produce gran desequilibrio por sus nocivos efectos. De éstos, la bioestimulación o eutrofización es el aspecto más impactante que se considera del caso. La lista de los efectos negativos de un exceso de compuestos nitrogenados en el agua es la siguiente:

- Eutrofización
- Toxicidad para la vida acuática
- Incremento en la demanda bioquímica de oxígeno
- Peligro para la salud pública
- Disminución en la efectividad de la desinfección por cloro

3.3.1. EUTROFIZACION

En los sistemas acuáticos, cuando se incrementa la entrada de material alóctono, como son el nitrógeno y el fósforo (nutrientes inorgánicos), se crean condiciones que alteran

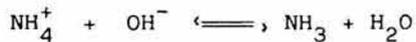
el equilibrio entre las relaciones químicas físicas y biológicas, las que controlan el crecimiento de poblaciones microbianas, vegetales y animales (Margalef, 1977). Este fenómeno ha sido favorecido por el hombre y se ha llamado eutrofización, y se subdivide en eutrofización cultural y eutrofización natural. La primera es de carácter reversible y sus principales fuentes son los efluentes de aguas negras municipales con tratamiento primario o sin tratamiento y fuentes agrícolas y ganaderas. La segunda es irreversible, ya que sobreviene como una fase natural en la maduración-envejecimiento de los cuerpos de agua que se azolvan por el acúmulo de sedimento, lo cual acorta el eje luz-gravedad que tiende a separar la luz de los nutrientes (Vilaclara, com.pers.). Estas alteraciones provocan el incremento de algas planctónicas, hierbas acuáticas y algas filamentosas entre otras, dando como consecuencia el deterioro en la calidad del agua a través de la disminución de oxígeno en el fondo generado por un exceso de materia orgánica acumulada, produciendo la muerte de peces, además de favorecer el establecimiento de nuevas especies adaptadas a las nuevas condiciones del sistema (especies generalmente menos apreciadas desde el punto de vista antropogénico) y por último la desaparición del mismo por acúmulo de materia orgánica en el fondo (Vallentyne, 1978).

3.3.2. TOXICIDAD PARA LA VIDA ACUATICA

El principal problema que presentan los compuestos nitrogenados en el agua se refiere al amoníaco (NH_3) en forma

molecular. En condiciones normales los materiales orgánicos que contienen nitrógeno (p.ej. proteínas, ácidos nucleicos, etc.) se descomponen hasta formar amoniaco ionizado (NH_4^+ o amonio). Este producto puede ser asimilado por muchos organismos, vegetales o bacterias para la síntesis de sus propias proteínas, o como fuente de energía; en el caso de peces, moluscos u otros organismos superiores este amonio (NH_4^+) es relativamente inocuo. Sin embargo, cuando en el ambiente acuático se incrementa aunque sea muy levemente el pH, el amonio inocuo se transforma an amoniaco molecular (NH_3), que produce toxicidad en muchos organismos (EPA, 1975).

La ecuación que ilustra este fenómeno es la siguiente:



Algunos otros factores tales como el aumento en la concentración de oxígeno disuelto y bióxido de carbono, temperaturas elevadas y la alcalinidad pueden agudizar la toxicidad del amoniaco para los organismos.

Normalmente los vegetales son capaces de absorber con facilidad el amoniaco del medio circundante para incorporarlo a su soma. Sin embargo, muchas bacterias como las nitrificantes son inhibidas por altas concentraciones de amoniaco molecular y en el caso de organismos superiores como los peces, este tóxico actúa a nivel del sistema nervioso central provocando la muerte (Sharma, 1977).

3.3.3. INCREMENTO EN LA DEMANDA BIOQUIMICA DE OXIGENO

Cuando los materiales de desecho tales como el amonio se encuentran en un sistema acuático aerado, algunos organismos se encargan de transformar por medio de oxidaciones biológicas el amonio a la forma de nitritos y posteriormente a la forma de nitratos. En este proceso se produce una demanda bioquímica de oxígeno (DBO) considerable que depende en gran medida de la cantidad de sustrato oxidable en el ambiente. Cuando la materia orgánica aumenta, la DBO aumenta. El valor de la DBO no es una medida absoluta, es una prueba cualitativa con un ámbito de variación estrecho que permite asumir proporciones semicuantitativas (Parker, 1975), sin embargo, refleja el grado en que el oxígeno del medio es consumido biológicamente. Esto tiene importancia, puesto que todas las especies de animales acuáticos tienen un nivel mínimo de oxígeno disuelto que requieren para su supervivencia en un período específico de tiempo. Cuando encontramos valores altos en la DBO, habrá una tendencia de los microorganismos anaerobios a predominar, mientras que los aerobios incluyendo bacterias y peces se enfrentarán con serios problemas por falta de oxígeno para la respiración.

3.3.4. PELIGRO EN LA SALUD PUBLICA

El peligro real del nitrógeno para la salud pública está asociado con su forma nitrato (NO_3^-). Se sabe que el excesivo contenido de nitratos en el agua potable puede causar la enfermedad llamada "metahemoglobinemia", que es fatal en muchos casos. La metahemoglobinemia es un desorden sanguíneo que

aparece en niños menores de tres meses cuando su alimento es preparado con agua que contiene una alta cantidad de nitratos.

Durante la digestión, los nitratos ingeridos son reducidos a nitritos, los cuales reaccionan con la hemoglobina de la sangre para formar la metahemoglobina, que a su vez es incapaz de captar oxígeno para transportarlo a las diferentes regiones corporales donde es requerido. Como resultado de esto hay sofocación acompañada de una tinción azulosa en la piel, hecho determinante para la denominación de "bebés azules" a los infantes que presentan la metahemoglobinemia. En casos severos ocurre la muerte (EPA, 1975).

El estándar primario dado por la Environmental Protection Agency (op.cit.) para el agua potable con referencia a su contenido de nitratos es de 10 mg/l como nitrógeno. Sin embargo, este estándar es superado en el agua de áreas rurales, incluso el APHA (1962, en Deming, 1979) reporta como aceptable un máximo de 45 ppm de NO_3^- en agua de consumo doméstico, debido a las infiltraciones de aguas de desecho hacia los arroyos subterráneos que son aprovechados para beber (Morris, 1978).

3.3.5. DISMINUCION DE LA EFECTIVIDAD DE LA DESINFECION POR CLORO

Otro problema asociado con salud pública es el hecho de que el amoníaco presente en el agua, al contacto con el cloro utilizado para la desinfección, reacciona para formar cloraminas, lo cual reduce notablemente la actividad germicida del cloro, permitiendo que permanezcan en el agua potable concen-

traciones de microorganismos potencialmente patógenos (White, 1978).

3.4. ESTANQUES DE ESTABILIZACION

La nitrificación como un proceso biológico natural se puede llevar a cabo en casi cualquier ecosistema, con la condición de que se encuentren los organismos nitrificantes y concentraciones adecuadas de oxígeno para efectuar el proceso.

En este punto es importante hacer hincapié que la nitrificación ha sido manipulada de manera práctica para beneficio del hombre, principalmente en sistemas de tratamiento de aguas residuales como lo son los estanques de estabilización (EPA, 1975).

Mucho se ha hablado sobre el mecanismo de operación y las ventajas de estos estanques; sin embargo, el hecho de que el hombre aproveche la nitrificación como uno de los mecanismos para depurar el agua residual dentro de estos sistemas, justifica el recapitular algunos aspectos importantes sobre los sistemas de tratamiento de aguas de desecho.

3.4.1. IMPORTANCIA

Uno de los problemas más serios a los que nos enfrentamos es el que corresponde al suministro adecuado de agua, necesario para sostener los requerimientos mínimos tanto para la ciudad como para el campo. Para el caso no solo de México sino de muchas otras partes del mundo, en el enfrentamiento de estos dos sectores se da una tendencia favorecedora para las ciudades; sin embargo, es lógico pensar que el campo no puede quedar en

desventaja bajo ninguna circunstancia, ya que la subsistencia de los seres humanos depende de los cuidados que se le brinden.

El uso del agua de desecho doméstico es una de las alternativas que se utilizan en el campo para solventar sus necesidades de líquido; sin embargo, cuando es utilizada de esta manera (cruda), ocurren severos problemas de salud pública, bacterias, protozoarios, virus y algunos macroinvertebrados patógenos pueden provocar verdaderas epidemias si no son removidos antes de que estas aguas sean utilizadas para riego.

Este es tan sólo uno de los muchos aspectos que justifican la importancia de los sistemas de tratamiento de aguas residuales, destacándose dentro de estos sistemas los estanques de estabilización, ya que son el método más económico para el tratamiento de aguas de desecho municipales sobre todo en áreas rurales y en pequeñas comunidades donde el costo de la tierra no es excesivo (Fritz, 1979).

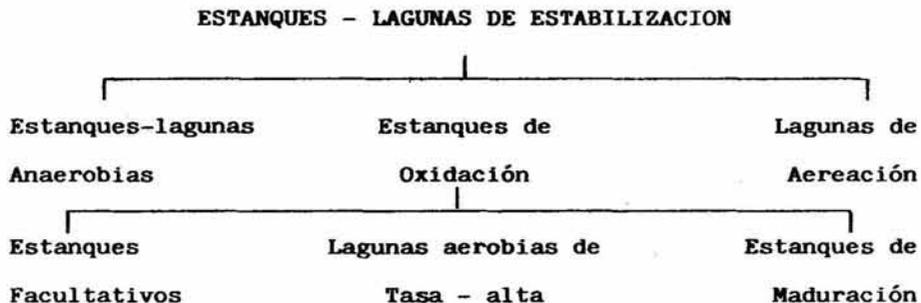
En la actualidad existe un florecimiento en el desarrollo y construcción de estanques de estabilización. La explicación es que estos sistemas son altamente efectivos para transformar la materia orgánica que reciben, además de que no requieren de personal especializado para su mantenimiento (Hernández, 1982).

Los estanques de estabilización son cuerpos de agua residual creados por el hombre a fin de degradar biológicamente la materia orgánica por medio del comensalismo entre bacterias y algas. Aunque también existen otros organismos como los

hongos filamentosos, protozoarios y algunos macroinvertebrados (Gloyna, 1973).

La composición biológica de los estanques depende de muchos factores, entre otros, de la habilidad de los organismos para adaptarse y transformar la energía disponible. El suministro de energía química contenida en desechos y la energía solar, constituyen un medio apropiado para el desarrollo de estos organismos (Limón, 1978).

Por su naturaleza los estanques pueden ser de varios tipos. La clasificación de los estanques utilizados para el tratamiento de desechos por oxidación biológica pueden ser resumidos de la siguiente manera (Hawkes, 1983):



3.4.2. ESTANQUES ANAEROBIOS-LAGUNAS ANAEROBIAS

Estos son estanques de estabilización de desechos en los cuales el proceso biológico de purificación es predominantemente anaerobio (Hawkes, 1983). Estos cuerpos de agua son ventajosamente usados para pretratar desechos que contienen una alta

concentración de sólidos (Mara, 1978).

Es deseable que las aguas de desecho tengan ciertas características si van a ser sometidas a tratamiento anaerobio; esas características pueden ser: carga orgánica alta, particularmente en proteínas y grasas más que azúcares, suficientes nutrientes biológicos inorgánicos, alcalinidad media (debida principalmente a bicarbonatos), ausencia de sustancias tóxicas y temperatura relativamente alta. Algunos desechos industriales vertidos al agua, tales como los productos del procesamiento de la carne tienen esas características. Un ejemplo de esto es el agua que libera una empacadora típica, en la que podemos encontrar una DBO de 1400 mg/l, un contenido de grasa de 500 mg/l, un pH cercano a 7 y una temperatura de 27 °C (Clark, 1977). Sin embargo, las aguas de desecho domésticas presentan DBO mucho más bajas, en el ámbito de 100 a 300 mg/l (Gloyna, 1973).

Las remociones de materia orgánica y organismos patógenos en estos sistemas son bajas (menores del 70%); el tiempo óptimo de retención del líquido es de 5 días y se construyen con profundidades mayores de 2.5 m.

En la mayoría de los casos estos procesos anteceden a una laguna de estabilización facultativa (Hernández, 1982).

3.4.3. ESTANQUES DE OXIDACION

Aunque este término es usado algunas veces como sinónimo de estanques de estabilización de desechos, es mejor y más frecuentemente aplicado a estanques donde el proceso de

purificación aerobia es estimulado y el oxígeno necesario está dado principalmente por la actividad fotosintética de las algas. Con esta definición se pueden reconocer varios tipos de estanques (Hawkes, 1983).

3.4.3.1. ESTANQUES FACULTATIVOS

Este tipo de estanques muestra 3 grandes zonas (Fig.1); la superficial aerobia, debido a que la luz penetra (zona eufótica) y permite el desarrollo de organismos fotosintéticos que disuelven su producción de oxígeno en el agua; la zona intermedia que contiene bacterias facultativas capaces de metabolizar productos en presencia de bajas cantidades de oxígeno y aun en ausencia total de este gas. Por último tenemos la zona profunda o de fangos, que es totalmente anaerobia pero que responde a un proceso de purificación muy activo dado por bacterias. Actualmente este tipo de estanques facultativos son los que tienen mayor demanda por tratar las aguas residuales crudas, debido a su gran eficiencia y bajo costo de mantenimiento (Gloyna, 1973; Hawkes, 1983).

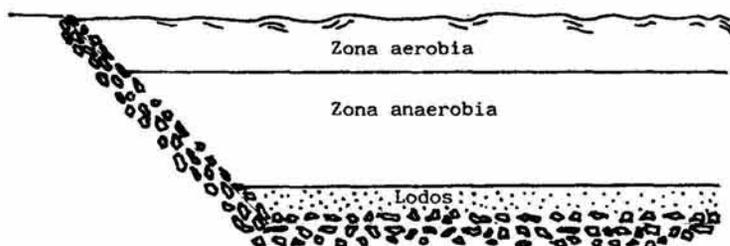


Fig. 1 Estanque facultativo.

3.4.3.2. LAGUNAS AEROBIAS DE ALTA-TASA

Estos sistemas son cuerpos de agua muy superficiales en los cuales el total del agua es mantenida en condiciones aerobias por la presencia de una gran cantidad de algas y mezclado mecánico (Hawkes, 1983). El contenido de estas lagunas necesita ser mezclado una o dos veces al día para resuspender cualquier sólido sedimentado, también es importante remover la masa algal al final del efluente. Estas lagunas son muy eficientes, pero tienen la desventaja de necesitar personal bien entrenado para operar y mantener el sistema, además de que su costo de operación es muy elevado (Mara, 1978).

3.4.3.3. ESTANQUES DE MADURACION

Son cuerpos de agua utilizados para producir un efluente de alta calidad (Gloyna, 1973). La función principal de estos estanques es la destrucción de patógenos como bacterias y virus, y aun quistes de parásitos intestinales (Mara, 1978). El agua que debe de llegar a estos estanques debe de haber recibido previamente un tratamiento secundario, es decir que sus valores de DQO y DBO deben ser bajos, p.ej. DBO_5 menores de 25 g/m^3 (Hernández, 1982).

La eficiencia de los estanques de maduración se basa fundamentalmente en los tiempos de retención necesarios para que la reducción de bacterias fecales sea efectiva; el tiempo para que esto se lleve a cabo de manera real en un estanque promedio de 1.0 a 1.5 m de profundidad es de 7-10 días (Gloyna, 1973; Hernández, 1982). Una condición a estos sistemas es que

deben ser totalmente aerobios. Se calcula que la efectividad de estos sistemas para remover patógenos tales como coliformes fecales, trabajando en condiciones óptimas es de 99.99 % (Mara, 1978).

3.4.4. LAGUNAS DE AEREACION

Son estanques de estabilización para el tratamiento de aguas residuales y desechos orgánicos en los cuales el oxígeno requerido para los procesos de oxidación de la materia está dado por medio de aereadores superficiales o burbujeadores mecánicos, y no dependen de la actividad fotosintética natural de las algas para obtener este oxígeno (Hawkes, 1983). Este proceso permite tener un balance de oxígeno constante y ayuda a eliminar malos olores en uno o más estanques conectados a éste (Gloyna, 1973). Las lagunas de aereación alcanzan porcentajes de remoción de DBO_5 de más del 90 % pero precisan de tratar estas aguas en otro paso posterior para eliminar bacterias fecales (Mara, 1978).

3.5 DESCOMPOSICION DE LA MATERIA ORGANICA

A pesar de que la clasificación de los sistemas para el tratamiento de aguas residuales es muy amplia, los procesos bioquímicos que ocurren para que la materia orgánica se degrade pueden dividirse en dos grandes grupos:

- PROCESO AEROBIO
- PROCESO ANAEROBIO

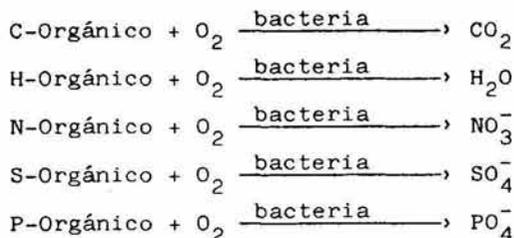
En los dos grupos ocurren una serie de reacciones bioquímicas capaces de descomponer la materia orgánica en di-

ferentes grados, dependiendo del tipo de tratamiento a que se sometan las aguas residuales.

En el proceso aerobio, el agua que se está tratando requiere de un aporte continuo de oxígeno disuelto libre que asegure la oxidación completa de los residuos líquidos diluidos en el medio (Gloyna, 1973). Este método es el más eficiente para reducir el contenido orgánico de los desechos líquidos por tratamiento biológico (Simpson, 1960). Sin embargo, cuando las descargas contienen muchos sólidos o la concentración de residuos es alta, como en el caso de la materia orgánica sólida sedimentada procedente de aguas domésticas, fangos de pozos negros o residuos de mataderos, el proceso anaerobio resulta extraordinariamente más efectivo que el proceso aerobio (Gloyna, 1960; Simpson, 1960).

3.5.1. PROCESO AEROBIO

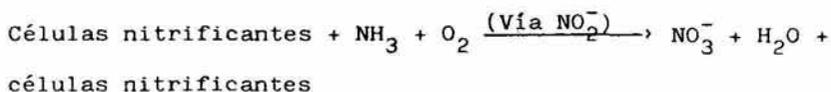
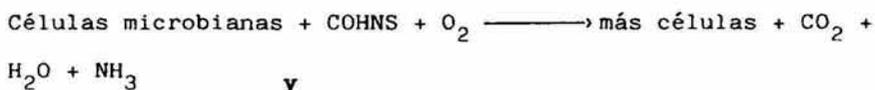
Es un mecanismo biológico mediado principalmente por bacterias, aunque hongos y protozoarios juegan un papel secundario, en el cual ocurre una conversión de elementos desde una forma orgánica a su forma inorgánica más oxidada, proceso conocido como mineralización (Mara, 1978), el ejemplo de esto es:



Las bacterias oxidan los desechos para producir cierta cantidad de energía que ellas mismas utilizan en la producción de moléculas complejas tales como proteínas y polisacáridos necesarios para su metabolismo, y aún en la construcción de nuevas células durante la reproducción (Fair, 1986). El carbono orgánico así como otros elementos orgánicos son utilizados por los microorganismos para llevar a cabo la respiración y proveerse de energía suficiente para vivir (Limón, 1979).

El oxígeno debe ser suministrado continuamente durante el proceso aerobio. Esto es necesario porque el oxígeno actúa como el aceptor final de electrones en la oxidación de la materia orgánica (Simpson, 1960).

Simpson (1960) describe de manera muy general una serie de reacciones que probablemente ocurren en los estanques de estabilización aerobios, mencionando que si la materia orgánica pudiera ser representada en el siguiente orden: C O H N S - que es el orden de abundancia de los elementos en sistemas biológicos- las reacciones totales durante el tratamiento aerobio serán las siguientes:



El aporte del oxígeno suministrado puede tener diferente origen, ya sea por intercambio atmosférico, por aereadores mecánicos o bien por microorganismos fotosintéticos (Limón, 1979). La cantidad de oxígeno requerido para oxidar la materia orgánica contenida en un estanque, depende de la concentración de esta última, si la concentración de oxígeno disuelto en el agua es menor de $1\text{mg}/1$, la descomposición bioquímica de la materia orgánica sigue un camino diferente.

En este punto es importante considerar que la nitrificación es parte de los procesos estrictamente aerobios de los cuales hemos hablado.

3.5.2. PROCESO ANAEROBIO

El metabolismo anaerobio es un proceso en el cual el oxígeno no juega parte ni como aceptor terminal de electrones, ni como sustrato para las reacciones de oxigenación.

En una gran variedad de hábitats existe continua o intermitentemente una ausencia total de oxígeno (Gaudy, 1981).

Este mecanismo anaerobio es capaz de convertir la materia orgánica a metano y bióxido de carbono. Generalmente este proceso es utilizado para la purificación de agua que contiene una alta cantidad de desechos orgánicos, como las aguas residuales domésticas y los efluentes de algunas industrias, como las empacadoras de alimentos (Kotzé, 1969).

