

168
24



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Aspectos Microbiológicos de un Reactor de
Película Biológica Denominado
"Biocinta"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G A
P R E S E N T A

Rosario Rodríguez Rodríguez



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

MEXICO, 1996



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. EN C. VIRGINIA ABRIN BATULE

Jefe de la División de Estudios Profesionales

Facultad de Ciencias

Presente

Los abajo firmantes, comunicamos a Usted, que habiendo revisado el trabajo de Tesis que realiz(ó)ron 1a pasante(s) Rosario Rodríguez Rodríguez

con número de cuenta 8125319-5 con el Título:

"Aspectos microbiológicos de un reactor de película biológica denominado Biocinta".

Otorgamos nuestro Voto Aprobatorio y consideramos que a la brevedad deberá presentar su Examen Profesional para obtener el título de Bióloga

GRADO	NOMBRE(S)	APELLIDOS COMPLETOS	FIRMA
Df.	<u>Victor Manuel</u>	<u>Luna Pabello</u>	
Director de Tesis			
Dra.	<u>María Antonieta</u>	<u>Aladro Lubel</u>	
M. en C.	<u>Rosaura</u>	<u>Mayen Estrada</u>	
M. en C.	<u>María Esther</u>	<u>Martínez Murillo</u>	
Suplente			
M. en C.	<u>Jorge Luis</u>	<u>Hernández Aguilera</u>	
Suplente			

DEDICADA A:

A mis padres Camen Rodríguez Cervantes y Lucas Rodríguez Guillén, por el amor y paciencia que han tenido a lo largo de toda mi vida.

A mis hermanos Antonio, René, Raúl, Gerardo y Rosalba por su cariño y apoyo brindados en todo momento.

RECONOCIMIENTOS

Al Dr Víctor Manuel Luna Pabello por brindarme la oportunidad de trabajar bajo su dirección, y por todos los reconocimientos que se desprendieron de este trabajo.

A la Dra Carmen Durán de Bazúa por las facilidades brindadas en el uso del equipo, material y acervo bibliográfico del laboratorio del PIQIYAQA.

Al Centro de Investigación de Diseño Industrial (CIDI) de la Facultad de Arquitectura de la UNAM, se agradece su valiosa colaboración al proporcionar el reactor experimental "Biocinta".

Al T.D.I. Sergio Luna Pabello por el apoyo brindado an todo lo necesario para la eficiente realización de esta investigación.

Al los Profesoresde la Facultad de Ciencias, en particular a la Dra Antonieta Aladro Lubei, M. en C. Rosaura Mayén Estrada, M. en C Maria Esther Martínez Murillo y M. en C. Jorge Luis Hernández Aguilera por su valiosa colaboración en la revisión del trabajo. y por haber aceptado amablemente ser parte de la comisión dictaminadora.

Al I.Q. Oscar Damián Montoya, al T.L.A. Octavio Pabello Morales y al I.Q. Sergio Rios Cuadrilla por su colaboración en el presenta trabajo, su apoyo, compañerismo y amistad incondicional brindados durante todo éste tiempo.

A mis compañeros del laboratorio de PIQAYQA de la Facultad de Quimica y a todos aquellos que de alguna manera colaboraron para que este trabajo llegará a su realización final. Gracias.

**EL DESARROLLO DE LA PRESENTE SE LLEVÓ A CABO CON EL
APOYO DE LOS PROYECTOS:**

El Gobierno Alemán, proyecto: BMFT FP-0402-82-01 2280

**El Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente, UNEP Nairobi,
Proyecto BCT 252**

**Los Proyectos de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la
UNAM: No.IN-302289 y IN-505594**

**El Seminario Académico "Profesor Fernando Orozco Dondé", patrocinado por la
empresa DUPONT de México, S:A. de C.V.**

ÍNDICE

RECONOCIMIENTOS

RESUMEN

1

I	INTRODUCCIÓN	6
II	MARCO TEÓRICO	7
II.1	Generalidades sobre sistemas de tratamiento de aguas residuales	7
II.2	Conceptos generales de sistemas de tratamiento de película fija	9
II.2.3	Generalidades sobre la biopelícula	11
II.2.4	Desarrollo de la biopelícula	13
II.3	Microorganismos que constituyen la biopelícula	14
II.3.1	Protozoos en la depuración de aguas residuales	16
II.3.2	Protozoos ciliados	17
II.3.3	Índice de diversidad	18
II.4	Evaluación de la calidad del agua	19
III	OBJETIVOS	21
III.1	Objetivos generales	21
III.2	Objetivos particulares	21
IV	MATERIALES Y MÉTODOS	22
IV.1	Descripción estructural y funcional de la biocinta	22
IV.2	Pruebas experimentales de arranque	24
IV.3	Condiciones de operación permanente	27
IV.4	Origen y composición del agua residual empleada	28
IV.5	Inducción del inóculo microbiano y de la película fija	29
IV.5.1	Inóculo aclimatado	29
IV.5.2	Formación de la biopelícula sobre el medio de soporte	30
IV.6	Técnicas de análisis	31
IV.6.1	Parámetros fisicoquímicos	31
IV.6.2	Observaciones al microscopio	32
IV.6.3	Cálculo del índice de diversidad de los ciliados	33
IV.6.4	Cálculo del índice de calidad del agua	34
V	RESULTADOS	36
V.1	Parámetros fisicoquímicos	36
V.2	Observaciones al microscopio	38
V.2.1	Crecimiento de la biopelícula sobre la biocinta	38
V.2.2	Cuenta de microorganismos	38

V.2.3	Valores de abundancia y diversidad de ciliados	40
V.2.4	Intervalo de saprobiedad de los ciliados	44
V.2.4.1	Valores del Índice de saprobiedad	44
V.2.5	Ubicación taxonómica de los ciliados encontrados	45
VI	ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	48
VI.1	Efecto de los parámetros fisicoquímicos	48
VI.2	Ecología microbiana	50
VI.3	Relación entre materia orgánica disuelta removida y los microorganismos de la biopelícula	53
VI.4	Abundancia y diversidad de ciliados	60
VI.5	Evaluación de la calidad del agua	63
VII	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	65
VII.1	Conclusiones	65
VII.2	Recomendaciones	67
VIII	LITERATURA CONSULTADA	68
IX	ANEXOS	74
IX.1	Técnicas de análisis fisicoquímicos y bioquímicos	74
IX.1.1	Demanda química de oxígeno (DQO)	74
IX.1.2	Demanda bioquímica de oxígeno (DBO ₅)	78
IX.2	Técnicas para determinación y cuenta de microorganismos	84
IX.2.1	Preparaciones permanentes	84
IX.2.1.1	Técnicas de adhesión	84
IX.2.1.2	Técnicas de tinción	86
IX.2.2.	Técnica para la cuenta de microorganismos	89

RESUMEN

Este trabajo tiene como objetivo conocer el proceso sucesional que ocurre durante la colonización de un reactor de película biológica a escala de laboratorio llamado biocinta, cuando éste es operado bajo condiciones controladas. El sistema es compacto, de fácil manejo y constituye conceptualmente una opción viable para el tratamiento de aguas residuales "in situ". Estructuralmente consta de un contenedor de 16 litros de volumen de trabajo. Al centro del recipiente y sobre un eje horizontal se encuentra dispuesta a manera de espiral una banda de aproximadamente 11 m de longitud, constituida por una serie de placas ensambladas entre sí, dando un diámetro total de 40 cm. Dichas placas fueron termoformadas para obtener una relación área/volumen de aproximadamente $275 \text{ m}^2/\text{m}^3$ y proporcionar así mejores condiciones para el proceso depurativo.

Como efluente a tratar se empleó agua residual de la cocción del maíz (nejayote), con una carga orgánica de 2,000 mg/L, medida como demanda química de oxígeno (DQO) y 580 mg/L, medida como demanda bioquímica de oxígeno (DBO₅). Se efectuaron observaciones periódicas al microscopio y se midieron adicionalmente parámetros fisicoquímicos y bioquímicos. A este respecto, el valor del pH osciló entre 6.5-8.0 unidades; la temperatura se mantuvo en un intervalo de 10-14°C, en tanto que los valores de oxígeno disuelto estuvieron entre 7.5-7.7 mg/L. Por otra parte, la concentración de materia orgánica disuelta medida como mg DQO/L y mg DBO₅/L, varió de 1,860 a 400 y de 550 a 70, respectivamente. Estos dos últimos parámetros fueron empleados para establecer la relación que existe entre el asentamiento de poblaciones microbianas en la biopelícula del reactor y el grado de depuración alcanzado por el sistema de tratamiento. De acuerdo con las observaciones realizadas, durante el proceso depurativo intervienen microorganismos de tipo procarionte como las bacterias y eucarionte como protozoos y micrometazoos.

Referente a los protozoos, se observaron tróficamente activos flagelados, ciliados y amebas. Los primeros se presentaron a todo lo largo del período experimental. En cuanto a los segundos, la mayor abundancia de estos organismos fue mayor cuando la concentración de materia orgánica se mantuvo entre 1,200 -1,000 mg DQO/L. Finalmente, el grupo de las amebas fue más abundante cuando la biocinta alcanzó su mayor nivel depurativo, 400 mg DQO/L. Con respecto a los micrometazoarios, los nemátodos se registraron en el intervalo de concentración de 1,200 a 400 mg DQO/L, mientras que los rotíferos entre 800 - 400 mg DQO/L.

En relación a la colonización del soporte de la biocinta, las bacterias y flagelados fueron los primeros en iniciar el desarrollo de la biopelícula. Posteriormente, cuando el proceso depurativo alcanzó el 25% de remoción se fueron incorporando paulatinamente a la comunidad de microorganismos, ciliados tales como *Oxytricha fallax* y *Colpidium colpoda* y formas móviles de peritricos. A un valor de 40% de remoción, los ciliados pedunculados tales como *Vorticella campanula*, *Opercularia coarctata* y *Epistylis plicatilis* y de nado libre como *Cyclidium glaucoma*, *Tetrahymena pyriformis* y *Litonotus lamella*, se presentaron en las muestras observadas. Estos microorganismos se mantuvieron hasta una remoción del 62%, adicionándose entonces a la comunidad el ciliado *Euplotes* sp.

Lo anterior constituye una clara evidencia de la estrecha relación que existe entre la concentración de la materia orgánica disuelta y la comunidad de microorganismos presentes, la cual aumenta en complejidad conforme disminuye el grado de contaminación del agua.

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, uno de los principales problemas que enfrenta la sociedad moderna, es la desmedida contaminación que sufren los recursos naturales como el aire, el agua y el suelo. De manera particular, el agua no es pura en su estado natural, lo cual se debe a que contiene elementos de origen terrígeno, tales como material orgánico e inorgánico, resultado de la erosión del suelo. Estos elementos llegan a los ríos y lagos por transporte eólico y pluvial. A este tipo de contaminación, se le añade la ocasionada por los aportes provenientes de las actividades biogénicas y antropogénicas, como son los nitratos de los fertilizantes agrícolas; los fosfatos contenidos en los detergentes; la materia orgánica compleja de las excretas de los seres vivos; los productos y residuos químicos, minerales y orgánicos vertidos por las diversas industrias (Bébin, 1988).