Los desechos sólidos son degradados en dos fases por grupos de bacterias anaerobias (Gloyne, 1973; Mara, 1978). En la primera fase, un grupo de bacterias heterótrofas facul-

Un aspecto importante a ser tomado en cuenta es que las bacterias heterótrofas facultativas (las productoras de ácido), se reproducen mucho más rápido que las bacterias productoras de metano. Por ello, en los estanques anaerobios manejados por el hombre se debe asegurar que exista una población abundante de bacterias metanogénicas, ya que sin ellas los desechos simplemente entrarán en putrefacción con los consucuentes problemas de malos olores y una pobre remoción de materia orgánica (Mara, 1978).

3.6. BIOLOGIA DE LOS ESTANQUES DE ESTABILIZACION

La composición biológica de los estanques de estabilización es altamente variada y depende de la habilidad de los organismos para adaptarse y transformar la energía disponible. En casi cualquier ambiente la energía disponible más abundante es la energía solar y la energía química. En la naturaleza los grupos de organismos con mayor capacidad para aprovecharlas en condiciones normales o extremas son las bacterias y las algas, poblaciones que llegan a ser dominantes en los ecosistemas acuáticos, como en los estanques de estabilización de aguas residuales (Limón, 1979). Sin embargo, aunque ocupan un papel secundario, la actividad de los protozoarios, hongos y algunos macroorganismos como rotíferos, crustáceos e insectos forman parte integral del proceso en sus diferentes etapas de tratamiento.

La presencia o ausencia de organismos en un estanque de estabilización está regida por las altamente variables ca-

racterísticas del ambiente, y dependen de varios factores:

i) Tipo de estanque de estabilización

Facultativo

Aerobio

Anaerobio

De maduración

ii) La posición que ocupe un estanque en particular dentro de un sistema de estanques.

iii) El ambiente dentro de un mismo estanque puede ser muy heterogéneo si el hombre no hace una mezcla mecánica del agua, por lo tanto las condiciones en el fondo y cerca de él, pueden ser diferentes a las de la superficie en oxígeno, luz o nutrientes.

Los microorganismos y otros organismos están involucrados en muchos segmentos del tratamiento de aguas residuales, el éxito del tratamiento depende del control en el funcionamiento de los microorganismos (Parker, 1975). Esto puede hacerse guiando las propiedades fisicoquímicas del sistema al grado de que se permita que algunos organismos se desarrollen más que otros cuando así se requiera.

La mayoría de los microorganismos son benéficos para el hombre, sin embargo, existen los que requieren de tejido vivo para poder vivir o los que liberan toxinas potentes, ellos son llamados patógenos. Es de comprenderse que el control de su presencia deba ser muy eficiente en el efluente al final del tratamiento (Mara, 1978), sobre todo si el agua va a ser utili-

zada como recurso para riego agrícola o uso recreativo.

La composición biológica de un estanque es muy compleja, sin embargo, como ya se ha mencionado antes, las poblaciones bacteriana y algal son las predominantes en estos ecosistemas.

3.6.1. BACTERIAS

La mayoría de las bacterias son microorganismos no fotosintéticos, organismos unicelulares que se multiplican por fisión binaria en dos células hijas. La forma y el tamaño de las bacterias son muy variadas, aunque los bacilos como las llamadas enterobacterias son predominantes en las aguas de desecho. Casi todas ellas obtienen su energía de la oxidación de los compuestos orgánicos, pero existen algunas capaces de utilizar compuestos inorgánicos. El carbono de los compuestos orgánicos lo incorporan las bacterias a su soma para producir nuevas células durante la reproducción, aunque otro grupo de bacterias utiliza una fuente inorgánica de carbono (p.ej. bióxido de carbono) para este mismo propósito.

Un factor ambiental importante para las bacterias lo constituye la concentración de oxígeno en el medio. Esto no significa que el oxígeno sea esencial para la respiración bacteriana en general. Algunas bacterias como los son las "aerobias obligadas" requieren necesariamente la presencia de oxígeno en su ambiente para poder llevar a cabo sus funciones y si son privadas de aire detienen su metabolismo y mueren. Otras por el contrario viven en ambientes completamente anóxicos ya

que el oxígeno representa un veneno para su desarrollo, estas bacterias son llamadas "anaerobias obligadas", bajo estas condiciones microcantidades de oxígeno en su ambiente pueden ser letales para estos organismos.

Sin embargo, la mayoría de las bacterias tienen la capacidad para vivir en ambientes extremos de presencia o total ausencia de oxígeno. Si hay oxígeno, este es captado para llevar a cabo los procesos normales de oxidación de materiales que se procesan durante el metabolismo; pero si falta, las bacterias no mueren sino que son capaces de sustituir al oxígeno como aceptor de electrones por otros compuestos disueltos en el medio, estas bacterias se conocen como "facultativas".

De las bacterias que se encuentran en los estanques de estabilización hay mucha literatura, de ello sólo diremos que las de mayor importancia en sistemas de tratamiento son los bacilos facultativos ya que tienen gran capacidad para oxidar la materia muerta y crecer abundantemente en condiciones ambientales extremas. Otro grupo de bacterias muy abundantes son las coliformes, las cuales aunque no juegan un papel importante en el proceso de tratamiento (tan sólo están de paso en el sistema), sí son buenos indicadores del nivel de purificación de las aguas residuales.

3.6.2. ALGAS

Las algas son un factor de prima importancia en los estanques de estabilización. Ellas condicionan en gran medida el comportamiento ecológico de estos cuerpos de agua. Limón

(1979) describe algunas interacciones que las algas tienen con el medio:

- i) De las algas depende que exista suficiente oxígeno disuelto en el agua para que las bacterias lo puedan utilizar en la degradación de la materia orgánica.
La producción de oxígeno de las algas está mediada por la fotosíntesis, esto significa la necesidad de bióxido de carbono que de manera general es aportado por las bacterias, produciendo una estrecha relación simbiótica entre estos dos grupos de microorganismos.
- ii) Como todo ser vivo, las algas tienen requerimientos nutricionales, y aunque son autótrofos, esto es, no necesitan de fuentes externas para alimentarse, sí utilizan ciertos compuestos inorgánicos para llevar a cabo sus funciones. Los principales compuestos que toman del medio son el amonio y los fosfatos entre otros, al hacerlo se reduce la concentración de estos nutrientes inorgánicos en el agua, contribuyendo a purificar el sistema.
- iii) La consistencia de las características fisicoquímicas con respecto a los ambientes acuáticos pueden ser alteradas por el metabolismo o la concentración de las algas.

3.6.3. PROTOZOARIOS Y HONGOS

Los protozoarios son organismos unicelulares muy activos con un aparato digestivo muy desarrollado que los capacita para usar formas de alimento sólido.

En los cuerpos de agua residual la presencia de cier-

tos grupos de protozoarios está determinada por el tipo de desechos y la disponibilidad de alimento en el agua.

A los protozoarios que viven en las aguas residuales los podemos dividir en tres grandes grupos, amibas, ciliados y flagelados (Mara, 1978). Las amibas y los flagelados no son muy importantes en el tratamiento de las aguas residuales, excepto desde el punto de vista médico por la importancia que tienen las amibas patógenas como Entamoeba histolytica productora de la disentería amibiana (amibiasis).

Por otra parte el grupo de los ciliados, dado que aparecen en gran número (1 000 a 10 000 organismos por ml aproximadamente) y son consumidores de bacterias muy activos, pueden ser considerados como participantes notables en la purificación de las aguas residuales.

En lo que se refiere a los hongos, estos no se consideran de mucha importancia en los estanques de tratamiento, su presencia se limita a una permanencia casi latente en dichos sistemas. Se ha sugerido que el elevado pH al que trabajan los sistemas de tratamiento restringen el crecimiento de los hongos y su actividad puede volverse notable sólo en ciertos sistemas que trabajan en niveles de pH bajos.

3.7. NITRIFICACION Y DESNITRIFICACION COMO METODO PARA LA REMOCION DE NITROGENO EN LAS AGUAS DE DESECHO

Ya hemos mencionado que la presencia del Nitrógeno en sus diferentes formas puede causar serios trastornos en las

aguas receptoras. De esos problemas, tres son los de mayor impacto (Kiff, 1972).

3.7.1. DEMANDA DE OXIGENO

Uno de los primeros pasos en la descomposición de la materia orgánica, es la transformación de los compuestos nitrogenados en amoníaco. Durante la Nitrificación este amoníaco es oxidado por bacterias nitrificantes utilizando el oxígeno del medio, provocando con ello la disminución del oxígeno disuelto en el agua. Si la cantidad de amoníaco en el agua es alta, y la disponibilidad de oxígeno es baja, el amoníaco tenderá a acumularse en el medio.

3.7.2. TOXICIDAD DEL AMONIACO

El amoníaco se forma por la hidrólisis de la mayoría de los aminoácidos, este amoníaco se considera como un nutriente esencial para muchos microorganismos por ser un promotor benéfico para el crecimiento de la biomasa (Brockett, 1977). Sin embargo, a ciertas concentraciones y para algunos organismos el amoníaco tanto en su forma libre (NH_3) como en su forma ionizada (NH_4^+) (Sharma, 1977) puede ser altamente tóxico al penetrar la membrana celular e inhibir algunos procesos metabólicos.

Las concentraciones que se consideran tóxicas son altamente variables según los investigadores dependiendo del tipo de organismo y de las condiciones del experimento, pero se encuentran en el ámbito de 0.29-3.0 mg/l de Nitrógeno en forma de amoníaco, no obstante esta toxicidad se puede ver aumentada por niveles bajos de oxígeno (Kiff, 1972).

3.7.3. NUTRIENTE DE ENRIQUECIMIENTO

El incremento en el contenido de nitrógeno de los desechos que se vierten a las aguas nos conduce a problemas asociados con el sobrecrecimiento de plantas acuáticas y sobre todo de algas (Kiff, 1972). Diversos estudios (Prakasam, 1974; Brown, 1975; van Kessel, 1977; Eggers, 1979) han demostrado que aunque el nitrógeno no es un factor totalmente limitante, su remoción del agua minimiza sensiblemente el crecimiento de algas y otras macrofitas acuáticas.

Este problema de eutrofización es más aparente en los lagos, presas y casi cualquier cuerpo de agua que tienda a ser más o menos inmóvil.

Las formas del nitrógeno que aparecen como contaminantes del agua son los nitritos y las sales de amoníaco. La mayoría de los organismos con características vegetales son capaces de aprovechar estas sustancias en favor de su crecimiento.

Estos tres aspectos justifican el que en la actualidad se hagan grandes esfuerzos para remover el nitrógeno del agua.

La cantidad de nitrógeno en sus diferentes formas en el agua puede variar dependiendo del uso que se le vaya a dar. Sin embargo, el promedio ideal de remoción de nitrógeno para el efluente en un sistema de tratamiento de agua residual es de aproximadamente el 90 % (Kiff, 1972).

3.7.4. METODOS DE ELIMINACION DE NITROGENO

Existen esencialmente dos tipos de procesos para eli-

minar el nitrógeno de las aguas de desecho: uno es el físico-químico, el cual involucra varias técnicas, como la del desplazamiento por aire, el intercambio iónico, la electrólisis, electrodiálisis, ósmosis inversa, destilación, etc. (Ehreth, 1974; Becker, 1979; Beccari, 1979; Heidman, 1979); el otro proceso es el biológico, que involucra principalmente al sistema nitrificación-desnitrificación.

La remoción biológica de los compuestos nitrogenados son el resultado de la síntesis celular de algunos microorganismos muy especializados (Mc Carty, 1971; Kiff, 1972; Ehreth, 1974; EPA, 1975; Wetzel, 1975; Hutchinson, 1975; Billen, 1976; Sharma, 1977; Focht, 1977; Kessel, 1978; Somville, 1978; Wong-Chong, 1978; Wood, 1981). En el primer paso (nitrificación), el amoníaco es sustancialmente oxidado a nitrato por acción bacteriana y la formación de nitratos asegura el paso del nitrógeno a la siguiente fase del proceso (desnitrificación).

La desnitrificación biológica es un proceso microbiano en el cual los nitratos y los nitritos son reducidos a nitrógeno molecular (Kiff, 1972; Ehreth, 1974; EPA, 1975; Heidman, 1979) debido a que la acción de los microorganismos, aquí llamados desnitrificantes, utilizan las formas oxidadas del nitrógeno (en forma de nitritos y nitratos) como aceptores terminales de electrones, liberando de esta manera gas nitrógeno (N_2), que y a no es utilizado por ellos en su metabolismo.

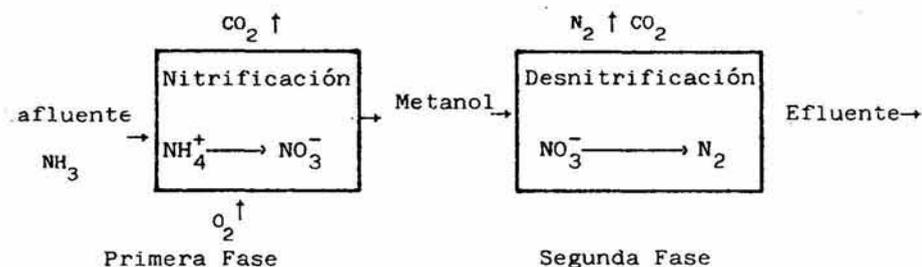
Se debe de considerar que la desnitrificación ha de llevarse a cabo en condiciones anaerobias para que los reque-

rimientos de oxígeno de los microorganismos desnitrificantes sean satisfechos por los compuestos oxidados de nitrógeno. Otra consideración importante ha tomarse en cuenta es la que durante la nitrificación el carbono presente en el medio es eliminado en una gran proporción y en la desnitrificación los microorganismos requieren también una fuente de carbono para sus procesos metabólicos. En condiciones naturales, esta fuente de carbono puede tener como origen carbohidratos y proteínas, pero en condiciones de laboratorio y con fines operacionales en plantas de tratamiento, el carbono es suministrado como metanol (Savage, 1975; Heidman, 1979) e incluso como ácido acético, etanol, acetona y azúcar (Mc Carty, 1969).

De esta manera podemos expresar la desnitrificación de la siguiente manera (Johnson, 1971; Ehreth, 1974; Savage, 1975):



o de manera esquemática:



3.8 NITRIFICACION

La nitrificación es un proceso biológico casi universal que depende de un delicado equilibrio entre las poblaciones bacterianas y los factores del medio ambiente. Este proceso ocurre también en la mayoría de las plantas aerobias para el tratamiento de las aguas residuales (Sharma, 1977).

La nitrificación puede definirse como el mecanismo de oxidación secuencial del amoniaco a nitrito y posteriormente a nitrato. Este proceso es llevado a cabo por poblaciones bacterianas autótrofas en las que se involucran principalmente dos géneros de bacterias, que son Nitrosomonas y Nitrobacter (Painter, 1970; EPA, 1975; Sharma, 1977; Kelly, 1981).

Estos organismos son quimiolitótrofos, es decir, obtienen su energía para la respiración de la oxidación de sustancias inorgánicas reducidas, y el carbono para el crecimiento celular lo obtienen del CO_2 .

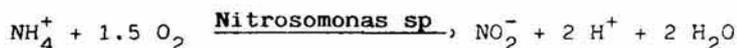
Se ha propuesto, y en algunos casos se ha demostrado, que la nitrificación la pueden llevar a cabo otros organismos diferentes a los antes mencionados. Especies heterótrofas tales como Aspergillus y Arthrobacter pueden nitrificar, aunque hasta ahora no se ha podido comprobar que estos organismos contribuyan significativamente a la nitrificación en la naturaleza (Sharma, 1977).

3.8.1. BACTERIAS NITRIFICANTES

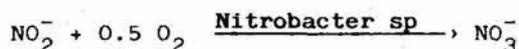
La oxidación biológica del amoniaco ionizado (NH_4) a nitrito (NO_2^-) es llevada a cabo por un limitado grupo de nitro-

bacterias estrictamente aerobias representadas especialmente por Nitrosomonas sp. De igual manera la conversión del nitrito (NO_2^-) a nitrato (NO_3^-) se realiza principalmente por la intervención fisiológica de Nitrobacter sp (Aguirre, 1967; Wallace, 1969; Painter, 1970; Mc Carty, 1971; Srinath, 1974; EPA, 1975; Sharma, 1977; Gottschalk, 1979; Watson, 1981).

Reacción 1.-



Reacción 2.-



Con excepción de algunas cepas de Nitrobacter, las cuales pueden crecer quimioheterotróficamente, todas las demás bacterias nitrificantes son autótrofas obligadas y son incapaces de oxidar otros sustratos que no sean amoníaco o nitrito (Lees, 1952; Engel, 1958; Hooper, 1969; Mc Carty, 1971).

Hábitat de las bacterias nitrificantes:

Las bacterias nitrificantes se encuentran en casi cualquier hábitat (Watson, 1981); en el suelo, agua dulce o de mar, pilas de composta y, por supuesto, en sistemas de tratamiento de aguas residuales, aunque no son aparentes a menos de que exista una concentración adecuada de oxígeno, que va de ≈ 0.5 mg/l hasta el punto de saturación del oxígeno en el agua (según Painter & Jones, 1963).

De manera general, estos microorganismos crecen bien a temperaturas entre 25 y 30 °C, pH más bien alcalino de 7.5 a 8.0, tensión de oxígeno media y concentraciones de sustrato que van de 1 a 25 mM. Sin embargo, en condiciones ambientales extremas como las que pueden presentar los sistemas de tratamiento de agua de desecho, las bacterias nitrificantes pueden seguir nitrificando, aunque, como lo veremos más adelante, lo hacen de manera tan limitada como las condiciones del medio lo permitan. Como ejemplo de ello, podemos mencionar que se han encontrado organismos nitrificantes en tanques de aguas residuales en condiciones de oxígeno muy bajas, a pH tan ácido como 4, aunque no se desarrollaron a menos de pH 6 ni a las temperaturas extremas de 8°C y 42°C (Painter, 1970).

3.8.1.1 BACTERIAS AMONIACO OXIDANTES

Actualmente conocemos varias especies de bacterias capaces de oxidar amoníaco hasta la forma de nitrito, ellas son:

Nitrosomonas europaea

Nitrosovibrio tenuis

Nitrosococcus nitrosus

Nitrosococcus oceanus

Nitrosococcus mobilis

Nitrospira briensis

Nitrosolobus multiformis

No obstante, se piensa que puede haber otros géneros más capaces de llevar a cabo este proceso, solo que éstos no

han sido descritos debido a que se han hecho pocos intentos por aislar bacterias nitrificantes (Watson, 1981).

La identificación taxonómica de estas bacterias se hace tomando en cuenta cuatro parámetros principales: forma, tamaño, características metabólicas y arreglo de membranas dentro del citoplasma, así como su disposición en agregados celulares.

Algunas de sus principales características se enuncian en la tabla 1.

De los géneros bacterianos anteriormente mencionados, sólo Nitrosomonas tiene importancia en el proceso de la nitrificación biológica, sobre todo en el tratamiento del agua de desecho; por ello, el siguiente resumen hará referencia únicamente a este género.

Clasificación: Nitrosomonas, por sus características de síntesis de energía a partir de la oxidación de compuestos inorgánicos, se clasifica como una bacteria quimiolitotrofa de la familia Nitrobacteriaceae.

El género Nitrosomonas tiene actualmente más de 21 cepas muy poco diferenciadas morfológica y fisiológicamente una de otra. Des éstas, sólo Nitrosomonas europaea es generalmente reconocida como especie válida

3.8.1.1.1 MORFOLOGIA Y FISILOGIA

La estructura externa de Nitrosomonas puede ser algo variada, pero en general son bacterias en forma de bastones cortos u ovaladas (Engel, 1961; Buchanan, 1974; Watson, 1981). El tamaño de su célula es de 1 x 1.5 μm en promedio.

Tabla 1. Características de las Bacterias
Oxidantes del amonio (Watson 1981).

ESPECIES	MORFOLOGIA CELULAR Y TAMAÑO	CITOMEMBRANAS	HABITAT
<u>Nitrosomonas europaea</u>	Bacilo 0.8-1.0 X 1.0-2.0 μm	Periférica laminar	Suelo, agua dulce, agua de desecho y mar
<u>Nitrosovibrio tenuis</u>	Bacilo curvo 0.3-0.4 X 1.1-3.0 μm	Pérdida ocasional de invaginación de membra- na plasmática	Suelo
<u>Nitrosococcus nitrosus</u>	Cocos 1.5-1.7 μm de diámetro	Ultraestructura no examinada	Suelo
<u>Nitrosococcus oceanus</u>	Cocos 1.8-2.2 μm de diámetro	Localizada en el centro laminar	Estrictamente marina
<u>Nitrosococcus mobilis</u>	Cocos 1.5-1.7 μm de diámetro	Periférica, laminar ocasionalmente incluida en el centro de la célula	Agua salobre
<u>Nitrosospira briensis</u>	Espirilo 0.3-0.4 μm de diámetro 0.8-1.0 μm de largo	Sin citomembranas	Suelo
<u>Nitrosolobus multiformis</u>	Lobular 1.0-1.5 μm de diámetro	Citomembranas internas Célula con divisiones	Suelo

Una característica muy importante de la mayoría de las formas de Nitrosomonas es la presencia de citomembranas múltiples dispuestas en la región periférica de la célula (Fig. 3). Sin embargo, en algunas especies la citomembrana se limita a una sola (Fig. 4). La disposición y el número de citomembranas pueden variar en una misma cepa. Según Watson (1981), estas diferencias pueden originarse debido a las condiciones del cultivo o a los artefactos de fijación.