México es un país que enfrenta una grave problemática ambiental. De manera particular, es de resaltar el aspecto relacionado con la generación de aguas contaminadas durante el uso doméstico, agrícola e industrial. En este sentido, se sabe que el volumen de agua residual generado por dichas actividades es de aproximadamente 160 metros cúbicos por segundo (SEDUE, 1991, en Anaya-Huertas, 1992). Dichas aguas, una vez usadas, son descargadas en ríos, lagos y/o presas, propiciando el deterioro en su calidad fisicoquímica y biológica y consecuentemente limitando su uso industrial, agrícola y doméstico, llegando inclusive a provocar focos de infección para la salud humana.

Por otra parte, la descarga de aguas residuales en suelos, ocasiona restricciones en su uso debido no sólo a la presencia de sustancias químicas contaminantes, sino también a microorganismos potencialmente patógenos, tales como bacterias entéricas y virus. Por lo anterior, se hace necesario que, además de estudiar mecanismos tendientes a disminuir los volúmenes de las aguas contaminadas, así como los métodos de reciclamiento de las mismas, se apliquen sistemas de tratamiento que reduzcan la cantidad de contaminantes presentes en ellas. Actualmente, a nivel nacional, se tienen inventariadas aproximadamente 200 plantas de tratamiento de aguas municipales y 60 para el tratamiento de aguas residuales industriales. El total de dichas plantas, acorde con su capacidad de tratamiento, puede solamente depurar alrededor del 9% del total generado (SEDUE, 1991 en Anaya-Huertas, 1992).

El tratamiento de los efluentes provenientes de los diferentes procesos industriales representa una alternativa adecuada que permite reusar el agua tratada para consumo o bien descargarlos con menor concentración de contaminantes. Esta medida permite obtener beneficios inmediatos como la preservación de los ecosistemas y de la salud humana.

II. MARCO TEÓRICO

II.1 Generalidades sobre sistemas de tratamiento de aguas residuales

Los contaminantes del agua pueden clasificarse arbitrariamente de diversas maneras, por ejemplo: en función de su estado físico, en suspendidos o disueltos; según su naturaleza, en orgánicos e inorgánicos o dependiendo de la reacción frente a los organismos vivos, en biodegradable, inerte o tóxico (Bébin, 1988).

A partir de las anteriores clasificaciones, es posible vislumbrar la necesidad de emplear diferentes mecanismos para la eliminación de los contaminantes presentes en un determinado volumen de agua a tratar, y aún más por el hecho de que frecuentemente se encuentran combinados. Así, los materiales en suspensión son eliminados mediante tratamientos físicos: decantación, cribado y sedimentación, entre otros (tratamiento primario).

Referente a los materiales disueltos, como los compuestos orgánicos e inorgánicos, puede resaltarse que la materia orgánica disuelta es uno de los contaminantes con mayor abundancia en las aguas residuales y naturales. Para su remoción se recurre a procedimientos de precipitación por vía biológica (tratamiento biológico o secundario) o fisicoquímicos (coagulación, floculación) y posterior separación de los sólidos precipitados. En el proceso de depuración biológica, los microorganismos son la base de todos los sistemas de tratamiento. Los seres vivos involucrados, son capaces de utilizar el material orgánico disuelto biodegradable como sustrato nutritivo, transformándolo a través de procesos metabólicos a material de fácil sedimentación y en compuestos minerales como los nitratos y el CO_2 , liberando así al agua de dichos contaminantes. Entre los sistemas de tratamiento biológico más comúnmente empleados, se encuentran los filtros percoladores, lechos rocosos, lodos activados y reactores biológicos rotatorios (Luna-Pabello, 1987).

Por otra parte, para la eliminación de materiales disueltos, inertes o tóxicos, es posible aplicar procesos químicos de oxidación o adsorción (tratamiento terciario). Este tipo de procesos se aplican principalmente cuando se desea obtener agua con características de potabilidad, o bien, para descarga a cuerpos acuáticos naturales. Para ejemplificar estos mecanismos se encuentran los sistemas de ósmosis inversa, filtración en columnas de carbón activado, intercambio iónico y, como sistema de desinfección, la cloración (Bébin, 1988).

Antes de aplicar cualquier tipo de los tratamientos de purificación del agua, se deberán tener en cuenta los tipos de contaminantes que se desea eliminar y el uso que se pretenda dar al líquido tratado para que, de esta manera, el método que se utilice satisfaga las necesidades requeridas. No hay que olvidar que el

nivel de depuración deseado es directamente proporcional a su costo económico (Luna-Pabello, 1990).

Una vez determinado el grado de contaminación del agua a tratar debe definirse una estrategia de solución, lo cual usualmente se traduce en un tren de tratamiento específico. Este tipo de trenes de tratamiento combina diferentes equipos y los ubica de manera lógica y secuencial, cuya tarea es la eliminación y/o disminución de uno o más contaminantes. Al respecto, cabe resaltar que los contaminantes disueltos son los de eliminación más difícil y costosa, por lo que actualmente se están haciendo esfuerzos por implementar plantas depuradoras abocadas a la óptima eliminación de los mismos. Dicha eliminación, como se dijo, puede realizarse por métodos fisicoquímicos o bien biológicos (Durán de Bazúa, *et al.*, 1982).

De acuerdo con la tecnología hoy disponible, se han realizado estimaciones referentes a los costos de tratamiento para iguales volúmenes de agua de características similares y se han obtenido valores que evidencian que los costos por medios fisicoquímicos son entre 5 y 10 mayores a los de tipo biológico. Claro está que es para aguas con contaminantes disueltos biodegradables y sin elementos tóxicos (Luna-Pabello, 1993).

De manera complementaria puede decirse que, en la depuración del agua, los procesos de tipo biológico presentan como ventaja sobre los otros, la no generación de lodos tóxicos, y subproductos químicos provenientes del proceso que, al ser dispuestos en el suelo o en el agua, puedan ser agresivos al ambiente circundante. No obstante, presentan como inconveniente el requerimiento de largos períodos para alcanzar y conservar su estabilidad funcional (Stuckey, 1990).

Puede decirse, en términos generales, que los efluentes líquidos industriales que contienen material orgánico biodegradable acompañado de material recalcitrante (material orgánico de difícil biodegradación, como fenoles, grasas y aceites) y parcialmente tóxico a los microorganismos usados cotidianamente en la depuración biológica deben tener tratamientos combinados. Para aquellos casos en que la concentración de contaminantes tóxicos sea intolerable a los microorganismos, se hace necesario, si es la única limitante, un tratamiento previo que elimine o disminuya dichos compuestos tóxicos a fin de lograr niveles tolerables para la presencia activa de los microorganismos (Luna-Pabello, 1993).

De forma particular, el uso de los sistemas de tratamiento biológico de película fija han resultado exitosos para la depuración de aguas residuales con alto contenido de material orgánico biodegradable disuelto. Un ejemplo de estos son los reactores biológicos rotatorios (RBRs), conocidos también como biodiscos (Alleman *et al.*, 1982; Pedroza, 1985; Escárcega y Pulido, 1986; Luna-Pabello, 1993).

Los RBRs transforman la materia orgánica disuelta (MOD) contaminante, mediante la participación del metabolismo microbiano, obteniendo sólidos suspendidos, los cuales son también denominados como lodos biológicos o biomasa microbiana, la cual puede separarse por métodos físicos relativamente simples, como la sedimentación y/o filtración (Luna-Pabello, 1987 ; Bèbin, 1988), y en biogás, generalmente CO₂, para los sistemas aerobios y una mezcla de CO₂, H₂S y NH₃ para los sistemas anaerobios.

De acuerdo con algunos estudios realizados en la depuración de nejayote (agua residual producida a partir de la nixtamalización del maíz para consumo humano) empleando RBRs, la biomasa producida, acorde con los análisis bromatológicos y bioensayos practicados con la carpa barrigona, ha demostrado ser un complemento nutritivo en la dieta de peces (García, 1988; Castro y Villegas, 1989 Valderrama, 1989; Durán-Domínguez *et al.*, 1991). Lo anterior resulta interesante dado que representa un ejemplo sobre la posibilidad de recuperar la inversión económica hecha para la adquisición y operación del RBR. Sin olvidar que, a pesar de que no se obtuviera algún subproducto útil, el industrial está obligado legalmente a tratar sus aguas residuales o bien a pagar multas por concepto de descarga de aguas residuales a colectores urbanos o a cuerpos receptores propiedad de la nación (SARH, 1992).

Por lo antes expuesto, los sistemas de película fija en la actualidad constituyen una alternativa viable en la depuración de efluentes que tengan su origen en industrias como la alimentaria y domésticas principalmente (Pedroza, 1985; Durán de Bazúa, 1987). De aquí el interés de desarrollar nuevos sistemas de película fija más eficientes.

II.2 Conceptos generales de sistemas de tratamiento de película fija

Los procesos biológicos pueden ser clasificados en función de su dependencia o no de oxígeno disuelto en el medio acuoso. Los microorganismos responsables de tratamiento de las aguas residuales, pueden ser de tipo aerobio, anaerobio y/o facultativo (Torreblanca, 1992).

En particular, en los sistemas de tipo aerobio, los organismos que realizan la transformación del material orgánico, lo hacen cuando existe oxígeno molecular disuelto en concentraciones superiores a 2 mg/L. Como ejemplo de este tipo de sistemas se encuentran los denominados lodos activados, filtros percoladores, lagunas de aeración y reactores biológicos rotatorios (Durán de Bazúa *et al.*, 1982).

Existe otra forma de dividir los sistemas de tratamiento biológico y ésta es acorde con la forma de crecimiento en que se presentan los microorganismos. A

este respecto es posible distinguir los flocúlos o grumos de microorganismos suspendidos, como ocurre en los lodos activados y lagunas de oxidación, o bien, de crecimiento adherido a una superficie inerte formando una lama o capa de microorganismos, la cual es llamada película biológica activa fija o biopelícula (Luna-Pabello, 1987).

En el tipo de crecimiento de película fija, los microorganismos se encuentran adheridos a una superficie sólida, preferentemente inerte a la actividad microbiana y resistente a los agentes abrasivos. Es en la biopelícula donde se lleva a cabo la conversión de la materia orgánica contaminante a energía y elementos más sencillos, tales como CO_2 , H_2O y otros metabolitos. Los principales microorganismos involucrados en la depuración son los procariontes (bacterias) y los eucariontes (protozoos, nemátodos y rotíferos), obteniendo la energía a partir de la materia orgánica disuelta (MOD), tanto para mantener su actividad metabólica basal, como para su reproducción, incorporando con ello nuevos organismos a la biopelícula (figura 1). En los sistemas de biopelícula existe la posibilidad de que ésta se desplace sobre el líquido en tratamiento o viceversa. Un ejemplo del primer caso es el que se presenta en los reactores de biodiscos rotatorios y del segundo en los filtros percoladores o lechos empacados de oxidación biológica (Escárcega y Pulido 1986, Torreblanca, 1992).

Respecto al desarrollo de sistemas de tratamiento de aguas residuales puede decirse que los de crecimiento adherido, tienen su origen a partir de las observaciones realizadas en los procesos de autopurificación que llevan a cabo los ríos. En ellos, sobre las rocas sumergidas, se desarrolla una lama o capa de microorganismos, la cual depura el agua contaminada que pasa sobre la misma. Corbett, en 1903 (en Peters y Alleman, 1982), demostró que las bacterias aerobias que formaban película biológica, en un lecho rocoso, ocasionaban que el agua colectada en la base del lecho, disminuyera aproximadamente en 90% su contenido de contaminantes orgánicos. De esta manera, aludía que los sistemas de película fija no eran más que una copia del mecanismo de autodepuración, el cual se realiza de manera natural, tanto en las corrientes de agua (por ejemplo los ríos), como en el suelo (Peters y Alleman, 1982).