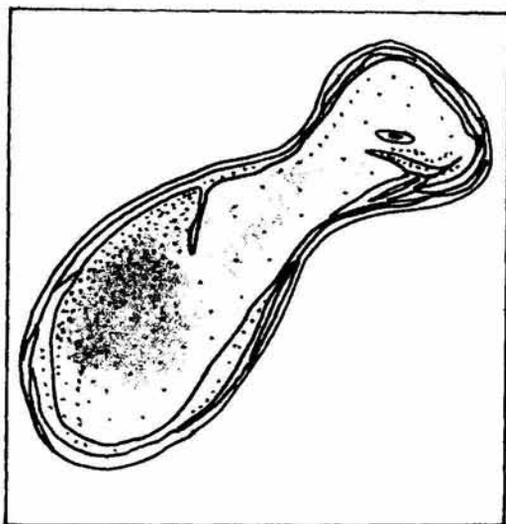


Fig. 3 Nitrosomonas europaea mostrando citomembranas múltiples.

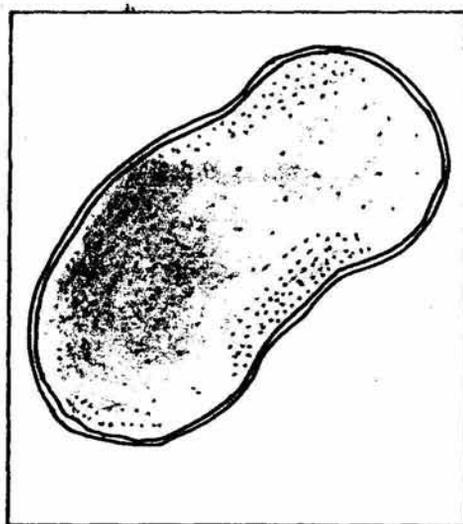


Fig. 4 Nitrosomonas sp. con una citomembrana sencilla.

Por la característica de tinción de la envoltura celular, el género Nitrosomonas es Gram negativo.

La motilidad de esta bacteria puede ser o no aparente, esto se debe a la ausencia o presencia de uno o más flagelos en la bacteria. Se ha discutido (Engel, 1961) que la dificultad pa-

ra observar en el microscopio electrónico la presencia de dichos flagelos puede deberse a diferentes causas, entre otras:

- Centrifugación: La fragilidad del flagelo bajo circunstancias tales como lo es el estar sometido a gravedades extremas, libera a poblaciones enteras de este orgánulo.
- Secado en vacío: Probablemente este factor también desprende los flagelos cuando las bacterias son procesadas para ser montadas al microscopio electrónico.

Otra de las consideraciones que se han hecho para Nitrosomonas es el cálculo de su masa (Painter, 1970) entre 0.4 y 0.5 pg (picogramos= 10^{-12} g).

Desde el punto de vista fisiológico, el género Nitrosomonas puede ser dividido en dos grandes grupos, sobre la base de sus requerimientos iónicos para su crecimiento.

1.- Nitrosomonas aisladas del mar y de plantas de tratamiento de aguas residuales.

2.- Nitrosomonas aisladas del suelo y de agua dulce.

Las Nitrosomonas marinas dejan de crecer en condiciones de salinidad que se acerquen a la mitad de la que existe en el agua de mar.

Estudios basados en los radios de bases del ADN (G+C) han mostrado que no existen diferencias significativas entre estos dos grupos. Aunque se pueden encontrar diferencias significativas entre las diferentes cepas de Nitrosomonas europaea ,

género y especie a los cuales pertenecen todas las anteriores; nadie en la actualidad ha hecho una separación de estas cepas en más de una especie.

3.8.1.1.2 AISLAMIENTO

La literatura reporta que el aislamiento de Nitrosomonas es increíblemente difícil de lograr y, en los casos en que ha habido éxito, el procedimiento fue tedioso y difícil e incluso en algunos casos con un resultado incierto (Lewis, 1958).

Los organismos amoniaco-oxidantes no son muy abundantes en el medio y los métodos para cuantificar su concentración, como ya se mencionó anteriormente, generan datos muy relativos (Soriano, 1968); sin embargo, algunos autores reportan concentraciones de 1 000-10 000 organismos nitrificantes (Sharma, 1977) po ml en muestras de agua de plantas de tratamiento, y de 1-100 organismos en aguas de ríos y lagos (Rhenheimer, 1980). Lewis & Pramer (1958) mencionan tres de las principales dificultades a que nos enfrentamos cuando queremos aislar a Nitrosomonas en cultivo puro:

- 1.- Los nitrificantes autótrofos se desarrollan muy lentamente.
- 2.- Los contaminantes heterótrofos en cultivos de enriquecimiento se desarrollan a una tasa igual o mayor que las bacterias nitrificantes.
- 3.- Las soluciones comúnmente empleadas para cultivos de Nitrosomonas contienen carbonatos insolubles,

los cuales evitan la dispersión del crecimiento.

Soriano & Walker (1968) reportan que tardaron 16 días en detectar la presencia de nitritos al tratar de aislar bacterias amoniacó-oxidantes, y en algunos otros casos las pruebas fueron positivas para este mismo sustrato hasta 22 días después.

Esto es comprensible si tomamos en cuenta que el tiempo de generación calculado para Nitrosomonas creciendo en condiciones óptimas es de 8 a 36 horas (Droogenbroeck, 1967; Painter, 1970; Sharma, 1977).

De la metodología propuesta hasta ahora para aislar nitrificantes sabemos que estas bacterias no pueden ser obtenidas directamente de una muestra de agua o suelo (Watson, 1981), para ello se deben utilizar cultivos de enriquecimiento. Estos cultivos tienen en su formulación una cantidad mayor de sustrato o los sustratos esenciales para el desarrollo de un organismo en particular. En el caso de las bacterias amoniacó-oxidantes los cultivos de enriquecimiento aparte de otros minerales necesarios para el crecimiento, deberán contener una cantidad calculadamente mayor de amoníaco en su forma no tóxica, generalmente $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Carlucci, 1968).

Como ya se sabe Nitrosomonas oxida en condiciones aerobias el NH_4^+ del medio para obtener su energía y libera al ambiente como producto de desecho el nitrito (NO_2^-).

Para saber si esta fase de la nitrificación se lleva a cabo, se mide la relación entre la baja en el contenido del NH_4^+ y el aumento en la concentración del NO_2^- , aparte de la ob-

servación del crecimiento en el número de organismos bacterianos.

Este crecimiento bacteriano no indica precisamente que sólo crece Nitrosomonas, pero en estas condiciones de cultivo debe ser el organismo dominante en el medio de enriquecimiento.

Aunque los diferentes medios utilizados para el crecimiento de nitrificantes son formulados exclusivamente con compuestos inorgánicos, estas mismas bacteria excretan compuestos orgánicos que pueden soportar el crecimiento de bacterias heterótrofas (Watson,1981).

En la actualidad contamos con medios de cultivo formulados para el enriquecimiento y aislamiento de las bacterias amoníaco-oxidantes (ver apéndice). De éstos, los más ampliamente usados son los cultivos líquidos, ya que en ellos es posible monitorear con facilidad el cambio en los parámetros fisicoquímicos del medio que nos pueden indicar el nivel de desarrollo bacteriano, a diferencia de los cultivos en placa en donde necesitamos esperar de 1-4 meses para poder observar a simple vista agregados bacterianos de nitrificantes, aparte de que las microcolonias que crecen en placas, no tienen características distintivas propias. No obstante las dificultades que presentan los cultivos en cajas Petri, se obtienen buenos resultados cuando se utilizan los medios de enriquecimiento líquidos para acelerar el crecimiento de las bacterias y luego éstas se inoculan en cajas de Petri con los medios de cultivo sólidos a-

decuados.

Otra forma de identificar las bacterias amoniaco-oxidantes es por la detección y, en muchos casos, cuantificación del nitrito formado por las bacterias. Este método puede ser utilizado cuando se cultivan las bacterias en cajas de Petri, pero es más eficiente en cultivos líquidos como el medio de enriquecimiento del cual se habló anteriormente (Finstein, 1972).

3.8.1.2 BACTERIAS NITRITO-OXIDANTES

Para completar la segunda fase de la nitrificación es necesaria la intervención de un pequeño grupo de bacterias altamente especializadas en oxidar el nitrito (NO_2^-) del medio hasta la forma de nitrato (NO_3^-). Hasta ahora se conocen tres especies bacterianas capaces de completar este proceso:

Nitrobacter winogradskyi

Nitrococcus mobilis

Nitrospina gracilis

Al igual que las bacterias amoniaco-oxidantes, las bacterias nitrito-oxidantes son estrictamente aerobias. Su hábitat es muy variado, sin embargo, Nitrococcus y Nitrospina son organismos que sólo se han aislado del mar.

El género Nitrobacter puede ser hallado en agua dulce, en el suelo, el mar y aun en plantas de tratamiento de agua.

Algunas características de estas bacterias son presentadas en la tabla 2.

Tabla 2. Características de las Bacterias
Oxidantes del nitrito (Watson1981).

ESPECIES	MORFOLOGIA CELULAR Y TAMAÑO	CITOMEMBRANAS	HABITAT
<u>Nitrobacter winogradskyi</u>	Bacilo 0.6-0.8 X 1.0-2.0 μm	Cubierta polar de vesículas aplanadas en la región peri- férica de las células	suelo, agua de desecho, agua dulce agua marina
<u>Nitrosococcus mobilis</u>	Cocos 1.5-1.8 μm de diámetro	Membranas tubulares arregla- das azarosamente en el cito- plasma	Marino
<u>Nitrospina gracilis</u>	Bacilo 0.3-0.4 X 2.6-6.5 μm	Sólo ocasionalmente se en- cuentran como invaginaciones de la membrana plasmática dentro del citoplasma	Marino

El hecho de que Nitrobacter sea el único género del grupo de bacterias nitrito-oxidantes que ha sido aislado en sistemas de purificación de aguas de desecho, descarta la descripción, en este trabajo de los géneros Nitrosococcus y Nitrospina.

Clasificación: Tomando en cuenta que su forma de obtención de energía en algunos casos es autótrofa y en otros heterótrofa (Delwiche, 1965; Sharma, 1977), la bacteria Nitrobacter se puede considerar como un quimiolitotrofo facultativo.

El manual Bergey's clasifica a Nitrobacter como una bacteria quimiolitotrofa Gram negativa, de la familia Nitrobacteriaceae, género Nitrobacter, especie winogradskyi.

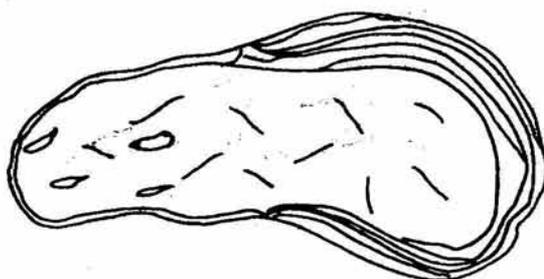
3.8.1.2.1 MORFOLOGIA Y FISIOLOGIA

Al igual que muchos otros organismos, Nitrobacter winogradskyi tiene una morfología variable que depende de las condiciones del ambiente (Pope, 1969). Generalmente tiene la forma de bastón y, bajo grandes aumentos en el microscopio electrónico, se distingue una forma de pera. El tamaño es de $0.5 \times 1.0 \mu\text{m}$ y puede tener un flagelo polar de $4-6 \mu\text{m}$ de longitud.

El tipo de división no está perfectamente comprendida; sin embargo, se ha sugerido que precisamente la forma de pera que presenta puede indicar una fisión asimétrica (Pope, 1969), lo que se conoce como gemación.

La ultraestructura de la membrana muestra una clara diferencia con los demás grupos bacterianos: la presencia de

varias capas electrodensas en la periferia de la célula (Fig. 5).



De 21 cepas de nitrobacterias examinadas por Watson (1981), ninguna pudo establecerse como una especie diferente a Nitrobacter winogradskyi.

No se poseen los criterios suficientes para diferenciar más especies de este género, pero seguramente estudios más profundos podrán dividir al género en al menos dos especies más (Watson, 1981).

Esta incertidumbre se ha hecho más crítica por el hecho de que algunas cepas mantenidas en el laboratorio tienen la habilidad de crecer heterotróficamente utilizando acetato como fuente de carbono y energía, a diferencia de otras que son quimiolitótrofas obligadas.

3.8.1.2.2 AISLAMIENTO

Al igual que en el caso de las bacterias amoníaco-oxi-

dantes el aislamiento de bacterias nitrito-oxidantes es un procedimiento largo y difícil. Ello se debe en gran parte a que Nitrobacter tiene un prolongado tiempo de generación de 8 horas o más.

El método más rápido para el aislamiento de estas bacterias nitrificantes es por la estimulación del crecimiento en el medio de enriquecimiento (ver apéndice). En estos, el sustrato esencial es el nitrito, generalmente de sodio (NaNO_2).

El aislamiento de estos organismos se puede hacer a partir de una gran cantidad de sustratos, agua dulce, agua de mar, pilas de composta, en aguas de sistemas de tratamiento, etc.

La cantidad de inóculo que se agrega al medio de cultivo es variable, dependiendo de la concentración de bacterias nitrito-oxidantes, por ello se recomienda hacer inóculos concentrados y a varias diluciones.

Los medios de enriquecimiento para Nitrobacter carecen de sustancias inorgánicas, lo que en teoría, evitaría el desarrollo de organismos heterótrofos; sin embargo, por el metabolismo propio de Nitrobacter aparecen en el medio productos orgánicos que pueden favorecer la multiplicación de dichos heterótrofos.

Para evitar este problema es conveniente hacer transferencias periódicas a medios de cultivo nuevos.

Las bacterias nitrito-oxidantes, como se mencionó anteriormente, producen nitrato como producto de la oxidación metabólica del nitrito, estos nitratos son liberados al exterior,

razón por la cual se puede monitorear la tasa de consumo-producción de estos compuestos nitrogenados.

Para asegurar el desarrollo de Nitrobacter en el medio de enriquecimiento, se debe analizar periódicamente la cantidad de nitrito consumido, agregando pequeños incrementos de nitrito al medio, similares a la tasa de consumo, con el fin de mantener un nivel constante de este sustrato, que estimule el crecimiento de la bacteria.

Otro factor muy importante que debe ser considerado es el valor del pH del medio de cultivo.

Se ha reportado (Painter, 1970) que el ámbito óptimo de pH para un buen crecimiento de Nitrobacter está entre 8.3 y 9.3, una baja en el pH produce un efecto inhibitorio.

3.9 BIOQUIMICA DE LA NITRIFICACION

El mecanismo biológico para la conversión del amoníaco en compuestos más estables como los nitritos y los nitratos involucra varias reacciones intermedias mediadas por enzimas. Muchas de éstas son altamente complejas y algunas no están bien comprendidas aún.

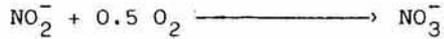
Sin embargo, se están haciendo grandes esfuerzos para ahondar en el conocimiento sobre la bioquímica de la nitrificación (Painter, 1970; EPA, 1975; Sharma, 1977).

La reacción estequiométrica para la oxidación del amoníaco por Nitrosomonas sp. hasta nitrito es:



La pérdida de energía libre para esta reacción ha sido calculada entre 58-84 kcal por mol de amoníaco.

La reacción para la oxidación del nitrito a nitrato por Nitrobacter es:



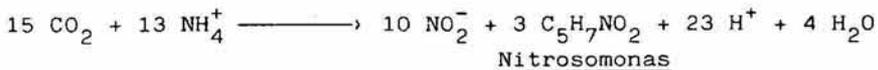
Aquí se calcula que se libera entre 15.4 y 20.9 kcal por mol de nitrito.

De esto se asume que Nitrosomonas obtiene más energía por mol de nitrógeno oxidado que Nitrobacter. En ambos casos la energía liberada de cada reacción es utilizada por los organismos nitrificantes para su desarrollo.

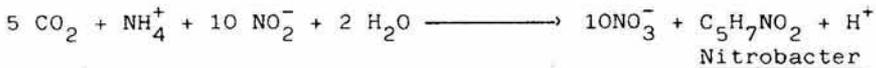
De manera general, la reacción total para definir a la nitrificación se puede expresar de la siguiente manera:



Considerando que la fórmula empírica de la biomasa de las bacterias nitrificantes fuera $\text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_2$ (EPA, 1975) el crecimiento de Nitrosomonas se puede expresar así:



y para Nitrobacter



Un hecho notable en las reacciones anteriores, tanto en la conversión de NH_4^+ a NO_2^- como en la producción de biomasa bacteriana, es la liberación al ambiente de ácido libre (H^+) y el consumo de CO_2 . En condiciones normales estas reacciones se llevan a cabo en niveles de pH menores a 8.3. Bajo estas circunstancias el ácido producido reacciona de manera inmediata con el ion bicarbonato (HCO_3^-). Los microorganismos consumen el bióxido de carbono (en forma de H_2CO_3) disminuyendo su concentración en el sistema.

La ecuación:



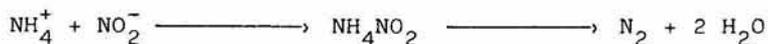
muestra que se consume alcalinidad por la oxidación del amoníaco y se produce bióxido de carbono (H_2CO_3 en la fase acuosa).

Se ha calculado que 6.0-7.4 mg de alcalinidad como CaCO_3 es consumida por cada miligramo de NH_4^+ oxidado a nitrato.

La producción de ácido sobre todo en sistemas de tratamiento de aguas residuales tiende a bajar el pH (Winkler, 1981) de manera que un cuerpo de agua de este tipo que no tenga control en el contexto de su sistema del ácido carbónico y que contenga suficiente amoníaco, eventualmente caerá a un nivel en donde la nitrificación se detenga.

Considerando estas condiciones de pH Winkler (1981) menciona la existencia de dos reacciones no biológicas en la nitrificación.

La primera es la "reacción de van Slyke" que se lleva a cabo a valores de pH tan bajos como 5 y donde el amonio-nitrito se descompone así:



La otra reacción ocurre también a niveles de pH ácidos, pero en condiciones de oxígeno abundantes para oxidar los nitritos a nitratos por un mecanismo puramente químico.

Experimentalmente Singer (1975) reporta la ozonización del amoníaco por la reacción de oxidación de este último hasta nitrato en un ambiente de pH de 7-9.

3.9.1 OXIGENO DISUELTO

Las consideraciones que se han hecho para determinar los requerimientos de oxígeno para que la nitrificación se lleve a cabo dependen de muchos factores. No obstante, estequiométricamente se predice que se requieren:

3.43 mg de Oxígeno para nitrificar 1 mg de $\text{NH}_4^+\text{-N}$

y

1.14 mg de Oxígeno para nitrificar 1 mg de $\text{NO}_2^-\text{-N}$
por lo tanto la Demanda Nitrogenosa de Oxígeno Teórica es de:

4.57 mg de O_2 por miligramo de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ (Sharma, 1977)

Como se puede observar la cantidad de oxígeno que se demanda para que la nitrificación se lleve a cabo es considerable. EPA (1975) ejemplifica que para oxidar 30 mg/l de nitrógeno de amoníaco se requieren alrededor de 138 mg/l de oxígeno, y se previene de que todos los sistemas nitrificantes

contienen materiales, aparte del amoníaco, que demandan oxígeno, lo que hace que estos sistemas nitrificantes tengan requerimientos de oxígeno mucho mayores.

Dado que no existe un conocimiento exacto del mecanismo bioquímico de la nitrificación y los resultados experimentales comparados con los cálculos estequiométricos para la oxidación del amoníaco varían ligeramente en cada laboratorio, se han elaborado varias teorías para explicar las diferencias entre lo teórico y lo experimental.

Sharma (1977) da una teoría en donde se sugiere que durante el proceso de síntesis de protoplasma se producen pequeñas cantidades de oxígeno.



donde este oxígeno puede ser utilizado para la nitrificación.

Esta teoría se basa en un experimento donde se calcula que para oxidar 1 parte de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ a $\text{NO}_2^-\text{-N}$ se necesitaron 3.22 partes de oxígeno, y para oxidar 1 parte de $\text{NO}_2^-\text{-N}$ se utilizaron 1.11 partes de oxígeno, cantidades comparablemente menores a los valores estequiométricos teóricos universales para la reacción de nitrificación.

Sin embargo, esta teoría ha sido cuestionada con el argumento de que el oxígeno del CO_2 no puede ser liberado, de acuerdo al ciclo de Calvin.

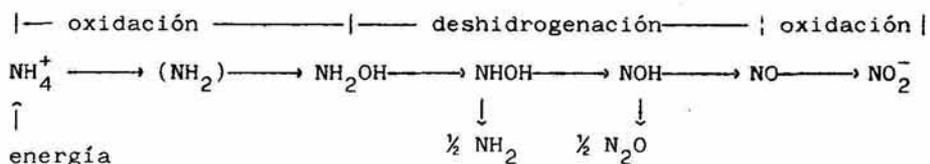
Otras observaciones concernientes al oxígeno serán consideradas posteriormente.