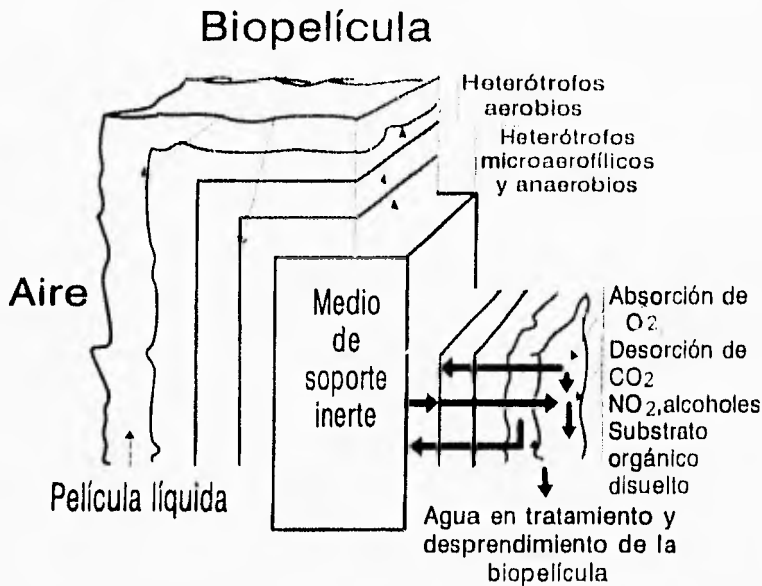


Figura 1.- Esquema de la biopelícula activa (Escárcega y Pulido, 1986)

II.2.3 Generalidades sobre la biopelícula

La biopelícula, como se mencionó anteriormente, es una capa de microorganismos que se adhiere a un medio de soporte inerte el cual puede ser de un material plástico, cerámico, arcilloso o metálico (Bébin, 1988).

El desprendimiento de la película microbiana puede ocurrir cuando los nutrimentos y el oxígeno no son difundidos de manera suficiente de las capas externas a los estratos internos. Lo anterior ocasiona que se pierda su estructura y cohesión por falta de dichos elementos, dando origen a procesos metabólicos anaerobios con la consecuente producción de biogás, el que a su vez induce el desprendimiento de los microorganismos adheridos (Pedroza, 1985).

De manera adicional, la rotación del medio de soporte y el efecto cortante, producto del desplazamiento de la biopelícula en el agua a tratar, también son elementos que regulan su grosor (Torreblanca, 1992).

Debido a que tanto el desprendimiento, como el desarrollo de nuevas colonias de microorganismos sobre el soporte son continuos, puede hablarse de una relativa estabilización de la biopelícula, a cuyo estado se le conoce como de equilibrio dinámico o etapa de crecimiento pseudo-estable, durante el cual, la biocapa es permanentemente delgada y aerobia. El espesor adecuado de la película no ha sido estimado con precisión, pero se considera que oscila entre 21 y 150 micrómetros, lo cual va a depender del medio de soporte y los nutrientes disponibles. La máxima actividad depuradora ocurrirá cuando la biopelícula sea delgada y completamente aerobia (Escárcega y Pulido, 1986).

La importancia de la biopelícula empezó a ser reconocida a partir de 1860, con el desarrollo de filtros percoladores, intermitentes y lechos de contacto. En años recientes, se ha rescatado la idea del uso de los reactores biológicos rotatorios o de biodiscos, los cuales fueron conceptualizados en Alemania aproximadamente en 1900. La idea se abandonó durante cerca de cincuenta años, siendo retomada en Alemania por Hartmann y en los Estados Unidos de América por Allis Chalmers, e impulsada con el advenimiento de los materiales plásticos en la década de los setentas (Stengelín, 1976; Peters y Alleman, 1982).

Los reactores de biodiscos, en tiempos pasados, presentaron su mejor aplicación en el tratamiento de pequeños flujos de aguas residuales domésticas y pretratamiento de aguas industriales. Actualmente, su empleo se contempla como una alternativa viable para el tratamiento de los residuos líquidos de industrias con un alto contenido de material orgánico disuelto. Los sistemas de película fija presentan diversas ventajas sobre los de crecimiento en floculo suspendido.

Como ejemplo de ellas se pueden citar la capacidad de tratar aguas residuales en una pequeña área; la generación de relativamente pocos lodos activados de fácil sedimentación; la tolerancia a fuertes fluctuaciones tanto de carga orgánica como hidráulica y el empleo de tiempos de residencia hidráulicos cortos (Jewell, 1982).

Sin embargo, los RBRs, ejemplo de reactores de película fija, presentan como desventajas el alto costo de inversión inicial requerido; los largos períodos empleados para lograr, tanto la inducción de la biopelícula, como la estabilización global del sistema; la limitación en la depuración de altas concentraciones de materia orgánica disuelta debido al bajo coeficiente de transferencia de oxígeno, característica intrínseca a su diseño y que pueden tratar flujos relativamente bajos de aguas residuales (Luna-Pabello, 1987).

II.2.4 Desarrollo de la biopelícula

El desarrollo de la biopelícula puede dividirse de manera general en 5 fases: inducción, acumulación, estabilización, desprendimiento y regeneración (Bryers, 1982). Según Characklis y Cooksey (1983), el término de biopelícula no necesariamente implica una acumulación uniforme en tiempo y espacio (figura 2).

a) Inducción.- Durante esta etapa, ocurre la adsorción de los compuestos orgánicos sobre el soporte que colonizarán los microorganismos, en tanto éste se encuentra en contacto con el líquido bajo tratamiento. La impregnación del material orgánico disuelto sobre del medio de soporte, es condicionante para el desarrollo de la biopelícula y la consecuente fijación de la biomasa sobre el soporte; es decir, los microorganismos colonizan las superficies húmedas, formando una matriz gelatinosa, cuando las cantidades adecuadas de nutrimentos orgánicos, sales minerales y oxígeno están disponibles sobre éstas (Hoehen y Ray, 1973; Bryers, 1982; Pedroza, 1985).

b) Acumulación.- En esta fase se produce un crecimiento logarítmico de los microorganismos; este evento alcanza su punto más alto una vez que el soporte se encuentra completamente cubierto por la matriz gelatinosa (Norouzián, 1984). Se observa un período de acumulación constante, el cual termina por efecto del esfuerzo cortante entre la biopelícula y la superficie del líquido. Los nutrimentos y el oxígeno son transportados a través de la película microbiana por difusión. El grosor de ésta se encuentra afectado por el desarrollo de la microbiota, lo que a su vez permite la formación de estratos inferiores con características anaerobias (Famularo *et al.*, 1978; Reiber y Stensel, 1985).

c) Estabilización o meseta.- En ella se da un desprendimiento de la biomasa, el cual se encuentra compensado, o en equilibrio, con la generada por los nuevos microorganismos, conservando constante el grosor y la estructura de la biopelícula. La cohesión de la biomasa se promueve por la combinación de la reproducción celular y producción extracelular de polímeros de polisacáridos (Trulear y Characklis, 1992).

d) Desprendimiento.- En esta etapa, la estabilidad se conserva hasta que la concentración de nutrimentos difundidos en la biopelícula es interrumpida, ocasionando que los organismos de las capas basales mueran, perdiéndose la integridad de la estructura de la biopelícula y se dé un desprendimiento masivo (Hoehen y Ray, 1973; Pedroza, 1985).

e) Regeneración.- En este punto la biopelícula ha alcanzado su estabilidad aparente y al desprenderse las capas externas, se presenta una capa delgada que rápidamente tiende a engrosar repitiendo así el ciclo (Bryers, 1982).

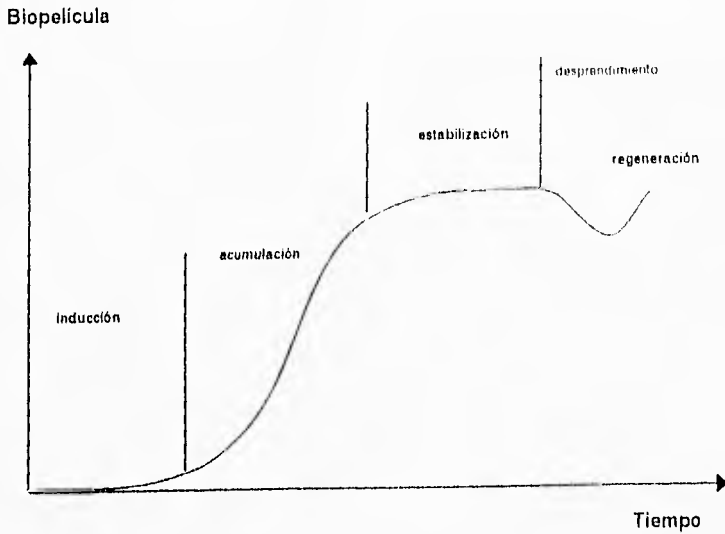


Figura 2 .- Esquema del desarrollo de la biopelícula activa (Bryers, 1982)

II.3. Microorganismos que constituyen la biopelícula

Como se ha venido mencionando, los microorganismos son la base de todos los tratamientos de depuración de tipo secundario, ello debido a la gran capacidad de adaptación que les permite utilizar prácticamente casi todos los compuestos orgánicos e inorgánicos como sustrato nutritivo (Bébin, 1988).

En la biodegradación de los compuestos contenidos en los cuerpos de agua naturales intervienen conjuntos de organismos disímiles, cuya estructura comunitaria está en función de la composición química del agua. Al cambiar dicha composición, se torna en un factor importante para la inducción del fenómeno sucesional microbiano (Madoni, 1981; Anaya-Huertas, 1992). De ahí que todos los microorganismos que se encuentran en el agua sean importantes, en alguna etapa, para el control de la calidad y depuración de la misma.

e) **Nemátodos.**- Son organismos eucariontes, multicelulares, su cuerpo es cilíndrico alargado, su abundancia es indicativa del grado de saptobiedad del agua. Estos organismos horadan los grumos o la película biológica rompiéndola, y los fragmentos son arrastrados por el agua de modo que el paso del aire no queda interrumpido.

Se han registrado estos organismos, en sistemas de tratamiento de aguas residuales como los filtros percoladores, donde a pesar de encontrarse condiciones polisaprobias el nivel de oxígeno permite su establecimiento. El grupo mejor representado en estos sistemas corresponde al orden Rhabditida (Curds, 1975).

El entender la importancia que tienen las diferentes poblaciones de microorganismos en la depuración del agua, permite inferir los posibles factores que inhiben o aceleran el funcionamiento de las plantas de tratamiento (Luna-Pabello, 1990).

A pesar de que se ha reconocido a los diversos grupos de organismos como participantes en el proceso depurativo del agua, (Kinner y Curds, 1988), los estudios sobre la película microbiana se han visto centrados en las bacterias, debido a que son las más abundantes, siendo inclusive, en los procesos de nitrificación y desnitrificación, los demás grupos considerados de manera secundaria.