3.9.2 MECANISMO DE LA OXIDACION DEL AMONIACO POR Nitrosomonas

En los esquemas anteriores para mostrar la primera reacción de la nitrificación sólo utilizamos el primero y el último sustrato es decir:



Anderson (1965) propone un esquema más detallado de este proceso:



en el se demuestra la presencia de varios sustratos intermedios (tales como: aminos (NH_2), hidroxilamina (NH_2OH), nitroxil(NOH) y óxido nítrico (NO)) antes de llegar a la oxidación del NO_2^- .

Una consideración muy importante que hace Engel (en Hofman, 1952) es que la oxidación del amoniaco por Nitrosomonas tiene lugar sobre la superficie celular, más específicamente en las membranas múltiples, con el objeto de que el nitrito formado no entre en grandes cantidades al interior de la célula, sino que se mantenga en niveles adecuados para mantener los requerimientos normales de asimilación y respiración celular.

Regresando al esquema de Anderson, podemos observar que la oxidación del amoniaco a hidroxilamina (NH_2OH) es una

reacción endérgica, es decir que hay gasto de energía. Sin embargo, se ha demostrado (Hooper, 1968) que la hidroxilamina funciona como donador de electrones en reacciones subsecuentes, produciendo de esta manera gran cantidad de energía para *Nitrosomonas*.

Una enzima, la hidroxilamina-oxidoreductasa cataliza la rápida oxidación de hidroxilamina a nitrito (Hofman, 1952; Lees, 1952; Hooper, 1967; Hooper, 1969; Verstraete, 1973; Suzuki, 1974; Hooper, 1977), esta enzima contiene un citocromo P-460 el cual es único para las bacterias nitrificantes amonio-co-oxidantes.

Aleem (1966) describe un posible mecanismo para explicar la reacción exérgica que sucede después de la formación de la hidroxilamina (Fig. 6).

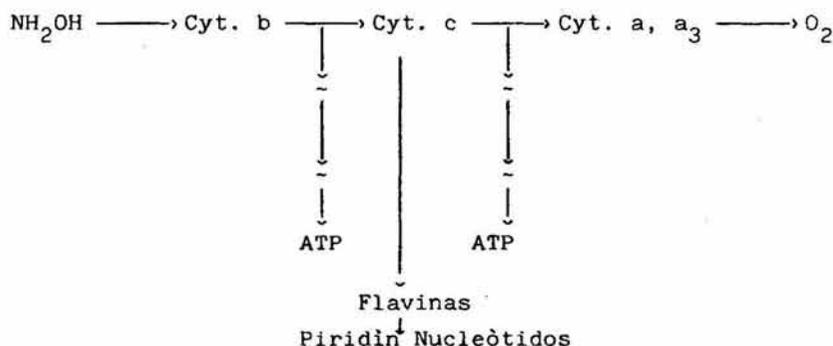


Fig. 6. Posible mecanismo propuesto por Aleem para explicar la reacción exérgica en las membranas de *Nitrosomonas europaea*. Los signos (~) significan intermediarios de alta energía.

3.9.3 MECANISMO DE LA OXIDACION DEL NITRITO POR Nitrobacter

Al igual que en la oxidación del amoniaco por Nitrosomonas, la oxidación del nitrito ocurre por un mecanismo enzimático secuencial, que involucra la transferencia de electrones desde el nitrito hasta el oxígeno (Cobley, 1976; Sharma, 1977).

Van Gool (1966) ha encontrado una alta concentración de citocromos en Nitrobacter, y considera que este hecho es una adaptación para que la cadena respiratoria no sea tan desfavorable desde el punto de vista termodinámico en la primera parte del proceso, esto significa que si el equilibrio de la concentración del producto de la reacción en el primer paso es muy baja, una manera de asegurar la remoción de este producto de manera rápida consiste en aumentar la concentración de los acarreadores (citocromos) involucrados en el siguiente paso de la reacción.

El sustrato que sirve como aceptor de electrones en el caso de Nitrobacter es el oxígeno, pero a diferencia de Nitrosomonas, que lo puede tomar de la atmósfera, Nitrobacter lo toma del agua (Sharma, 1977).

El sistema nitrito-oxidante ha sido asociado con las membranas intracelulares, aunque experimentalmente se ha observado la nitrificación en extractos libres de células, pero con poca actividad (Wallace, 1969).

Kiesov (1972) afirma que es en varias membranas de do-

ble capa en Nitrobacter , donde se encuentran las enzimas que convierten el tóxico nitrito en nitrato menos tóxico.

Se ha demostrado que el mecanismo de la reacción para producir energía tiene una doble función (Kiesov, 1972; Gottschalk, 1979), ver Fig. 7.

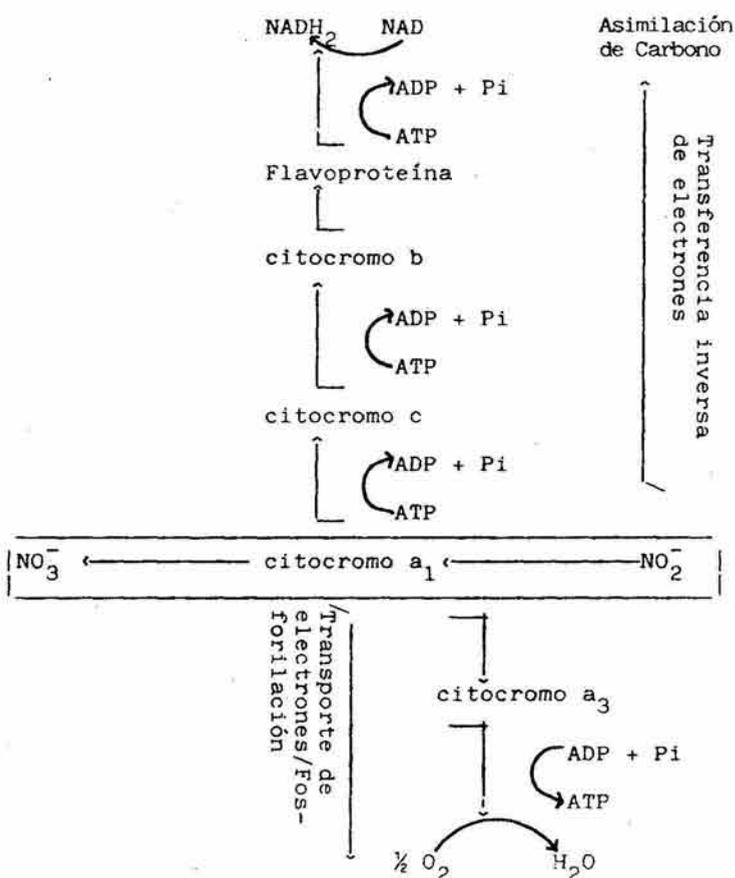


Fig. 7. Esquema propuesto por Kiesov para explicar la utilización de energía.

La energía producida por la oxidación del nitrito puede ser utilizada por una parte, en la asimilación de carbono por la célula, o bien como energía libre para la producción de ATP, en ambos casos el nitrito es oxidado a nitrato.

Si se requiere la generación de ATP, los electrones fluyen del citocromo a_1 al citocromo 605 (a_3), posteriormente pasan al citocromo oxidasa, donde se genera ATP por la fosforilación del ADP (Cobley, 1976) y finalmente llega al oxígeno como último receptor de electrones. En este mecanismo el flujo de electrones es libre y caen en "cascada". Debido al potencial redox positivo del nitrito se forma solamente 1 ATP por cada par de electrones.

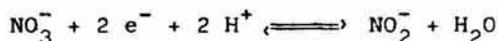
Si por otra parte se requiere la asimilación de carbono las bacterias nitrito-oxidantes deben emplear el mecanismo enzimático de transferencia inversa de electrones para la reducción del NAD (Kiesov, 1972; Sharma, 1977; Gottschalk, 1979). En la transferencia inversa de electrones los electrones son "empujados" hacia arriba (Fig. 7) desde el potencial redox positivo hacia uno negativo. Para ello se requiere de la energía que proviene de la hidrólisis del ATP.

Gottschalk (1979) considera que una gran cantidad de ATP ganado por la fosforilación del ADP debe ser invertido en la formación de NADH_2 . Probablemente se requieren 3 ATP por cada 2 electrones.

Esto explicaría que grandes cantidades de nitrito tengan que ser oxidadas para permitir el crecimiento de

Nitrobacter, además que el crecimiento de estos organismos sea muy lento.

Se ha dicho que Nitrobacter para desarrollarse requiere de oxígeno, es decir es un aerobio obligado, pero en condiciones extremas de baja tensión de oxígeno, como por ejemplo en un estanque de estabilización poco aereado, Nitrobacter es capaz de convertirse en un nitrato-reductor, llevando a cabo una reacción inversa en ausencia de oxígeno (Sharma, 1977).



Esto implica que bajo ciertas condiciones las bacterias nitrificantes pueden estar presentes en cuerpos de agua anaerobios o con cantidades de oxígeno muy bajas, y más aún que pueden posiblemente desnitrificar en zonas localmente anaerobias. Sin embargo, faltan estudios para probar la extensión de estas afirmaciones.

3.10 PARAMETROS QUE AFECTAN LA NITRIFICACION

La nitrificación es sensible bajo determinadas condiciones a la modificación de los valores de ciertos parámetros (Prosse, 1977).

Actualmente es posible modificar o mantener ciertos parámetros para optimizar el proceso de la nitrificación sobre todo en plantas de tratamiento de agua residual.

Las observaciones que se harán son muy generales y dependen en gran medida de las circunstancias de observación de cada investigador.

3.10.1 OXIGENO DISUELTO

La nitrificación es afectada significativamente cuando la concentración de oxígeno disuelto es baja. No obstante concentraciones medias y altas de oxígeno no parecen mejorar significativamente la tasa de nitrificación cuando ésta llega a su nivel óptimo (Painter, 1970).

En estudios a tensiones bajas de oxígeno, los microorganismos nitrificantes fueron afectados, disminuyendo su capacidad para reproducirse. Nitrobacter parece ser afectada en mayor grado que Nitrosomonas. Esto parece ser la razón de que la nitrificación no sea completada en sistemas acuáticos con cargas orgánicas altas, donde la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) es alta.

La literatura reporta que la concentración crítica de oxígeno disuelto para que la nitrificación se lleve a cabo no debe ser menor de 0.5 mg/l de oxígeno disuelto, a concentraciones menores la nitrificación no ocurre. La concentración óptima promedio de oxígeno disuelto debe ser entre 4-7 mg/l en plantas de tratamiento de agua residual (Painter, 1970).

La nitrificación se lleva a cabo a una tasa que es independiente del oxígeno disuelto arriba de la concentración crítica.

Los organismos nitrificantes pueden sobrevivir bajo ciertas condiciones en ambientes anaerobios, disminuyendo su metabolismo y activando su sistema enzimático reductor (Sharma, 1977), si las condiciones cambian, es decir, el ambiente se

torna aerobio, los nitrificantes tienen la facultad de recuperarse y continuar nitrificando.

3.10.2 TEMPERATURA

La información disponible hasta ahora sobre el efecto de la temperatura en la nitrificación está basada en estudios de sistemas cuyas temperaturas van más allá de los 20 °C (EPA, 1975). Las investigaciones de laboratorio que tratan de la nitrificación a bajas temperaturas arrojan datos demasiado contradictorios, de ellos sólo se puede concluir que la nitrificación no ocurre a menos de 8 °C (Painter, 1970), esto explica por qué es difícil esperar tasas de nitrificación altas en el invierno.

La temperatura óptima para el crecimiento de organismos nitrificantes parece estar en el ámbito de 28-36 °C (Sharma, 1977) y poco o ningún crecimiento ocurre por abajo de los 4 °C.

De manera general la temperatura es un parámetro muy difícil de controlar, sobre todo en cuerpos de agua de gran tamaño. Desde el punto de vista operacional no es conveniente construir sistemas nitrificantes en lugares extremos de bajas temperaturas, a menos de que en invierno sea relativamente fácil y poco costoso aumentar el tiempo de retención para completar la nitrificación.

3.10.3 POTENCIAL HIDROGENO (pH)

Como todo proceso biológico, la nitrificación puede ser afectada por el pH del sistema.

Parece ser que la explicación más viable a este fenó-

meno es que el pH afecta la actividad enzimática de los organismos nitrificantes puesto que las enzimas son activas sólo en un ámbito muy estrecho de pH (Gaudy, 1981) y despliegan su actividad a un pH óptimo.

Aún no se conoce bien el mecanismo por el cuál la tasa de crecimiento y la viabilidad de los nitrificantes son afectados, pero existen experimentos con preparaciones de membranas que demuestran que a determinados valores de pH el mecanismo de transporte a través de membrana se ve afectado.

Anthonisen (en Painter, 1972) ha propuesto un mecanismo para explicar de qué manera el pH puede afectar la tasa de nitrificación. Su hipótesis se basa en el hecho de que el equilibrio amonio-amoniaco y nitrito-ácido nitroso depende del pH. Según Anthonisen tanto el "amoniaco libre" (NH_3) como el "ácido nitroso libre" (HNO_2) inhiben a los organismos nitrificantes. Se postula que cuando el pH intracelular de una bacteria nitrificante es menor que el pH del ambiente extracelular, el amoniaco libre penetrará la membrana celular y el amoniaco ionizado (NH_4^+) permanecerá en el ambiente extracelular.

De manera similar, cuando el pH intracelular es mayor que el del ambiente extracelular, el ácido nitroso libre penetrará a la célula, pero no lo hará el ion nitrito (NO_2^-).

Los reportes sobre el ambiente óptimo de pH para que la nitrificación se lleve a cabo son variados, pero se puede generalizar que los nitrificantes prefieren un ambiente ligeramente alcalino con un pH óptimo de 8.5. Niveles de pH por abajo

de 5.0 detienen completamente la nitrificación biológica (Winkler, 1981).

3.10.4 CONCENTRACION DE IONES AMONIACO Y NITRITO

Nitrosomonas y Nitrobacter son muy sensibles a concentraciones altas de sus propios sustratos. Ya mencionamos antes que el grado de inhibición depende del equilibrio amoniaco-amonio y nitrito-ácido nitroso.

Aunque el NH_4^+ es la fuente de energía para las bacterias nitrificantes, cantidades excesivas pueden inhibir el crecimiento de esas bacterias. El amoniaco es más inhibitorio para Nitrobacter que para Nitrosomonas. No obstante un equilibrio en la concentración de amonio mejora marcadamente la tasa de nitrificación (Gujer, 1978).

Concentraciones altas de nitrito pueden reducir la actividad de los organismos nitrificantes a niveles bajos de pH, principalmente por la formación de ácido nitroso más que por el ion nitrito.



Las concentraciones de amoniaco y del ion nitrito en el agua de desecho doméstico no están en el ámbito inhibitorio. Sin embargo, en plantas de tratamiento de aguas residuales de granjas, industrias y de desechos agrícolas, se debe prestar mayor atención ya que ahí se encuentran sustratos y productos de gran significado en la inhibición de la nitrificación.

Otro factor más que debe ser tomado en cuenta, es el

efecto que tiene la concentración de nitrificantes en el sistema (Srinath, 1974). La concentración de organismos nitrificantes es un factor mayor en la tasa de nitrificación. La cantidad de nitrificantes está determinada por el tiempo de generación de los organismos, los cuales están relacionados con la cantidad de energía obtenida por la oxidación del amoníaco o del nitrito.

3.10.5 CARGA ORGANICA Y TIEMPO DE RETENCION

La carga orgánica y el tiempo de retención son dos de los parámetros operacionales que afectan significativamente el proceso de la nitrificación.

Manteniendo los parámetros tales como la temperatura, OD, pH, etc. a nivel constante, se ha observado que el grado de nitrificación disminuye significativamente cuando hay un incremento en la carga orgánica (Balakrishnan, 1969; Prakasam, 1972; Stafford, 1974; Sharma, 1977).

No se conoce muy bien la relación que existe entre la nitrificación y la carga, pero hay indicios de que grandes cantidades de materia orgánica demandan mucho oxígeno y limitan su disponibilidad al sistema nitrificante debido a la localizada competencia entre heterótrofos comunes y nitrificantes.

Por otra parte es necesario proveer un cierto tiempo de retención mínimo que varía en función de determinados parámetros.

Tiempos de retención altos se pueden necesitar si:

- a) La concentración de nitrificantes es baja.
- b) La edad de los lodos es baja.
- c) La temperatura del sistema es baja.

El tiempo de retención de sólidos y el control de la carga orgánica son las herramientas para lograr un buen manejo de la nitrificación en un sistema de tratamiento de agua residual (Downing, 1968).

4.

M E T O D O L O G I A

DESCRIPCION DEL AREA DE ESTUDIO:

Este estudio se hizo en uno de dos estanques de estabilización diseñados para tratar aguas residuales de tipo doméstico.

Este sistema de estanques de estabilización se ubica en los márgenes de Santo Tomás Atzingo, poblado perteneciente al municipio de Tlalmanalco en el Estado de México (Mapa 1), a una altitud de 2475 m snm.

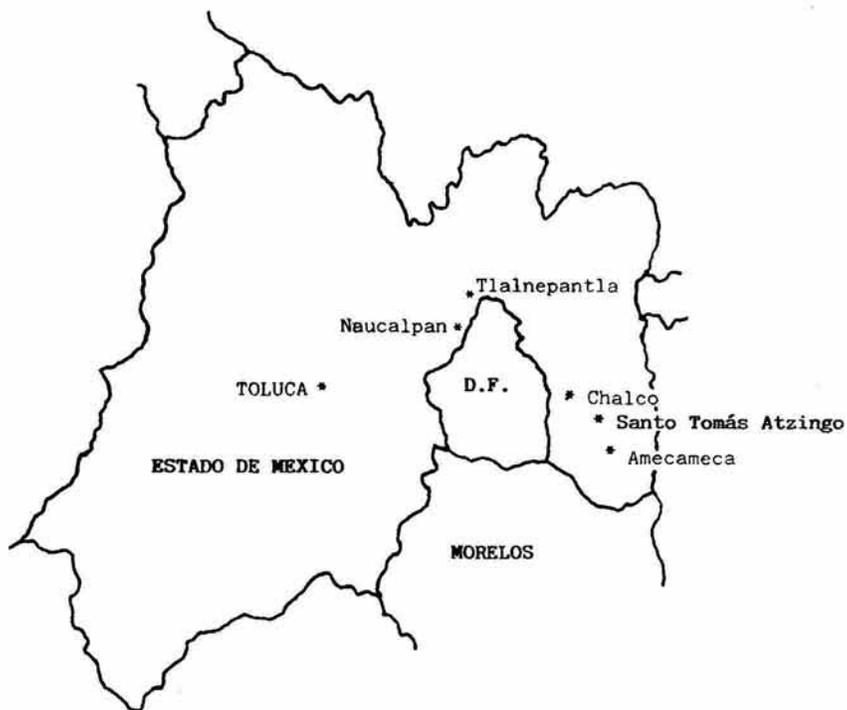
El clima predominante en la zona es del tipo $C(W)_2(w)$ (b) según García (1975), es decir, el clima es templado subhúmedo y con lluvias en verano. El promedio de temperatura es de 29 °C para la temperatura más alta y hasta -3 °C para la más baja.

El ejido de Santo Tomás tiene una superficie total de 450 Hectareas y una población (hasta el censo de 1980) de 1200 habitantes. Las actividades predominantes de la población son agrícolas y ganaderas.

SISTEMA DE ESTANQUES DE ESTABILIZACION

Los estanques de estabilización de Santo Tomás Atzingo son dos cuerpos de agua construidos para tratar las aguas residuales del poblado.

Estos estanques tienen forma rectangular (Fig. 8). El lecho es de tierra y su profundidad varía de 1.0 a 1.7 m con una longitud de 40.1 m y 14.6 m de ancho. En el año de 1983 fueron rediseñados para trabajar facultativamente.



Mapa 1. Localización del poblado de Santo Tomás Atzingo.

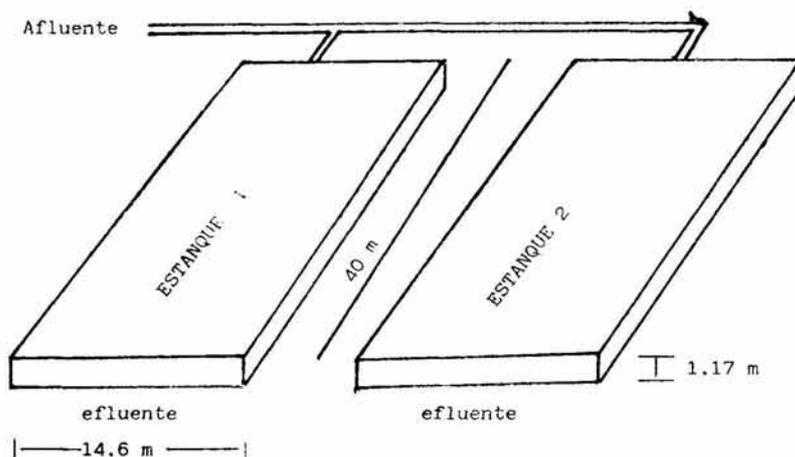


Fig. 8. Sistema de estanques en Santo Tomás Atzingo.