II.3.1 Protozoos en la depuración de aguas residuales

En el proceso de descontaminación orgánica los protozoos tiene un papel muy importante. Por ejemplo, cuando un cuerpo de agua es contaminado por una descarga de un efluente rico en materia orgánica, los microorganismos que en él habitan, mediante una intensa actividad, degradan los compuestos orgánicos y consumen el oxígeno disuelto disponible. A medida que el proceso depurativo evoluciona, el consumo del oxígeno se reduce, indicando que ha disminuido la concentración del contaminante (Foissner, 1990).

Cuando la contaminación es moderada, predominan los protozoos consumidores de bacterias, pero al empezar a tener lugar la mineralización de la MOD, se hacen más numerosos los ciliados algulvoros y amebas, aumentando así la complejidad de la cadena trófica. En condiciones de total mineralización de la MOD, los protozoos tienden a disminuir su abundancia manifestando la eliminación del material orgánico. Los estudios llevados en laboratorio en sistemas artificiales muestran cambios y sucesiones biológicas similares.

Considerando que la presencia de ciertas especies de microorganismos se encuentra sujeta a los cambios de concentración de materia orgánica, éstas han sido utilizadas como indicadores de contaminación. Tomando en cuenta que algunas especies presentan nutrición de tipo saprofitica, se entiende su intervención, de manera directa, en la mineralización y consecuente estabilización de los compuestos orgánicos disueltos en el líquido residual (Sleigh, 1979).

Las ventajas que tiene el utilizar a los protozoos como indicadores de la calidad del agua, sobre otros organismos tanto microscópicos como macroscópicos son, de acuerdo con Cairns (1982):

- Distribución cosmopolita
- El muestreo representativo no daña de manera drástica la estructura de la comunidad
- Su presencia refleja de manera indirecta las condiciones fisicoquímicas y biológicas del medio circundante
- Facilidad en el transporte y almacenaje de la muestra
- Relativa facilidad en su cultivo
- Ciclo biológico corto que permite observar varias generaciones en poco tiempo
- Identificación morfológica directa con ayuda de técnicas preliminares relativamente sencillas
- Estructura comunitaria con niveles de organización complejos

En particular, los protozoos ciliados son los responsables de la descontaminación del agua ya que eliminan una porción considerable de materia orgánica y regulan las poblaciones bacterianas (Sleigh, 1979). Debido a la importancia que tienen dentro del proceso de biodegradación y, además, como indicadores de la calidad del agua, serán los microorganismos que se abordarán con mayor profundidad.

II.3.2 Protozoos ciliados

En el Phylum Ciliophora se han descrito aproximadamente 8,000 especies. El tamaño de los ciliados varía de 10 micrómetros a 4 mm; su forma puede ser esférica u ovoide, otros son muy alargados con aplanamiento lateral o dorsoventral y espiralados, observándose en algunas especies una pseudoregionalización de "cabeza, cuello y cola". Se caracterizan por la presencia de estructuras conocidas como cilios y organelos ciliares compuestos (cirros y membranelas).

Estos organelos se distribuyen en el cuerpo en diversos patrones alrededor del citostoma o boca y en el cuerpo, teniendo entonces como funciones la locomoción, alimentación y en raras ocasiones la adhesión al sustrato. Presentan un aparato nuclear heterocariote formado por el macronúcleo y el micronúcleo, en número variable. Es frecuente la presencia de algunos organelos como vacuolas contráctiles o vesículas de expulsión de agua; el citoprocto o citopigio por donde se descargan los materiales indigeribles y varios tipos de extrusomas, organelos de expulsión, como los mucocistos, tricocistos y toxicistos, entre otros.

Algunos ciliados presentan coloración debido a pigmentos citoplasmáticos, a las algas simbióticas o por el alimento recién ingerido o almacenado como sustancias de reserva. Son heterótrofos, su dieta es variada, pudiendo encontrarse ciliados bacterívoros, algulvoros, fungívoros, carnívoros, omnívoros y consumidores de materia orgánica (saprozoicos) (Aladro-Lubel *et al.*, 1990).

Su reproducción asexual es por fisión transversal, homotetogénica percinética y los procesos sexuales por conjugación y autogamia (Sleigh, 1979).

Los ciliados en su estado maduro son sésiles o de libre nado. En el primer caso se encuentran adheridos a diferentes sustratos en los cuales se desarrollan de manera solitaria o colonial, según la especie en cuestión. En el caso de los ciliados libres nadadores, estos pueden encontrarse reptando sobre grumos microbianos o bien desplazándose en el líquido que los contiene.

Este tipo de microorganismos son cosmopolitas, pudiéndose encontrar en medios acuáticos como charcos de agua, arroyos, estuarios y mares; otros son edafícolas e incluso se les encuentra suspendidos en el aire (en forma de quiste). Los ciliados en menor cantidad son simbióticos ectocomensales y endocomensales, relativamente pocos ciliados son considerados como parásitos verdaderos.

La amplia distribución de este grupo y su abundancia en diversos habitats, es consecuencia de su amplia tolerancia a cambios en los factores ambientales prevalectantes (Aladro-Lubel *et al.*, 1990).

II.3.3 Índice de diversidad

Para el estudio de las asociaciones de las diversas poblaciones de microorganismos de una comunidad dada, se requiere conocer su diversidad o heterogeneidad, la cual es medida en función tanto del número de especies presentes, como de su abundancia relativa.

La diversidad es una propiedad importante de las comunidades, representa una medida del nivel de complejidad alcanzado en un determinado ecosistema. Cuando mayor es ésta, existe mayor posibilidad para el establecimiento de relaciones interéspecíficas más variadas y numerosas (Begon *et al.*, 1986).

Una de las expresiones matemáticas más empleadas para la estimación de la diversidad de una determinada comunidad, ha sido la de Shannon-Weiner. Este índice de diversidad debe emplearse estrictamente sólo cuando se cuenta con muestras aleatorias extraídas de una gran comunidad en que se conoce el número total de especies. El valor obtenido, como resultado de la aplicación de esta función es directamente proporcional al grado de diversidad presente en la comunidad bajo estudio (Krebs, 1985).