Los desechos que se incorporan al sistema de estanques son exclusivamente de tipo municipal, dado que en la zona no existe industria alguna que pudiera afectar los desechos de tipo doméstico del poblado.

ESTACIONES DE TOMA DE MUESTRA

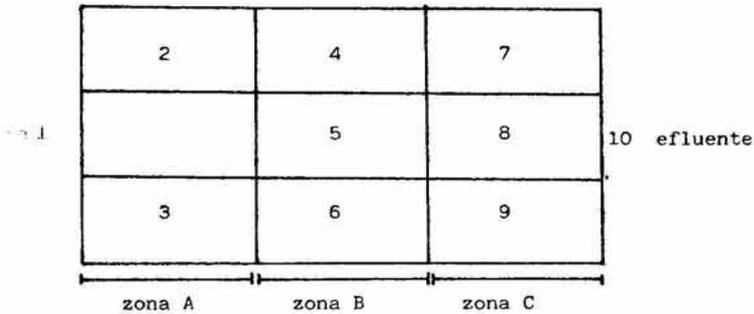
Previo a la selección de los puntos de muestreo, se hizo un análisis preliminar en los dos estanques con el objeto de establecer en cual de los dos era más probable que se llevara a cabo la nitrificación.

Análisis anteriores hechos por otros investigadores reportaban la ausencia de oxígeno disuelto (OD) en el agua de estos estanques.

Los análisis seleccionados para el estudio preliminar fueron: OD (con muestreador de oxígeno portátil YSI), potencial redox y pH utilizando el pHmetro "Chem-mate" de Beckman Instru-

El estanque número dos fué el único en donde se detectó por lo cual fue escogido para este estudio.

De acuerdo a la capacidad de trabajo y de equipo con se contaba para campo y laboratorio, se fijaron 10 estaciones para la toma de muestra. Las estaciones se distribuyeron de manera que abarcaran la mayor parte del sistema (Fig. 9).



Distribución de las estaciones de muestreo en el estanque 2.

Por su diseño este estanque trabaja con flujo en forma de "pistón" por lo que las zonas de toma de muestra se dividen en:

Zona A (Afluente)

Zona B (Intermedia)

Zona C (Efluente)

Considerando que la capa superficial es la que tiene la mayor cantidad de OD por su contacto con la capa atmosférica

que difunde oxígeno por la fuerza del aire y porque es la zona de luz para la actividad fotosintética, la toma de muestra se hizo dentro de los primeros 0.10 m bajo el nivel del agua.

Se planearon 9 muestreos quincenales durante el año de 1983 tratando de abarcar la época más cálida y la época más fría del año, para observar como es afectada la nitrificación bajo el parámetro temperatura.

DETERMINACIONES "In situ"

Se midieron la concentración de OD y la temperatura con un oxímetro Hach (modelo 16046). Chequeos titulométricos periódicos por el método Winkler (APHA, 1980) fueron hechos para un control de calidad del oxímetro. Las mediciones de pH y potencial Redox se efectuaron en el campo con un pHmetro portátil Beckman (modelo "Chem-mate) adecuadamente calibrado con soluciones estándar amortiguadas.

La acidez y la alcalinidad se determinaron por el método potenciométrico para aguas residuales según el manual del "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater" (APHA, 1980), con el pHmetro descrito anteriormente.

ANALISIS FISICOQUIMICO DE LABORATORIO

Las muestras para el análisis fisicoquímico de laboratorio fueron tomadas en los primeros 0.10 m bajo la superficie del agua en envases de 2 l y transportadas al laboratorio convenientemente preservadas y aciduladas a pH 2 con H_2SO_4 . Asimismo, se tomó otra muestra de 1 l, que sólo se transportó con hielo (sin ácido) para las pruebas que así lo requirieran.

El análisis de las muestras se hizo en el laboratorio de Vía Húmeda del Proyecto de Conservación y Mejoramiento del Ambiente (Proyecto CyMA) de la UIICSE en la ENEPI. En este laboratorio las técnicas utilizadas siguen los procedimientos del Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (op.cit.).

Los análisis incluyeron: nitrógeno amoniacal (NH_4^+) por el método titulométrico en muestras no filtradas tratadas por destilación preliminar, nitrógeno de nitritos (NO_2^-) por diazotización y espectrofotometría (en espectrofotómetro HP 8450 UV/VIS), nitrógeno de nitratos (NO_3^-) por espectrofotometría UV a 220 nm en espectrofotómetro Hewlett Packard modelo HP 8450 UV/VIS y por reducción con cadmio (Merck).

Otros análisis fueron demanda bioquímica de oxígeno (DBO) por el método de dilución en equipo Hach BOD modelo 2173B (Hach Company) y demanda química de oxígeno (DQO) por el método de reflujos con dicromato en un reactor Hach COD modelo 16500-10 (Hach Company).

Estos dos últimos métodos no están descritos en el Standard Methods (APHA, 1980) pero se basan en una modificación de la técnica estándar.

ANÁLISIS BACTERIOLOGICO (de Nitrificantes)

Las muestras para los análisis bacteriológicos fueron tomadas en las mismas estaciones marcadas para los análisis físicoquímicos.

Las muestras fueron colectadas en frascos estériles

de 300 ml y transportadas al laboratorio del Proyecto CyMA convenientemente refrigeradas para ser procesadas en un lapso de tiempo no mayor de 3 hrs desde su recolección.

El aislamiento, la identificación y la actividad de los organismos nitrificantes se hizo y determinó de acuerdo al siguiente esquema:

I) Aislamiento:

Para Nitrosomonas se utilizó:

- a) Medio de enriquecimiento de Soriano y Walker (1)
- b) Medio básico de Winogradskyi con amonio (2)
- c) Medio en placa con gel de sílice con amonio (2)

Para Nitrobacter:

- a) Medio de enriquecimiento de Aleem y Alexander (1)
- b) Medio básico de Winogradskyi con nitrito (2)
- c) Medio en placa con gel de sílice con nitrito (2)

Métodos descritos en (1) Watson, 1981

(2) Rodina, 1972

La formulación de estos medios se describe en el anexo de esta tesis

II) Identificación:

- a) Tinción Gram.
- b) Método de observación por microscopía de campo obscuro.
- c) Tinción de esporas (Método contemporáneo).
- d) Tinción de flagelo (según Leifson).

e) Microscopía electrónica de transmisión.

Métodos descritos en Rodina (op.cit.) (ver anexo).

III) Actividad de los organismos nitrificantes:

- a) Se determina espectrofotométricamente la liberación de nitritos y nitratos así como el consumo de amoníaco y nitrito para conocer la tasa de actividad de estas bacterias.
- b) Se aplicó la técnica de NMP (número más probable) para la estimación de la concentración de nitrificantes por unidad de volumen según Strom & Matulewicz (1976).

ANÁLISIS DE DATOS

Se analizaron los parámetros fisicoquímicos y biológicos así como la frecuencia de los microorganismos nitrificantes. Varios análisis estadísticos fueron aplicados para evaluar el comportamiento general del estanque durante la época de estudio.

Los análisis estadísticos incluyen:

- 1) Se aplicó la prueba de Normalidad según Kolgomorov (Wayne, 1980; Durán, 1986) para conocer la distribución de los datos de cada parámetro y en su caso aplicar:
 - a) Análisis de Kruskal-Wallis, técnica no paramétrica empleada cuando los datos no siguen una distribución normal. En este trabajo se utilizará para conocer si existen o no, diferencias significativas entre las 3 zonas en que se di-

vidió el estanque (para cada parámetro individual).

o bien

b) Análisis de Varianza, técnica paramétrica empleada cuando los datos tienen una distribución Normal.

2) Para el caso de diferencias significativas entre los datos de dos eventos con respecto a un mismo parámetro, se aplica la prueba de t de student como prueba no paramétrica de comparación de dos grupos de datos dependientes.

Esta prueba se aplica a la comparación de las medias de los datos de los parámetros fisicoquímicos del afluente y efluente del sistema.

5.

RESULTADOS Y DISCUSION

Mencionamos anteriormente que la nitrificación es el mecanismo de oxidación biológica del amoniaco, hasta la forma de nitrato; este proceso está mediado de manera muy importante por dos grupos de bacterias nitrificantes, presentes en el estanque objeto de este estudio, Nitrosomonas europaea y Nitrobacter winogradskyi.

Para evaluar la tasa de actividad nitrificante y la importancia de la presencia de los organismos de los géneros Nitrosomonas y Nitrobacter en los estanques de tratamiento de agua residual en Santo Tomás Atzingo, dividimos el análisis en dos partes: Bacteriológico y Fisicoquímico del agua.

ANALISIS BACTERIOLOGICO

El análisis de bacterias al microscopio, a partir de medios de cultivo de enriquecimiento para nitrificantes, revelaron pocas diferencias, con respecto a la estructura que tienen los bacilos de enterobacterias.

Bacterias amoniaco-oxidantes:

Las muestras que se tomaron de los medios de Soriano y Walker (Watson, 1981) y medio básico de Winogradskyi (Rodina, 1972) adicionados con sulfato de amonio mostraron contaminación en pruebas de viabilidad para heterótrofos, sin embargo, alícuotas de 1 ml de estos medios resuspendidos en medio nuevo, permitieron en 6 semanas obtener cultivos puros de bacterias amoniaco-oxidantes.

La estructura observada de estas bacterias amoniaco-

oxidantes fue esencialmente de forma bacilar, con un tamaño promedio de $1 \times 1.5 \mu\text{m}$. Las pruebas de tinción mostraron su característica de bacterias Gram negativas. La motilidad fue aparente cuando las bacterias fueron observadas en microscopía de campo obscuro; sin embargo, la tinción de Leifson (Rodina, op. cit.) no mostró ningún flagelo. Se cree, aunque no se ha observado, que los cultivos de bacterias flageladas de más de 4 semanas tienden a perder el flagelo, la manipulación durante el procedimiento de tinción también pudo haber tenido efectos deletéreos sobre este orgánulo.

Alícuotas de 1 ml de medio de cultivo con bacterias amoniaco-oxidantes sembradas en cajas de Petri con sustrato de gel de sílice y medio de enriquecimiento de Winogradskyi con sulfato de amonio, al cabo de 4 semanas solo mostraron un crecimiento pobre. El desarrollo de colonias bacterianas no se hizo evidente y no se encontró una justificación aparente para este hecho, salvo que la literatura reporta que el crecimiento de nitrificantes en placa es en extremo difícil (Soriano y Walker, 1968; Rodina, 1972).

La técnica de número más probable (NMP) para la enumeración de bacterias nitrificantes se aplicó sin resultados. Se suponía que el hecho de utilizar medios de cultivo de enriquecimiento aceleraría el proceso, mismo que en la práctica tarda aproximadamente 4 meses; sin embargo, los resultados a corto plazo no fueron satisfactorios y se abandonó esta técnica por no ser funcional para nuestro laboratorio.

Cuando no es posible medir el crecimiento en cuanto al número de bacterias nitrificantes (como lo muestran los resultados), la estimación se puede hacer indirectamente midiendo la concentración a intervalos de los productos finales de su metabolismo. En el caso de las bacterias amoniac-oxidantes el metabolito final es el nitrito.

Se generó la gráfica 1 a partir de los datos del análisis de producción de nitritos en medios de enriquecimiento con amonio inoculados con una alícuota de solución con bacterias del género Nitrosomonas. En ella se muestra que en un plazo de 8 días, a intervalos de un día, existe un incremento en la producción de nitrito; en apariencia, el aumento en la concentración pudiera reflejar una simple acumulación de sustrato; sin embargo, la observación microscópica colateral reveló un aumento cualitativo constante de bacterias a lo largo del estudio.

Desafortunadamente no se pudieron correlacionar cuantitativamente el incremento de Nitrosomonas con la producción de nitritos. En la misma gráfica se puede apreciar también que de los dos medios de enriquecimiento probados, el medio de Soriano y Walker estimuló notablemente el metabolismo de la bacteria Nitrosomonas en comparación con el medio básico de Winogradskyi con amonio.

Este ensayo, aunque cualitativo, nos puede indicar con un simple análisis de nitritos el grado de actividad y la velocidad de oxidación del amoniac-oxidante por bacterias

amoniaco-oxidantes en casi cualquier ambiente.

Bacterias nitrito-oxidantes:

El análisis bacteriológico hecho para caracterizar a las bacterias nitrito-oxidantes, representadas principalmente por Nitrobacter winogradskyi, fue esencialmente el mismo que para las bacterias amoniaco-oxidantes. La diferencia con aquel análisis fue el tipo de medios de cultivo utilizados.

Alícuotas de 1 ml de agua de los estanques de estabilización fueron puestas en medio de cultivo de Aleem y Alexander (Watson, 1981) y en medio básico de Winogradskyi (Rodina, 1972) con exceso de nitrito de sodio.

Los medios de cultivo fueron monitoreados cada 24 horas para detectar la oxidación de los nitritos hasta la forma de nitratos, después de una semana había en ambos medios de cultivo concentraciones apreciables de nitratos, esto indicó que se estaba llevando a cabo la nitrificación en Fase II. Pruebas de viabilidad para heterótrofos en agar nutritivo (Watson, 1981) demostraron, sin embargo, una severa contaminación por enterobacterias.

Transferencias periódicas a los medios de sales inorgánicas de Aleem y Alexander y básico de Winogradskyi disminuyeron considerablemente la contaminación; sin embargo, ésta se volvió crónica y no pudo ser controlada durante todo el experimento.

Seis semanas después del primer inóculo, y después de resiembras en medios de cultivo frescos, muestras de estos cul-

tivos fueron observadas al microscopio. La mayoría de las bacterias presentaron una morfología bacilar con una medida promedio de $0.5 \times 1.0 \mu\text{m}$; la motilidad fue aparente, no obstante, no se pudieron observar flagelos. La técnica de tinción de flagelo de Leifson (Rodina, 1972) tampoco reveló flagelos, pero si mostró que la mayoría de las células bacterianas tenían una forma de bacilos alargados, mientras que en algunos otros, el bacilo era más corto y existía una tendencia a la forma ovalada. Las formas alargadas correspondieron a células de Nitrobacter, mientras que las otras formas fueron bacterias contaminantes de los medios de cultivo.

Las bacterias de contaminación fueron identificadas por microscopia electrónica como: Alcaligenes paradoxus, Xantobacter autotrophicus, Alcaligenes eutrophus y Pseudomonas pseudoflava; éstas dos últimas se consideran bacterias desnitrificantes facultativas, que en ausencia de oxígeno utilizan al nitrato como aceptor de electrones para su respiración y lo reducen hasta N_2 . Por su parte A. paradoxus y X. autotrophicus utilizan a los nitratos como aceptores de electrones y los convierten hasta nitrito.

Al igual que sucedió con Nitrosomonas, Nitrobacter no tuvo mayor crecimiento en placas de gel de sílice enriquecidas con nitrito de sodio, aunque en análisis posteriores, segmentos del sustrato (gel de sílice) revelaron la oxidación de los nitritos hasta nitratos.

Una posible explicación de este hecho es que las bac-

terias no tuvieron un ambiente adecuado para reproducirse a su velocidad normal, pero su actividad metabólica no se perdió, sino que siguió oxidando nitritos en relación directa a la tasa de reproducción, acumulando nitrato en el medio. La concentración de nitratos estuvo por abajo de 1 mg/l de $N-NO_3^-$, que es el valor mínimo detectable por el método utilizado; sin embargo, cualitativamente se encontraron trazas de $N-NO_3^-$ al agregar reactivo de difenilamina en solución ácida.

Cuando se comparó la eficiencia de los medios de enriquecimiento para estimular la actividad metabólica de las bacterias nitrito-oxidantes (gráfica 2), se observó una marcada tendencia del medio de Aleem y Alexander para favorecer la reproducción de Nitrobacter. El medio básico de Winogradskyi más nitritos estimuló también la oxidación de los nitritos a nitratos, pero en un porcentaje menor con respecto al medio de Aleem y Alexander.

ANALISIS FISICOQUIMICO

El sistema de estanques para el tratamiento de las aguas residuales del poblado de Santo Tomás Atzingo, en el Estado de México, está formado por dos cuerpos de agua al aire libre, de tal manera que se encuentran expuestos a los fenómenos atmosféricos de la zona.

La etapa de muestreo que comprendió tanto los análisis preliminares como los definitivos se efectuó en los meses que van de Mayo hasta Noviembre; meses que correspondieron al principio de la época de lluvias y al inicio de la temporada de

sequía. Se esperaba que las distintas épocas produjeran variaciones notables en los valores de los parámetros medidos de un muestreo a otro; sin embargo, de manera general, dichas épocas no tuvieron una influencia notable sobre el comportamiento de los parámetros en función del tiempo.

El análisis de los parámetros fisicoquímicos del estanque estudiado se hizo a partir de los valores máximos y mínimos encontrados en el sistema (tabla 3). Los valores intermedios no fueron tomados en cuenta, ya que la mayoría de ellos se encontraban en uno de los dos extremos. Esto concuerda con las condiciones críticas (excesiva carga orgánica) de operación en que se encontraba el sistema al momento del estudio. Los valores obtenidos son comparados con los valores óptimos promedio de sistemas nitrificantes en condiciones operacionales adecuadas.

Oxígeno Disuelto.

La concentración de oxígeno disuelto (OD) en el agua es el factor más importante que debe ser tomado en cuenta en estudios de nitrificación. Si no hay OD en el medio, la nitrificación no puede ocurrir.

El estanque de estabilización estudiado puede ser considerado como facultativo, por su alternancia de presencia y ausencia de oxígeno. La tabla 3 muestra que el estanque trabajó en condiciones de tensión de oxígeno muy bajas. La misma tabla muestra que en la mayoría de los muestreos se encontraron valores de OD de cero en alguna parte del estanque; gene-

ralmente en la zona del afluente (zona A). Un factor relacionado con este hecho, fue la observación del desarrollo de una gran cantidad de algas en la zona intermedia (B) y del efluente (C). La actividad fotosintética de las algas, sobre todo en las cercanías del efluente, explicaría el por qué esta zona tenía valores de OD mayores que en el afluente. La gran cantidad de algas en proceso fotosintético debería mantener los niveles de OD en valores altos; sin embargo, esto no ocurrió así. La explicación a este fenómeno es que el oxígeno producido por la actividad de las algas es consumido casi de manera inmediata por los organismos aerobios del sistema, dejando disponibles tan sólo microcantidades de OD en el agua.

Por otra parte, el análisis de comparación de Kruskal Wallis (tabla 6) de las tres zonas en las que fue dividido el estanque para su estudio demostró que no existen diferencias significativas entre ellas. La estrecha relación en el comportamiento del OD en las tres zonas del estanque se observa en la gráfica 3, ahí, es notorio que el patrón de aumento y disminución en la concentración de oxígeno, es el mismo para las tres partes del estanque. Se representa también en esa gráfica que en la mayoría de los muestreos (6 de 9) la zona del efluente tuvo la menor concentración de OD de todo el sistema; la prueba de t de Student (tabla 7) confirma este hecho.

Considerando que en los 9 ensayos bacteriológicos realizados en cada una de las estaciones de muestreo, el resultado para detectar la presencia de Nitrosomonas y Nitrobacter

fue positivo y de que en la mayor parte del tiempo las cantidades de OD fueron extremadamente pequeñas, salvo en un período de dos semanas correspondientes a los meses de Octubre y Noviembre que elevaron su OD hasta valores máximos de 1.2 y 1.5 mg/l; podemos puntualizar que la nitrificación en los estanques de estabilización de Santo Tomás Atzingo no era un proceso importante para la remoción de productos nitrogenados de desecho. Las microcantidades de OD en el agua sólo eran, con respecto a las nitrificantes, suficientes para mantener pequeñas poblaciones capaces de oxidar amoníaco y nitritos en cantidades despreciables, más aún, en condiciones de anoxia Nitrosomonas y Nitrobacter pueden revertir el proceso de su respiración y reducir nitritos y nitratos como aceptores finales de electrones.

Demanda Bioquímica de Oxígeno y Demanda Química de Oxígeno.

El resultado de los valores encontrados para la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) analizados por la prueba de normalidad según Kolgomorov (Tabla 4) por tener una distribución normal fueron tratados con un análisis de varianza simple. Al comparar los valores entre las zonas de afluente, intermedia y del efluente, se encontraron diferencias significativas entre ellas. Este resultado concuerda con el propósito para el cual fue diseñado el estanque de estabilización. En otras palabras esto quiere decir que hay una remoción aparente entre la materia orgánica que entra y la que sale del sistema.

Sin embargo, al analizar cuidadosamente los resulta-

dos experimentales, podemos observar que la DBO en la mayoría de los muestreos es muy alta, y aunque en algunos casos la eficiencia de eliminación es del 85 % (Tabla 8) la DBO en el efluente sigue siendo alta. Esto indica un problema de sobrecarga de materia orgánica. En la Tabla 8 se puede observar también que en los meses que van de Agosto a Octubre la eficiencia de eliminación para la DBO está, en promedio, por abajo del 37 %.

De manera general la zona del efluente tuvo la mayor DBO del sistema durante todos los muestreos (Gráfica 4), con valores máximos de 400 mg/l de DBO y valores promedio de 250 mg/l de DBO. Los valores promedio mínimos para el efluente fueron de 100 mg/l de DBO. Estos datos, en función de la nitrificación, significan que el sistema no está en condiciones adecuadas para llevar a cabo la nitrificación, ya que las bacterias que demandan mayor cantidad de oxígeno son más abundantes y activas en un nivel de competencia con las nitrificantes Nitrosomonas y Nitrobacter.

Con respecto a la demanda química de oxígeno (DQO) la situación es semejante, sobre todo considerando su eficiencia de eliminación (Tabla 8) cuyo valor promedio no sobrepasa al 31 %. Si tomamos en cuenta que la DQO es eliminada en gran parte por procesos físicos, como en el caso del estanque, por sedimentación, la frecuencia de sobrecarga de materia orgánica hará que la sedimentación no sea muy eficiente y por lo tanto la tasa de eliminación de la DQO será muy baja.

La gráfica 5 aunque muestra una gran variabilidad en

la DQO a través del tiempo, en términos operacionales no presenta diferencias significativas en los valores de la DQO con respecto a las tres zonas del estanque, esto puede ser interpretado, como ya se mencionó anteriormente, como una deficiencia en la capacidad de eliminación de productos por sedimentación y por lo tanto como un contribuyente al déficit de oxígeno en el sistema.

Potencial hidrógeno (pH).

Los valores de pH del estanque de estabilización durante toda la etapa de muestreos estuvieron orientados hacia el lado alcalino (Gráfica 6), con un valor promedio de 8.4. En esta gráfica también se observa que en dos ocasiones (Septiembre-October) el pH alcanzó las 11 unidades. Esta evolución de pH a valores tan altos puede atribuirse a un estado temporal de crecimiento explosivo algal; las algas, al consumir el CO_2 disuelto en el agua desequilibran la relación ácido-base de esta, desplazando el pH hacia condiciones alcalinas.

El pH fue ligeramente mayor cerca del efluente, pero las diferencias con la zona intermedia y del efluente no son significativas como lo demuestran los análisis de Kruskal-Wallis (Tabla 6) y de t de Student (Tabla 7).

La relevancia que tiene el hecho de que el estanque de estabilización haya estado orientado hacia un pH alcalino, con respecto a la nitrificación es el hecho de que las bacterias nitrificantes solo pueden oxidar amoníaco y nitrito bajo estas condiciones de pH. Previamente se ha mencionado que un pH de 7

o menor, inhibe la nitrificación al desacoplar o destruir el mecanismo enzimático de Nitrosomonas y Nitrobacter.

Temperatura.

No se reporta en la literatura un valor promedio óptimo en sistemas de tratamiento de aguas de desecho doméstico para que se lleve a cabo la nitrificación. El ámbito de temperatura favorable, puede depender de factores operacionales propios de cada sistema, como por ejemplo, oxígeno disuelto, pH, carga orgánica, etc. Sin embargo, se ha reportado que sistemas de nitrificación biológica han tenido problemas serios cuando la temperatura baja de 8 °C (Sharma, 1977).

El estanque estudiado presento fluctuaciones de temperatura a través del tiempo (Gráfica 7). Sin embargo, esas variaciones no están en relación a las zonas A, B y C, como se muestra en la Tabla 5.

Las diferencias de temperatura entre las tres diferentes zonas son mínimas, y pueden ser explicadas por el hecho de que el agua del afluente llega a través de un tubo subterráneo que no recibe los rayos de sol; en cambio, hacia la zona del efluente el agua recibe los rayos solares directamente, esta radiación por lo tanto eleva la temperatura del agua con respecto al afluente.

Las temperaturas del agua para todos los casos, pueden considerarse templadas y son adecuadas para que la nitrificación se pudiera llevar a cabo.

Nitrógeno amoniacal.

De las tres formas de nitrógeno analizadas la que se presentó en mayor concentración en el estanque de estabilización fue el nitrógeno amoniacal, el pH alcalino del agua favoreció la presencia del amoniaco en su forma ionizada es decir en forma de amonio (NH_4^+).

El amoniaco es la forma más común en que se presenta el nitrógeno en desechos de tipo doméstico, cuando las proteínas son degradadas por acción bacteriana (proteolisis). Este proceso se ve favorecido por condiciones de baja tensión de oxígeno o por anoxia completa.

El valor promedio de amoniaco disuelto en el agua fue de 25 mg/l, cantidades ligeramente mayores a este promedio sólo fueron detectadas en la zona del afluente. Esto concuerda con el hecho de que esa es precisamente el area de producción de amoniaco en el estanque. No obstante, el análisis de datos por la prueba de Kruskal-Wallis (Tabla 6), de las tres zonas estudiadas muestra que no existen diferencias significativas entre los valores de este parámetro.

La gráfica 8 apoya lo expresado anteriormente. De manera general se observa un comportamiento muy similar entre las zonas A, B y C, aunque es posible apreciar un ligero incremento en la concentración de amoniaco en la zona A (del afluente). Por otra parte la zona C (del efluente) tuvo concentraciones más bajas de amoniaco. Esta baja en la concentración de amoniaco disuelto en el agua, bien pudo deberse a un consumo por parte

de bacterias nitrificantes (nitrificación a baja escala). Se piensa que si la cantidad de OD hubiese sido mayor la concentración de amoníaco habría disminuido drásticamente ya que hay muchos parámetros adecuados para que se lleve a cabo la nitrificación (a excepción claro, del oxígeno). Otra parte del amoníaco, parece haber sido consumida por algas (Hawkes, 1983) incorporado a su soma como fuente de nitrógeno para síntesis de proteínas, y otra parte más se liberó al ambiente.

Un hecho aparente es que el estanque no aprovecha el amoníaco por nitrificación, y esto se puede comprobar al analizar la Tabla 8 de eficiencia de eliminación para el amoníaco. En dicha tabla el porcentaje promedio de eliminación no sobrepasa el 60 % lo que se considera un valor muy bajo (poco eficiente) para cualquier estanque de estabilización.

Nitritos y nitratos.

Los nitritos (NO_2^-) y los nitratos (NO_3^-) se encontraron en concentraciones muy bajas (valores promedio de 6 μg y 8 mg/l respectivamente) estas cantidades consideradas despreciables para cualquier estanque que efectúe la nitrificación, se deben principalmente a las condiciones casi anóxicas del estanque de estabilización que no favorecen el desarrollo de las bacterias nitrificantes, y por lo tanto la producción de los productos finales de su metabolismo (nitritos y nitratos) es muy baja. Si consideramos también que las algas consumen NO_2^- y NO_3^- como fuente de nitrógeno para su síntesis proteica, no es sorprendente que las cantidades de estos metabolitos sean muy

bajas.

Sólo para ilustrar este fenómeno, las gráficas 9 y 10 muestran que los nitratos y los nitritos se manejan en valores mínimos.

Si tomamos en cuenta que la producción de nitritos y de nitratos es el parámetro que determina el grado de actividad nitrificante de cualquier sistema, entonces se puede demostrar que la nitrificación que se está llevando a cabo en el estanque de estabilización estudiado es en mínima escala.

Tiempo de retención.

El tiempo de retención teórico calculado según la fórmula de Gloyna (1973) para el estanque estudiado fue de 20.78 días. Es muy probable que el tiempo de retención real sea mucho menor, este hecho se debe a la reducción en el volumen de agua del estanque provocada por el azolvamiento que es favorecido por el predominio de las condiciones anaerobias y microaerofílicas (debidas a la alta carga de materia orgánica que llega al sistema) y que hacen más lenta la degradación de los desechos.

Todo lo anterior explica que aunque se tenga un tiempo de retención alto (Gloyna, 1973) el funcionamiento del sistema no sea muy adecuado. Esto puede observarse en la gráfica 11 de eficiencia de eliminación de DBO, DQO y NH_4 , ahí se demuestra que la carga es demasiada y no ocurre un tratamiento eficiente de los desechos.

6.

CONCLUSIONES

La revisión previa de las investigaciones sobre los aspectos de la nitrificación que se han hecho en todo el mundo, establecen parámetros de comparación muy precisos para evaluar el grado de actividad nitrificante que ocurre en cualquier sistema.

Se han descrito los parámetros que afectan a la nitrificación, así como las características de las reacciones bioquímicas más notables de los organismos nitrificantes.

Tomando como marco el esquema de los sistemas de nitrificación tipo, se evaluó el estanque de estabilización de aguas residuales localizado en el poblado de Santo Tomás Atzingo en el Estado de México.

Aquí es preciso señalar que el sistema de estanques de Santo Tomás Atzingo no fue diseñado originalmente para trabajar como un sistema que sirviera para la remoción de desechos exclusivamente por nitrificación. La estrategia era que trabajaran como lagunas facultativas de gran eficiencia. Se esperaba que en las zonas del efluente la eliminación de la DBO fuera alta, para que el nivel de OD no fuera menor de 1 mg/l. Bajo estas condiciones existiría una alta probabilidad de que el sistema pudiera remover gran cantidad de nitrógeno del agua por nitrificación.

Este estudio se hizo para detectar si ocurría, o no, la nitrificación, y en caso positivo valorar su grado de actividad.

Hecha esta advertencia podemos decir, con respecto al estanque estudiado, lo siguiente:

El factor principal que determinó el comportamiento fisicoquímico del estanque fue la elevada carga orgánica que llega al sistema. La influencia ejercida por este factor se reflejó en tasas altas de DBO y DQO, llevando al OD a valores mínimos. Las eficiencias de eliminación para la DBO, la DQO y el amoníaco fueron muy bajas.

Puede considerarse que el estanque funcionó principalmente como un sedimentador primario, debido a la inexistencia de un tratamiento previo, esto nos conduce a recomendar que para mejorar la eficiencia del tratamiento sería muy conveniente la instalación de un sistema de tratamiento previo.

De esto, se puede concluir que las condiciones para que la nitrificación ocurra en este sistema, son muy adversas. Más aún, los valores de nitritos y nitratos fueron tan bajos, que se puede afirmar que la nitrificación es mínima, y en algunas ocasiones no ocurre.

La presencia de bacterias nitrificantes en el estanque de estabilización indica tan sólo su permanencia en el sistema, pero no podemos asegurar que ejerzan una actividad importante.

Otro aspecto poco estudiado, y que en este trabajo no se pudo determinar, es como afecta la competencia de bacterias heterótrofas a Nitrosomonas y a Nitrobacter.

Por otra parte, las bacterias Nitrosomonas europaea y Nitrobacter winogradskyi, aisladas a partir de muestras de agua del efluente, mostraron una gran actividad de oxidación, lo que pone de manifiesto que a pesar de encontrarse en ambientes extremos, pueden recuperar su actividad metabólica normal.

Considerando todos los factores mencionados, podemos concluir que:

- El estanque de Santo Tomás Atzingo trabaja bajo condiciones extremas, principalmente por la elevada carga orgánica.

- Sí existen bacterias nitrificantes en el sistema, pero sólo en número muy limitado.

- Las microcantidades de oxígeno disponibles para oxidar materia orgánica por Nitrosomonas europaea y Nitrobacter winogradskyi, son insuficientes para llevar a cabo la nitrificación propiamente dicha.

- Las bacterias nitrificantes aisladas del agua residual, mostraron en condiciones adecuadas de laboratorio, actividad nitrificante normal.

- Es posible evaluar la actividad nitrificante de casi cualquier sistema, considerando sólo sus propiedades fisicoquímicas.

Finalmente, aunque como ya lo hemos mencionado, el motivo de este trabajo fue solo el de estudiar un fenómeno, en particular (la nitrificación), se cree conveniente recomendar que el cuerpo de agua estudiado debe ser modificado integralmente, ya que los propósitos para los cuales fue creado, no se sa-

tisfacen.

La calidad del diseño y construcción de estos sistemas es importante, pues de esto depende que el trabajo se realice con poco esfuerzo humano y recursos materiales mínimos. Por esto, el estudio integral de ellos como base para sistemas más avanzados es fundamental en el quehacer para la prevención de la contaminación.

7.

T A B L A S

TABLA 3 Resultados de la prueba de normalidad según Kolgomorov (Doménech, 1977) aplicada a los datos de los parámetros de cada una de las 3 zonas en las que se dividió el estanque.

Distribución Normal	Distribución No Normal
Temperatura	DQO
DBO	Oxígeno
Nitratos	Amoniaco
	pH
	Nitritos
	OD

TABLA 4 Análisis de varianza simple de los valores de los parámetros fisicoquímicos (DBO, NO_3^- y temperatura) de las 3 zonas en que se dividió el estanque.

1. Demanda Bioquímica de Oxígeno : Valor obtenido de $F = 7.2978$
SI EXISTEN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS
2. Nitratos : Valor obtenido de $F = 0.6267$
NO EXISTEN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS
3. Temperatura : Valor obtenido de $F = 1.006$
NO EXISTEN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS

* Valor de F en tablas (nivel de significancia del 0.05 %) = 3.11

Grados de libertad debidos al tratamiento = 2

Grados de libertad debidos al error = 87

TABLA 5 Prueba de Kruskal-Wallis de los valores de 5 variables fisicoquímicas entre las 3 zonas en que se dividió el estanque (Daniel, 1980; Duran, 1986).

1. Demanda Química de Oxígeno	: Valor obtenido de H 4.2419 NO EXISTEN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS
2. pH	: Valor obtenido de H 0.9094 NO EXISTEN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS
3. Oxígeno disuelto	: Valor obtenido de H 4.9609 NO EXISTEN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS
4. Amoniaco	: Valor obtenido de H 5.3618 NO EXISTEN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS
5. Nitritos	: Valor obtenido de H 0.8472 NO EXISTEN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS

Valor en tablas con un nivel de significancia de 0.05 % = 5.991

TABLA 6. Prueba de t de Student entre los datos fisicoquímicos del afluente y efluente (Doménech, 1977; Durán, 1986).

1 Temperatura	Valor encontrado de t 4.202 SI EXISTEN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS
2 Demanda Química de Oxígeno	Valor encontrado de t 3.8945 SI EXISTEN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS
3 pH	Valor encontrado de t 0.5929 NO EXISTEN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS
4 Demanda Bioquímica de Oxígeno	Valor encontrado de t 3.7477 SI EXISTEN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS
5 Amoníaco	Valor encontrado de t 2.6163 SI EXISTEN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS
6 Oxígeno Disuelto	Valor encontrado de t -4.4552 SI EXISTEN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS
7 Nitritos	Valor encontrado de t -0.4128 NO EXISTEN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS
8 Nitratos	Valor encontrado de t 1.3776 NO EXISTEN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS

Valor de t de tablas (con un nivel de significancia de 0.05 %) \pm 1.86
Grados de libertad = 8

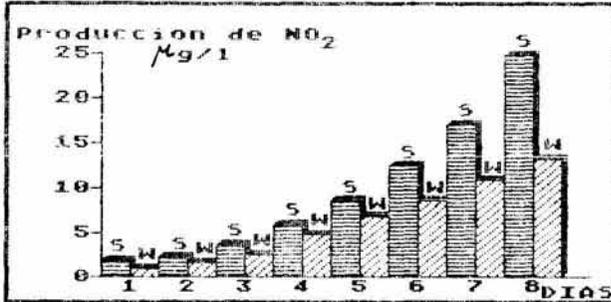
TABLA 7. Eficiencia de eliminación de 3 variables fisicoquímicas durante cada muestreo (Gloyna, 1973).

Fecha de Muestreo (1983)	D.B.O. %E *	D.Q.O. %E *	NH ₄ ⁺ %E *
Agosto 15	52.6	44.4	65
Agosto 22	30.0	30.0	61.8
Septiembre 5	22.85	10.0	42.86
Septiembre 19	3.84	3.44	24.35
Octubre 3	22.58	52.38	78.9
Octubre 17	44.82	43.75	56.45
Octubre 21	85.0	40.0	71.2
Noviembre 7	82.85	14.0	70.0
Noviembre 11	85.0	36.0	75.57

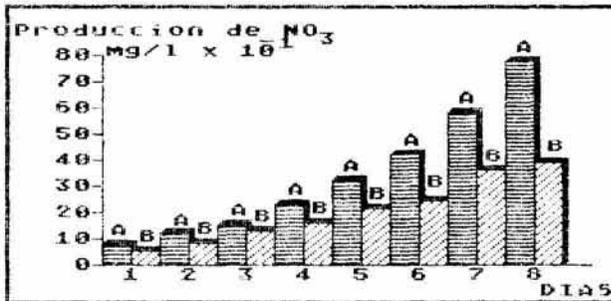
* %E = Porcentaje de eliminación

8.

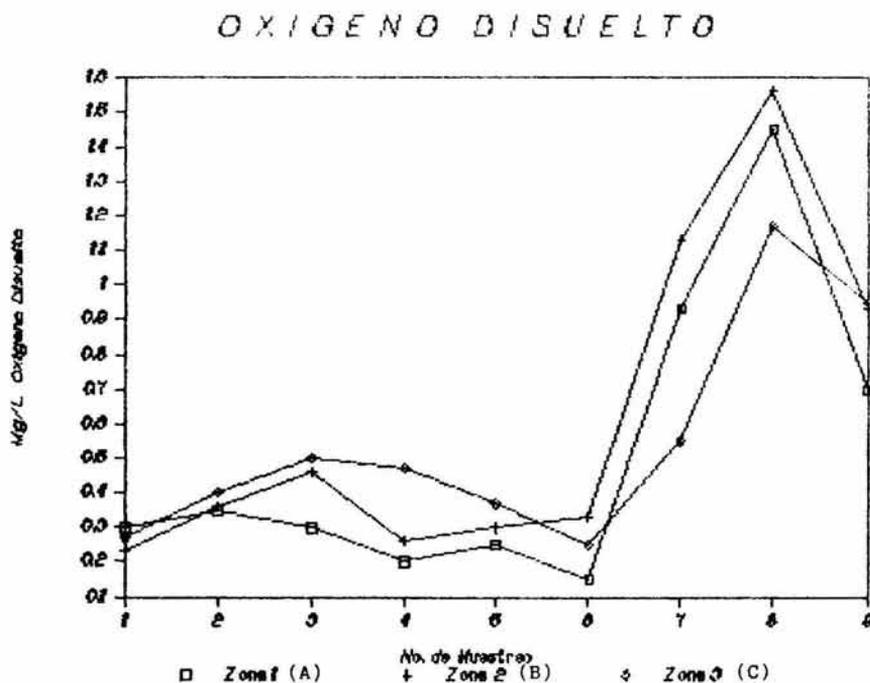
G R A F I C A S



GRAFICA 1. Comparación de los medios de enriquecimiento para bacterias amoníaco-oxidantes.
S= Medio de Soriano y Walker
W= Medio básico de Winogradskyi



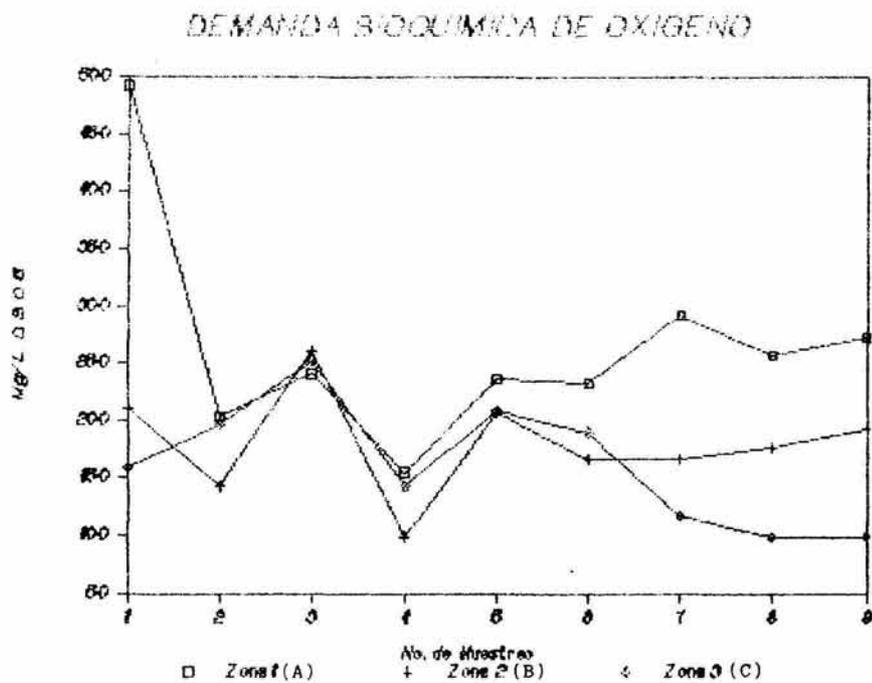
GRAFICA 2. Comparación de los medios de enriquecimiento para bacterias nitrito-oxidantes.
A= Medio de Aleem y Alexander
B= Medio básico de Winogradskyi



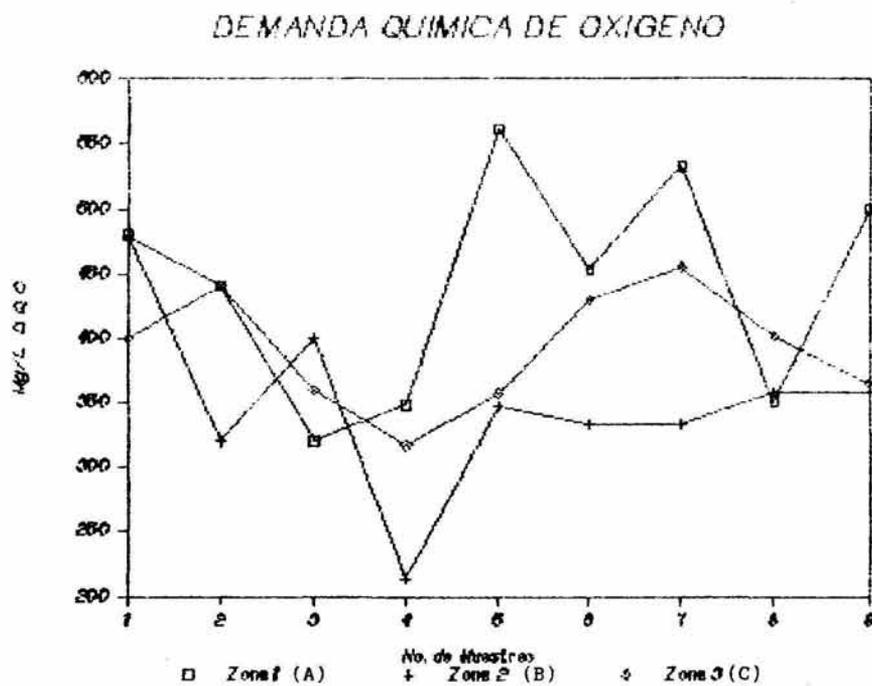
GRAFICA 3. Se observa el comportamiento del OD en las tres zonas del estanque estudiado. El eje X (número de muestreo) corresponde a las siguientes fechas del año de 1983:

- 1 = Agosto 15
- 2 = Agosto 22
- 3 = Septiembre 5
- 4 = Septiembre 19
- 5 = Octubre 3
- 6 = Octubre 17
- 7 = Octubre 21
- 8 = Noviembre 7
- 9 = Noviembre 11

* Estas fechas de muestreo son las mismas para todos los parámetros fisicoquímicos hechos en este trabajo.

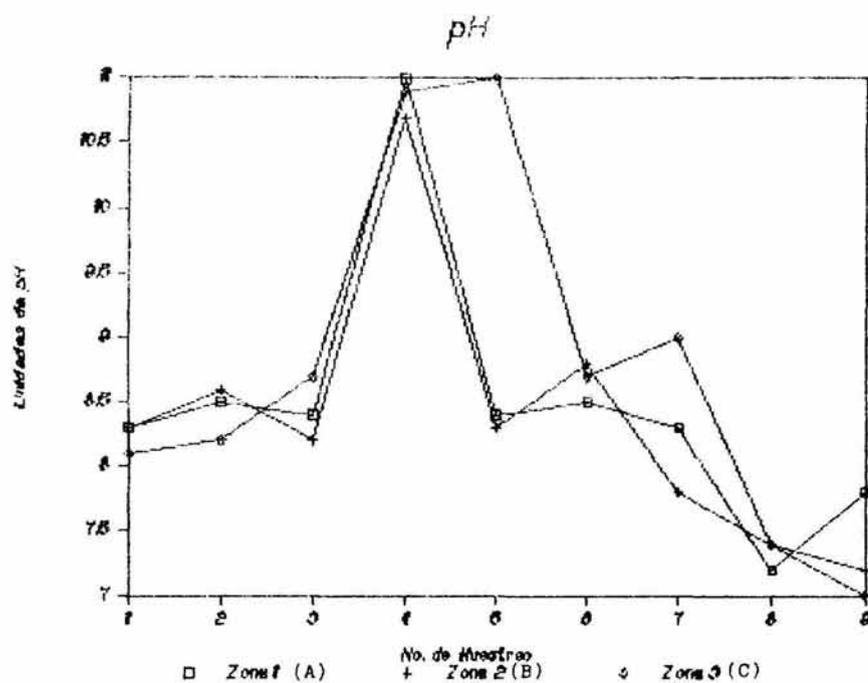


GRAFICA 4. Patrón de variación de la DBO_5 en las zonas del estanque.



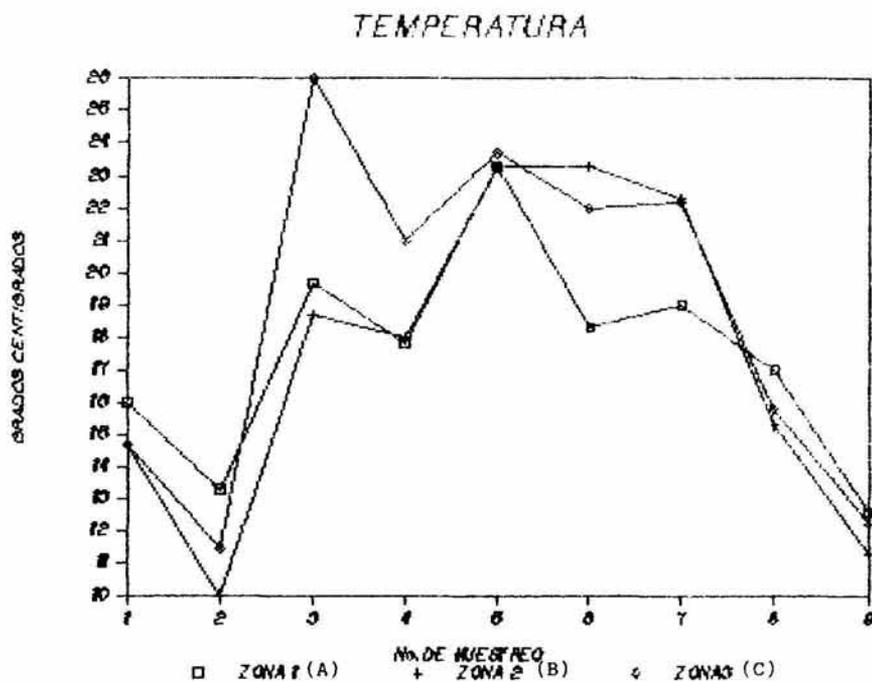
GRAFICA 5. Variabilidad de la DQO a través del tiempo en las 3 zonas del estanque.

* Ver página 105.



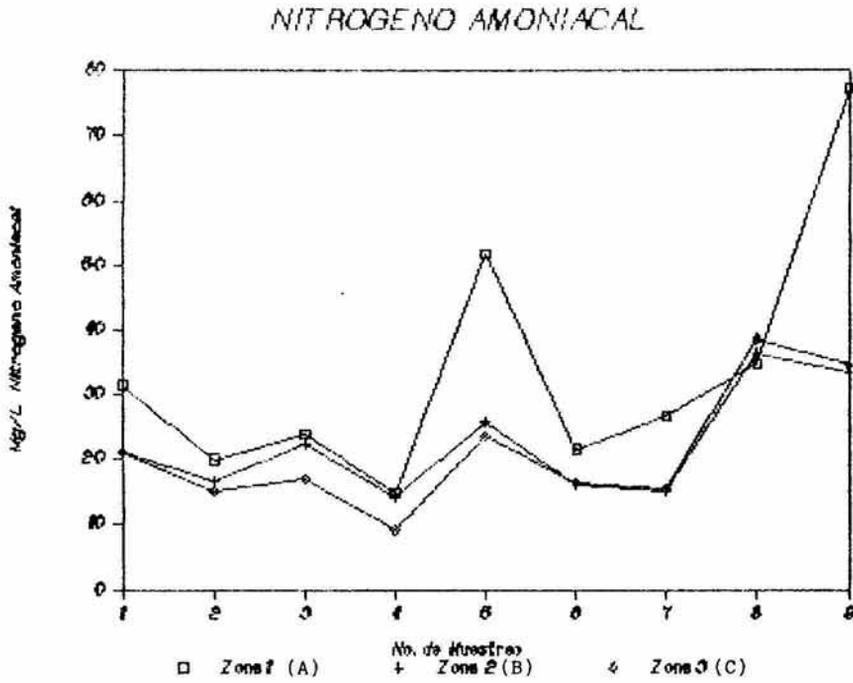
GRAFICA 6. Fluctuación de los valores de pH en el estanque estudiado.

* Ver nota en página 105.



GRAFICA 7. Diferencias de temperatura en las 3 zonas del estanque.

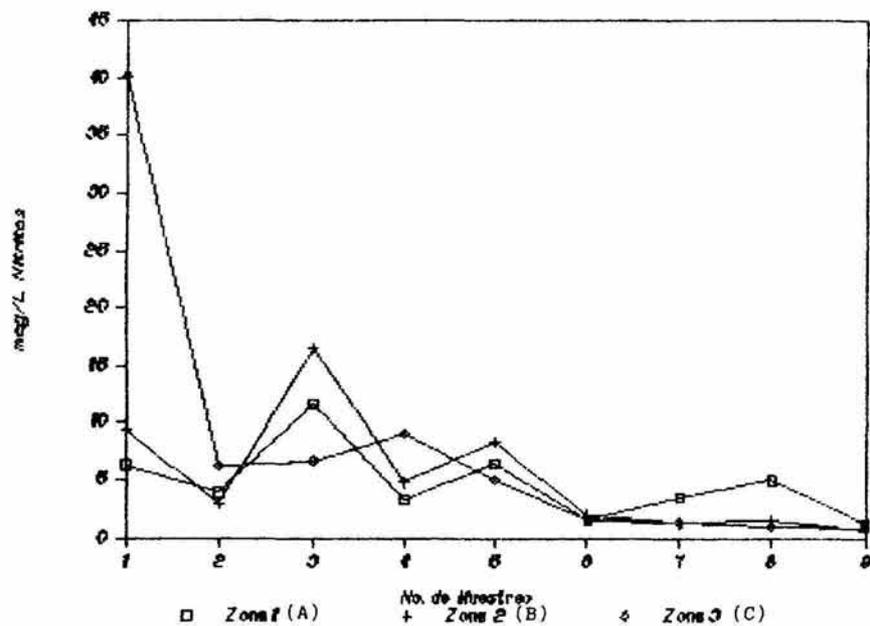
* Ver nota página 105.



GRAFICA 8. Concentraciones de Nitrógeno amoniacal a lo largo del estudio en el estanque de estabilización.

* Ver nota, página 105.

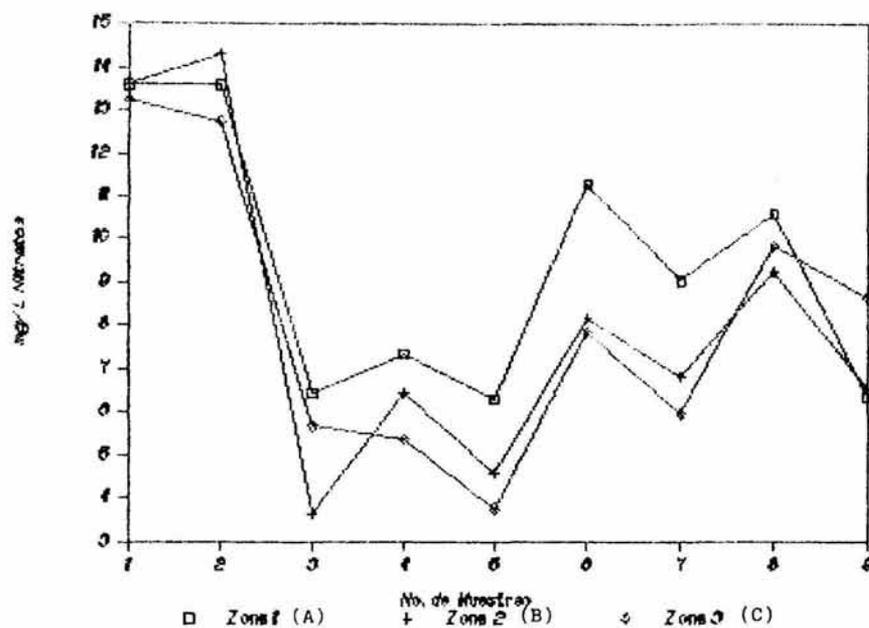
NITRITOS



GRAFICA 9. Concentracion de nitritos encontrados en el estanque a través del tiempo.

*Ver nota, página 105.

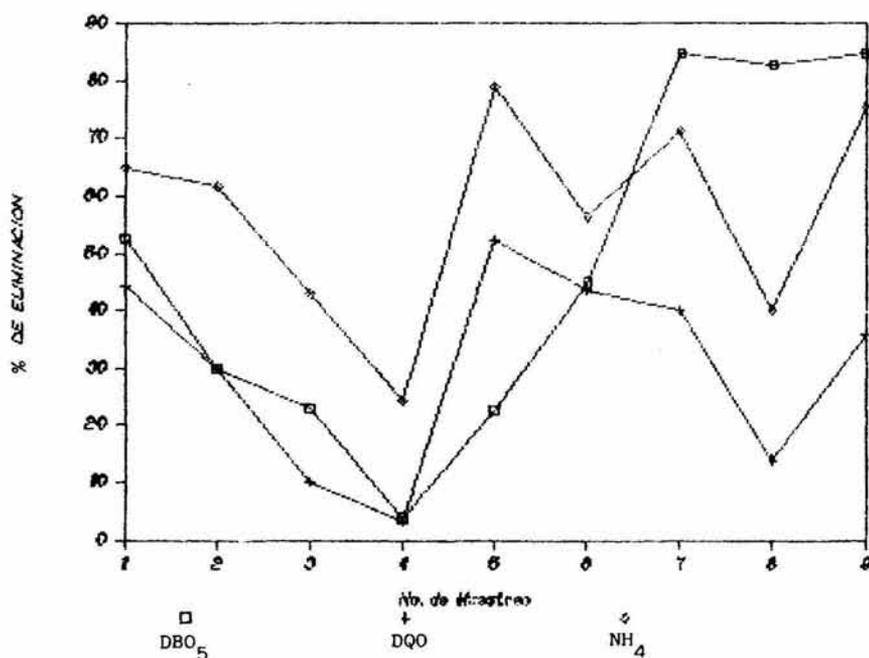
NITRATOS



GRAFICA 10. Variación de la concentración de nitratos en las diferentes zonas del estanque.

* Ver nota en página 105.

EFICIENCIA DE ELIMINACION



GRAFICA 11. Porcentaje de eficiencia de eliminación de DBO, DQO y NH₄.

* Ver nota en página 105.

9.

A N E X O .

MEDIOS DE CULTIVO PARA BACTERIAS AMONIACO-OXIDANTES

Medio de Soriano y Walker (en Watson, 1981).

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	500 mg
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	40 mg
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	40 mg
Fe(citrato de fierro)	0.5 mg
Rojo de fenol	0.5 mg
Agua destilada	1000 ml

Medio básico de Winogradskyi con amonio (Rodina, 1972).

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2 g
K_2HPO_4	1 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.5 g
NaCl	2 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.4 g
Cal(se precipita)	trazas
Agua destilada	1000 ml

Ambos medios se esterilizan en autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos.

Medio en placa de gel de sílice con amonio (Rodina, 1972).

SOLUCION A

HCl concentrado Q.P.	61 ml
Agua destilada	39 ml

SOLUCION B

Silicato de sodio	18 ml
Agua destilada	82 ml

Se mezclan las soluciones A y B y se dializan con agua corriente durante toda la noche para quitar el exceso de HCl. Ya dializadas se vacían en cajas de Petri y se dejan gelificar.

Cada caja se impregna con 2.0 ml de solución salina de Winogradskyi con amonio y CaCO_3 esterilizadas a 15 libras de presión 15 minutos.

Solución salina de Winogradskyi con amonio y CaCO_3 :

Solución salina de Winogradskyi	100 ml
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.0 g
CaCO_3	25.0 g

Solución salina de Winogradskyi

K_2HPO_4	5.0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.5 g
NaCl	2.5 g
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	0.05 g
MnSO_4	0.05 g
Agua destilada	1000 ml

MEDIOS DE CULTIVO PARA BACTERIAS NITRITO-OXIDANTES

Medio de enriquecimiento de Aleem y Alexander (Watson, 1981).

KNO_2	300 mg
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	187.5 mg
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	12.5 mg
KH_2PO_4	500 mg
K_2HPO_4	500 mg
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	10 mg
KHCO_3	1500 mg
NaCl	187.5 mg
Agua destilada	1000 ml

Medio básico de Winogradsky con nitrito (Rodina, 1972).

NaNO_2	1.0 g
Na_2CO_3	1.0 g
NaCl	0.5 g
K_2HPO_4	0.5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.3 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.4 g
Agua destilada	1000 ml

Ambos medios se esterilizan en autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos.

Medio en placa de gel de sílice con nitrito (Rodina, 1972)

Las placas se preparan mezclando y dializando las soluciones A y E utilizadas en el medio anteriormente mencionado de gel de sílice con amonio. Solamente que en este caso en lugar de agregar solución salina de Winogradskyi con amonio, se adicionan 2.0 ml de solución salina de Winogradskyi con nitrito:

Solución salina de Winogradskyi	100 ml
NaNO_2	1.0 g
CaCO_3	25.0 g

10.

B I B L I O G R A F I A .

BIBLIOGRAFIA

- AGUIRRE J. 1967. NITRIFICATION AND DENITRIFICATION IN A MODEL WASTE STABILIZATION POND. M.SC. THESIS. THE UNIVERSITY OF TEXAS, AUSTIN TEXAS.
- ALEEM M.L.H. 1966. GENERATION OF REDUCING POWER IN CHEMOSYNTESIS. II. ENERGY-LINKED REDUCTION OF PYRIDINE NUCLEOTIDES IN THE CHEMOAUTOTROPH NITROSOMONAS EUROPAEA. BIOCHIM.BIOPHYS ACTA 113 PP. 216-224.
- ANDERSON J.H. 1965 STUDIES ON THE OXIDATION OF AMMONIA BY NITROSOMONAS. BIOCHIM. J. 95 PP. 688-698.
- APHA, AWWA AND WPCF. 1980. STANDARD METHODS FOR EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER. JOIN EDITORIAL BOARD, WASHINGTON, D.C. 15 TH. ED.
- BALAKRISHNAN S. & ECKENFELDER W.W. 1969. NITROGEN RELATIONSHIPS IN BIOLOGICAL TREATMENT PROCESSES. II. NITRIFICATION IN TRICKLING FILTERS. WATER RESEARCH, VOL. 3 PP. 167-174.
- BECCARI M., MARANI D. & RAMADORI R. 1979. A CRITICAL ANALYSIS OF NITRIFICATION ALTERNATIVES. WATER RESEARCH VOL. 13 PP. 185-192.
- BECKER K.P. 1979. DAS OXITRON-SYSTEM, EIN NEUES BIOLOGISCHES ABWASSERREINIGUNGS - VERFAHREN FUR DEN BSB5-ABBAU SOWIE ZUR NITRIFIKATION UND DENITRIFIKATION. CHEM. ING. TECH. 51 NR. 6.S. 549-559.
- BILLEN G. 1976. EVALUATION OF NITRIFYING ACTIVITY IN SEDIMENTS BY DARK 14 C-BICARBONATE INCORPORATION. WATER RESEARCH 10 PP. 51-57.
- BROCKETT O.D. 1977. NITROGENOUS COMPOUNDS IN FACULTATIVE OXIDATION PONDS SEDIMENTS. WATER RESEARCH VOL. 11 PP. 317-321.
- BROWN R.L. 1975. THE OCURENCE AND REMOVAL OF NITROGEN IN SUBSURFACES AGRICULTURAL DRAINAGE FROM THE SAN JOAQUIN VALLEY, CALIFORNIA. WATER RESEARCH. VOL. 9 PP. 317-321.
- BUCHANAN R.E. 1974. BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY , 5 TH. EDITION, WILLIAM AND WILKINS COMPANY. BALTIMORE USA.
- CARLUCCI A.F. & STRICKLAND J.D.H. 1968. THE ISOLATION, PURIFICATION AND SOME KINETICS STUDIES OF MARINE NITRIFYING BACTERIA. J. EXP. MAR. BIOL. ECOL. VOL. 12 PP. 156-166.
- CHRISTENSEN M.H. & HARSENDES P. 1978. NITRIFICATION AND DENITRIFICATION IN WASTE WATER TREATMENT. WAT. POLLUT. MICROBIOL. VOL. 2 P. 391.
- CLARK J.W. 1977. WATER SUPPLY AND POLLUTION CONTROL. 3RD. EDITION. THOMAS Y. CROWELL COMPANY INC. NEW YORK USA.

- COBLEY J.G. 1976. ENERGY-CONSERVING REACTION IN PHOSPHORYLATING ELECTRON-TRANSPORT PARTICLES FROM NITROBACTER WINOGRADSKYI. BIOCHEM J. 156 PP 481-491.
- CONN E.E. & STUMPF P.K. 1978. BIOQUIMICA FUNDAMENTAL 3A. EDICION EDIT. LIMUSA MEXICO.
- DELWICHE C.C. & FINSTEIN M.S. 1965. CARBON AND ENERGY SOURCES FOR THE NITRIFYING AUTOTROPH NITROBACTER. J. BACT. 90 PP. 102-017.
- DELWICHE C.C. 1970. EL CICLO DEL NITROGENO. PP. 229-238. EN ECOLOGIA, EVOLUCION Y BIOLOGIA DE POBLACIONES. SELECCIONES DEL SCIENTIFIC AMERICAN. H. BLUME EDICIONES, MADRID 319 PP.
- DODAKUNDI G.B. & RODGI S.S. 1975. WASTE STABILIZATION PONDS. A REVIEW. KARNATAK UNIV. J. (SCI) VOL. 20 PP. 191-217.
- DOMENECH M.J. 1977. BIOESTADISTICA 2DA. EDICION ED. HARDER. BARCELONA ESPAÑA 642 PP.
- DOWNING A.L. 1968. FACTORS TO BE CONSIDERED IN THE DESIGN OF ACTIVATED SLUDGE PLANTS. IN ADV. WAT. QUAL. IMPROV. EDITED BY ALYONA L. ECKENFELDER W.W. UNIVERSITY OF TEXAS PP. 190-193.
- DURAN D.A. 1986. MANUAL DE TECNICAS ESTADISTICAS. EDITADO POR LA CARRERA DE BIOLOGIA. DEPARTAMENTO DE METODOLOGIA EXPERIMENTAL, AREA DE MATEMATICAS. ENEPI. MEXICO 140 PP.
- EGGERS E. & TERLOUWT 1979. BIOLOGICAL DENITRIFICATION IN A FLUIDIZED BED WITH SAND AS CARRIER MATERIAL. WATER RESEARCH VOL. 13 PP. 1077-1090.
- EHRETH A.J. & BASILICO J.B. 1974. AN OVERVIEW OF NITROGEN CONTROL TECHNOLOGY IN MUNICIPAL WASTEWATER TREATMENT. A.I.CH.E. SYMP.SER. 71, 57-69.
- ENGEL M.S. & ALEXANDER M. 1958. GROWTH AND AUTOTROPHIC METABOLISM OF NITROSOMONAS EUROPAEA. J. BACTERIOL. VOL. 76 PP 217-222.
- ENGEL M.S 1961. MORPHOLOGY OF NITROSOMONAS EUROPAEA AND CLASSIFICATION OF THE NITRIFYING BACTERIA. J.BACT. VOL. 81 PP. 833-834.
- EPA (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY) 1975 PROCESS DESIGN MANUAL FOR NITROGEN CONTROL. OFFICE OF TECHNOLOGY TRANSFER, CINCINNATI, OHIO.
- FAIR G.M., GEYER J. CH. & OKUN D.A. 1979. PURIFICACION DE AGUAS TRATAMIENTO Y REMOCION DE AGUAS RESIDUALES. VOL. II JOHN WILLEY AND SONS INC. 764 PP.
- FINSTEIN M.S. & BIRZKY M.R. 1972. RELATIONSHIP OF AUTOTROPHIC AMMONIUM-OXIDIZING BACTERIA TO MARINE SALTS. WATER RESEARCH VOL. 6 PP. 31-40.

- FOCHT D.D. & VERSTRAETE W. 1977. BIOCHEMICAL ECOLOGY OF NITRIFICATION AND DENITRIFICATION. IN ADVANCES IN MICROBIAL ECOLOGY. VOL. 1 . PLENUM PRESS. PP. 135-214.
- FRITZ J.J., MIDDLETON A.C. & MEREDITH D.D. 1979. DYNAMIC PROCESS MODELING OF WASTEWATER STABILIZATION PONDS. JOUR. WAT. POLLUT. CONTROL FED. 51:11 PP. 2725-2742.
- GARCIA E. 1975. MODIFICACIONES AL SISTEMA DE CLASIFICACION CLIMATICA DE KOPPEN. "A. EDICION UNAM INSTITUTO DE GEOGRAFIA MEXICO.136 PP.
- GAUDY A.F. & GAUDY E.T. 1981. MICROBIOLOGY FOR ENVIRONMENTAL SCIENTISTS AND ENGINEERS. MC. GRAW-HILL 736 PP.
- GLOYNA E.F. 1973. ESTANQUES DE ESTABILIZACION DE AGUAS RESIDUALES. ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. GENOVA SUIZA. 190 PP.
- GOTTSCHALK G. 1979. CHEMOLITOTROPHIC AND PHOTOTROPHIC METABOLISM IN BACTERIAL METABOLISM 2ND. EDITION SPRIG-VERLAG NEW YORK.
- GUJER W. & ERNI P. 1978. THE EFFECT OF DIURNAL AMMONIUM LOAD VARIATION ON THE PERFORMANCE OF NITRIFYING ACTIVATED SLUDGE PROCESSES. PROG. WAT. TECH. VOL. 10 NO. 5/6 PP. 391-407.
- HAWKES H.A. 1983. STABILIZATION PONDS. IN CURDS C.R. & HAWKES H.A. (EDS). ECOLOGICAL ASPECTS OF USED-WATER TREATMENT VOL. 2 ACADEMIC PRESS LONDON PP. 163-217.
- HEIDMAN J.A. 1979 SEQUENTIAL NITRIFICATION-DENITRIFICATION IN A PLUG FLOW ACTIVATED SLUDGE SYSTEM. REPORT OF EPA-D.C. PILOT PLANT.
- HERNANDEZ C. 1982. SELECCION DE DIFERENTES ALTERNATIVAS DE TRATAMIENTO DE AGUAS NEGRAS DE ORIGEN DOMESTICO EN MEDIOS RURALES DE MEXICO. MEMORIAS DEL CURSO "TEMAS SELECTOS DE ECOLOGIA MICROBIANA". UNIVERSIDAD LA SALLE MEXICO.
- HOFFMAN T. & LEES H. 1953. THE BIOCHEMISTRY OF THE NITRIFYING ORGANISMS. 4. THE RESPIRATION AND INTERMEDIARY METABOLISM OF NITROSOMONAS. BIOCHEM J. VOL. 54 PP. 579-583.
- HOFFMAN T. & LEES H. 1952. THE BIOCHEMISTRY OF THE NITRIFYING ORGANISMS. 2. THE FREE-ENERGY EFFICIENCY OF NITROSOMONAS. BIOCHEM J. VOL. 52 PP. 140-142.
- HOOPER A.B., HANSEN J. & BELL R. 1967. CHARACTERIZATION OF GLUTAMATE DEHYDROGENASE FROM THE AMMONIA-OXIDIZING CHEMOAUTOTROPH NITROSOMONAS EUROPAEA. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. VOL 242 N.2 PP. 288-296.
- HOOPER A.B. 1968. A NITRITE-REDUCING ENZYME FROM NITROSOMONAS EUROPAEA PRELIMINARY CHARACTERIZATION WITH HIDROXILAMINE AS ELECTRON DONOR. BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA VOL. 162 PP 49-65.

- HOOPER A.B. 1968. BIOCHEMICAL BASIS OF OBLIGATE AUTOTROPHY IN NITROSOMONAS EUROPAEA. J. BACTERIOL. VOL 97 N. 2 PP. 776-779.
- HOOPER A.B. 1969. LAG PHASE OF AMMONIA OXIDATION BY RESTING CELLS OF NITROSOMONAS EUROPAEA. JOURNAL OF BACTERIOLOGY. VOL. 97:2 PP 968-969.
- HOOPER A.B. 1977. HIDROXILAMINE OXIDOREDUCTASE FROM NITROSOMONAS: INACTIVATION BY HIDROGEN PEROXIDE. BIOCHEMISTRY. VOL. 16 N. 3 PP. 455-459.
- HUANG C.S. & HOPSON N.E. 1974. NITRIFICATION RATE IN BIOLOGICAL PROCESSES. J. ENV. ENGG. DIV. AM. SOC. CIV. ENGRS. VOL. 100 PP 409-422.
- HUTCHINSON G.E. 1975. A TREATISE ON LIMNOLOGY. JOHN WILLEY & SONS. PP 836-877.
- JOHNSON W.K. & VANIA G.B. 1971. NITRIFICATION AND DENITRIFICATION OF WASTEWATER. FINAL REPORT. RESEARCH GRANT NO. WP 01028, UNIVERSITY OF MINNESOTA, MINNEAPOLIS. 136 PP.
- KELLY D.P. 1981. INTRODUCTION TO THE CHEMOLITOTROPHIC BACTERIA. VOL 1. PP. 997-1004. IN STARR M.P., STOLP H., TRUPPER H.G., BALOWS A. & SCHLEGEL H.G. (EDS). THE PROKARYOTES. SPRINGER-VERLAG NY. 1102 PP.
- KIESOV L.A. 1972. A BIOLOGICAL ASSIMILATION OF INORGANIC ENERGY. ALDRICHIMICA ACTA. VOL. 5 PP. 33-37.
- KIFF R.J. 1972. THE ECOLOGY OF NITRIFICATION/DENITRIFICATION SYSTEMS IN ACTIVATED SLUDGE. WAT. POLLUT. CONTROL. V. 71 PP. 475-484.
- KOTZE J.P., THIEL P.G. & HATLINGH W.H.J. 1969. ANAEROBIC DIGESTION. II. THE CHARACTERIZATION AND CONTROL OF ANAEROBIC DIGESTION. WATER RESEARCH VOL. 3 PP. 459-494.
- LEES H. 1952. THE BIOCHEMISTRY OF THE NITRIFYING ORGANISMS. 1. THE AMMONIA-OXIDIZING SYSTEM OF NITROSOMONAS. BIOCHEM. J. 52 PP 134-142.
- LEHNINGER A.L. 1979. BIOQUIMICA . 2ª ED. EDITORIAL OMEGA. BARCELONA ESPAÑA 1117 PP.
- LEWIS R.F. & PRAMER D. 1958. ISOLATION OF NITROSOMONAS IN PURE CULTURE J. BACT. VOL. 76 PP. 524-528.
- LIMON M.J.G. 1979. MICROBIOLOGIA DE LAS LAGUNAS DE ESTABILIZACION. SARH. MEXICO 25 PP.
- MARA D.D. 1978. SEWAGE TREATMENT IN HOT CLIMATES. JOHN WILLEY & SONS 168 PP.
- JETER R.M. & INGRAHAM J.L. 1981. THE DENITRIFYING PROKARYOTES. VOL.1 PP. 913-925. EN STARR M.P., STOLP H., TRUPER H.G., BALOWS A. & SCHLEGEL H.G. (EDS) THE PROKARYOTES. SPRINGER VERLAG. N.Y. 1102 PP.

- MARGALEF R. 1977. ECOLOGIA 2ª ED. EDITORIAL OMEGA, BARCELONA ESPAÑA 951 PP.
- MC. CARTY P.L. BECK L. & ST. AMANT P. 1969. BIOLOGICAL DENITRIFICATION OF WASTEWATER BY ADDITION OF ORGANIC MATERIALS 24 TH. PURDUE INDUSTRIAL WASTE CONFERENCE. PURDUE UNIVERSITY.
- MC. CARTY P.L. & HAUG R.T. 1971. NITROGEN REMOVAL FROM WASTEWATER BY BIOLOGICAL NITRIFICATION AND DENITRIFICATION. EN SYKES G. & SKINER F.A. 1971 MICROBIAL ASPECTS OF POLLUTION 2DN. ED. ACADEMIC PRESS. GREAT BRITAIN. PP. 215-232.
- MORRIS J.C. 1978. MODERN CHEMICAL METHODS. INTERNATIONAL INSTITUTE FOR HYDRAULIC AND ENVIRONMENTAL ENGINEERING DELFT NETHERLANDS VOL. 2 PP 73-91.
- PAINTER H.A. & JONES K. 1963. THE USE OF THE WIDW-BORE DROPPING-MERCURY ELECTRODE FOR THE DETERMINATION OF RATES OF OXIGEN UPTAKE AND OF OXIDATION OF AMMONIA BY MICROORGANISMS. J. APPL. BACT. VOL. 26 PP. 471-483.
- PAINTER H.A. 1970. A REVIEW OF LITERATURE ON INORGANIC NITROGEN METABOLISM IN MICROORGANISM. WATER RESEARCH VOL. 4 PP. 393-450.
- PARKER H.W. 1975. WASTEWATER SYSTEMS ENGINEERING. PRENTICE HALL, INC. USA 412 PP.
- PARKER R.E. 1976. ESTADISTICA PARA BIOLOGOS 1ª ED. EDITORIAL OMEGA, BARCELONA ESPAÑA. 136 PP.
- POPE L.M., HOARE D.S. & SMITH A.J. 1969. ULTRASTRUCTURE OF NITROBACTER AGILIS GROWN UNDER AUTOTROPHIC AND HETEROTROPHIC CONDITIONS. J. OF BACT. VOL. 9 N. 2 PP 936-939.
- POSTGATE J. 1972. BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION. ED. MERROW PUBLISHING CO. LTD. GREAT BRITAIN PP. 161-190.
- PRAKASAM T.B.S. & LOEHR R.C. 1972. MICROBIAL NITRIFICATION AND DENITRIFICATION IN CONCENTRATED WASTES. WATER RESEARCH VOL. 6 PP.859-869.
- PRAKASAM T.B.S., JOO Y.D., SRINATH E.G. & LOEHR R.C. 1974. NITROGEN REMOVAL FROM A CONCENTRATED WASTE BY NITRIFICATION AND DENITRIFICATION. PROC. 29 TH. IND. WASTE CONF. PURDUE UNIV. PP. 497-509.
- PROSSER I.J. & GRAY G.R.T. 1977. NITRIFICATION STUDIES AT NON-LIMITING SUBSTRATE CONCENTRATIONS. JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY VOL. 102, PP 111-117.
- REES M. & NASON A. 1965. A P-450 LIKE CYTOCHROME AND A SOLUBLE TERMINAL OXIDASE IDENTIFIED AS CYTOCHROME O FROM NITROSOMONAS EUROPAEA. BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. VOL. 21 N. 3 PP. 248-256.

- REES M. & NASON A. 1966. INCORPORATION OF ATMOSPHERIC OXYGEN INTO NITRITE FORMED DURING AMMONIA OXIDATION BY NITROSOMONAS EUROPAEA. BIOCHIM BIOPHYS. ACTA. VOL. 113, PP 398-401.
- RHENHEIMER G. 1980. AQUATIC MICROBIOLOGY 2ND. EDITION JOHN WILLEY & SONS N.Y. PP. 153-161.
- RITCHIE G.A.F. & NICHOLAS D.J.D. 1974. THE PARTIAL CHARACTERIZATION OF PURIFIED NITRITE REDUCTASE AND HYDROXILAMINE OXIDASE FROM NITROSOMONAS EUROPAEA. BIOCHEM. J. VOL. 138 PP. 471-480.
- RODINA A.G. 1972. METHODS IN AQUATIC MICROBIOLOGY. UNIVERSITY PARK PRESS LONDON PP. 85-322.
- SPP 1982. DATOS BASICOS SOBRE POBLACION DE MEXICO. COORDINACION GENERAL DE SERVICIOS NACIONALES DE ESTADISTICA GEOGRAFIA E INFORMATICA. MEXICO.
- SAVAGE E.S. & CHEN J.J. 1975. OPERATING EXPERIENCES WITH COLUMNAR DENITRIFICATION. WATER RESEARCH VOL 9 PP. 751-757.
- SHARMA B. & AHLERT R.C. 1977. NITRIFICATION AND NITROGEN REMOVAL. WATER RESEARCH VOL 11 PP. 897-925.
- SIMPSON J.R. 1960. SOME ASPECTS OF THE BIOCHEMISTRY OF AEROBIC ORGANIC WASTE TREATMENT. EN : WASTE TREATMENT (EDITED BY ISAAC P.C.G.) PERGAMON PRESS, OXFORD PP. 1-30.
- SINGER P.C. 1975. OZONIZATION OF AMMONIA IN WASTEWATER. WATER RESEARCH VOL. 9 PP. 127-134.
- SOMVILLE M. 1978. A METHOD FOR THE MEASUREMENT OF NITRIFICATION RATES IN WATER. WATER RESEARCH VOL. 12 PP. 843-848.
- SORIANO S. & WALKER N. 1968. ISOLATION OF AMMONIA-OXIDIZING AUTOTROPHIC BACTERIA. J. APPL. BACT. VOL. 31 PP. 493-497.
- SRINATH E.G., PRAKASAM T.B.S. & LOEHR R.C. 1974. A TECHNIQUE FOR ESTIMATING ACTIVE NITRIFYING SYSTEMS. PROC. 29 TH. IND. WASTE. CONF. PURDUE UNIV. PP. 1038-1048.
- STAFFORD D.A. 1974. THE EFFECT OF PHENOLS AND HETEROCYCLIC BASES ON NITRIFICATION IN ACTIVATED SLUDGES. J. APPL. BACT. VOL. 37 PP 75-82.
- STROM P.F., MATULEWICH V.A. & FINSTEIN M.S. 1976. CONCENTRATION OF NITRIFYING BACTERIA IN SEWAGES EFFLUENTS, AND A RECEIVING STREAM AND RESISTANCE OF THESE ORGANISMS TO CHLORINATION. APPL. ENV. MICROBIOL. VOL.31 PP. 731-737.
- SUZUKI I., DULAR V. & KWOK S.C. 1974. AMMONIA OR AMMONIUM IONS AS SUBSTRATE FOR OXIDATION BY NITROSOMONAS EUROPAEA CELLS AND EXTRACTS. JOURNAL OF BACTERIOLOGY VOL. 120 N. 1 PP. 556-558.

- TERRY R.E. & TATE R.L. 1981. MUNICIPAL WASTEWATER REUTILIZATION ON CULTIVATED SOIL. J. WAT. POLLUT. CONTROL. FED. 53(1) PP. 85-88.
- VALLENTINE J.R. 1978. INTRODUCCION A LA LIMNOLOGIA. 1ª EDICION. EDIT. OMEGA. BARCELONA, ESPAÑA. 166 PP.
- VAN GOOL N. & LAUDELOUT H. 1966. THE MECHANISM OF NITRITE OXIDATION BY NITROBACTER WINOGRADSKYI. BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA. VOL. 113 PP 41-50.
- VAN KESSEL 1977. REMOVAL OF NITRATE FROM EFFLUENT FOLLOWING DISCHARGE ON SURFACE WATER. WATER RESEARCH VOL. 11 PP. 533-537.
- VAN KESSEL J.F. 1978. GAS PRODUCTION IN AQUATIC SEDIMENTS IN THE PRESENCE AND ABSENCE OF NITRATE. WATER RESEARCH. VOL. 12 PP. 291-297.
- VERSTRAETE W. & ALEXANDER M. 1973. HETEROTROPHIC NITRIFICATION IN SAMPLES OF NATURAL ECOSYSTEMS. ENVIR. SCI. TECHNOL. VOL. 7 N. 1 PP. 39-42.
- VON DROOGENBROECK R. & LAUDELOUT H. 1967. PHOSPHATE REQUIREMENTS OF THE NITRIFYING BACTERIA. ANTONIE VAN LEEUWENHOECK VOL.33 PP 287-296.
- WALLACE W. & NICHOLAS D.J.D. 1969. THE BIOCHEMISTRY OF NITRIFYING MICROORGANISMS. BIOL. REV. 44 PP. 359-391.
- WATSON S.W., VALOIS F.W. & WATERBURY J.B. 1981. THE FAMILY NITROBACTERIACEAE. VOL. 1 PP. 1005-1022. EN STARR M.P., STOLP H., TRUPER H.G. BALOWS A. & SCHLEGEL H.G. (EDS). THE PROKARYOTES. SPRINGER VERLAG N.Y. 1102 PP.
- WAYNE W.D. 1980. BIOESTADISTICA. 2ª EDICION ED. LIMUSA MEXICO. 485 PP.
- WETZEL R.G. 1975. LIMNOLOGY. ED. W.B. SAUNDERS COMPANY. PHILADELPHIA, PP. 186-214.
- WHITE G.C. 1978. DESINFECTION OF WASTEWATER FOR REUSE. VAN NOSTRAND REINHOLD ENVIRONMENTAL ENGINEERING SERIES USA. 387 PP.
- WINKLER M. 1981 NITROGEN AND PHOSPHORUS REMOVAL. EN BIOLOGICAL TREATMENT OF WASTEWATER. JOHN WILEY & SONS. PP 226-275.
- WONG-CHONG G.M. & LOEHR R.C. 1978. KINETICS OF MICROBIAL NITRIFICATION: NITRITE-NITROGEN OXIDATION. WATER RESEARCH VOL. 12 PP. 605-609.
- WOOD L.B., HURLEY B.J.E. & MATTHEWS P.J. 1981. SOME OBSERVATIONS ON THE BIOCHEMISTRY AND INHIBITION OF NITRIFICATION. WATER RESEARCH VOL. 15 PP. 543-551.