II.4 Evaluación de la calidad del agua

En la evaluación del grado de la contaminación del agua (saprobiidad) se emplean cualitativamente microorganismos como bioindicadores, especialmente en ecosistemas acuáticos, donde el líquido tiene altas concentraciones de materia orgánica biodegradable, tales como, aguas de origen doméstico y con escaso o nulo oxígeno molecular disuelto.

Cuando un cuerpo de agua corriente recibe la descarga de un efluente contaminado, cerca del sitio de afluencia se encuentra la mayor concentración del contaminante y conforme se aleja del área afectada por el líquido residual, ésta decrece gradualmente.

Tomando como referencia la anterior, los sistemas saprobios son empleados en dicha evaluación (Sládecek, 1985). De manera general, de acuerdo con Foissner (1992), es posible distinguir con fines prácticos 4 zonas, las cuales son utilizadas con mayor frecuencia para la caracterización biológica de aguas residuales y éstas son:

- a) Polisaprobia.- Esta es la zona más contaminada; con mayor contenido de materia orgánica disuelta. En el agua existen pocas especies; sin embargo, se observan numerosas bacterias y escasos protistas heterotróficos.
- b) Alfa-mesosaprobia.- El oxígeno disuelto en ésta aún se encuentra en concentraciones muy bajas, la mineralización del material orgánico empieza a darse. A pesar de que existe mayor diversidad microbiana, las bacterias continúan dominando, el número, en particular de ciliados, empieza a elevarse.
- c) Beta-mesosaprobia.- Es la zona donde la descomposición y mineralización es más acusada y el déficit de oxígeno disminuye. Se observa una gran cantidad de protistas heterotróficos y otros organismos aerobios.
- d) Oligosaprobia.- La mineralización de la materia orgánica es completa y el agua se encuentra saturada con oxígeno y es relativamente limpia. La variedad de microorganismos es más grande y los protistas empiezan a ser escasos.

En estudios realizados por Curds (1975); Kinner *et al.* (1988); Luna-Pabello (1987, 1993); Moreno (1985) y Rivera *et al.* (1988), han permitido inferir que la abundancia y diversidad, particularmente de los protozoos ciliados, se encuentra estrechamente relacionada con la eliminación de la MOD. De aquí que en el presente trabajo uno de los puntos de interés es el relacionar la remoción de MOD durante la fase de preestabilización de un sistema de película fija, así como la secuenciación de las poblaciones de microorganismos, principalmente las de ciliados, que paulatinamente se integran a la biopelícula.

Para lograr satisfacer dicho interés, se caracterizará de manera simultánea la secuencia sucesional de microorganismos formadores de la biopelícula a lo largo del período pseudoestable del reactor de biocinta, prestando mayor atención a los ciliados, así como de los parámetros fisicoquímicos predominantes en el sistema de tratamiento, que pueden influir en el desarrollo de las posibles poblaciones integradoras de la biocapa.

III OBJETIVOS

III.1 Objetivos generales:

- Determinar la secuencia de aparición de protozoos y micrometazoos en un reactor de biopelícula conocido como "biocinta" desde su arranque hasta su fase de estabilización pseudoestable.
- Asociar la presencia de ciliados con el nivel de depuración logrado por el sistema.

III.2 Particulares:

- Elaborar medios de cultivo previos a la experimentación, utilizando nejayote diluido y determinar de manera cualitativa los grupos de microorganismos presentes, con mayor atención en los ciliados.
- Inducir un inóculo microbiano aclimatándolo a condiciones ambientales predeterminadas.
- Establecer las condiciones de operación permanentes del reactor de biocinta.
- Evaluar periódicamente la eficiencia depurativa de la biocinta hasta que alcance la etapa pseudoestable.
- Registrar la distribución y abundancia protozoos, poniendo énfasis en los ciliados, y micrometazoos, en diferentes porcentajes de depuración.
- Asociar la colonización y sucesión de los microorganismos respecto al porcentaje de material orgánico removido.

IV MATERIALES Y MÉTODOS

Para el desarrollo del trabajo experimental se contó con un reactor de tratamiento biológico de película fija a escala de laboratorio. Este sistema se basa en el principio de proporcionar la mayor superficie de contacto o de desarrollo potencial microbiano, en el menor volumen posible. La idea es aumentar la relación área/volumen para promover la capacidad depurativa del mismo. Lo anterior trae como consecuencia una mayor área de película biológica activa fija microbiana, distribuida adecuadamente y en un menor espacio, con lo cual la eficiencia depurativa se incrementa. La conceptualización y desarrollo este reactor conocido como "biocinta" fue realizada por el Centro de Investigación de Diseño Industrial de la Facultad de Arquitectura de la U.N.A.M.

IV.1 Descripción estructural y funcional del reactor conocido como "Biocinta"

El reactor de película biológica en espiral denominado biocinta, se conforma estructuralmente por dos partes principales: a) el medio de soporte y b) el contenedor (figura 3).

a) Medio de soporte

Se encuentra construido por una serie de placas dentadas de igual estructura y dimensión, cuya parte terminal puede ensamblarse con la parte inicial de la subsiguiente, de tal manera que se constituye una banda que, al enrollarse sobre sí misma, en torno a un eje metálico, forme una espiral. El nombre de este reactor experimental se debe precisamente a su semejanza con un listón o cinta, como resultado de la unión de las diferentes placas que la componen. Para su conceptualización y diseño se contempló la posibilidad de producirlo de manera rápida en tiras de material termoflexible inerte sobre el que crecerá la biopelícula y de ahí el nombre de "biocinta" (figura 4).

Las placas dentadas que constituyen el medio de soporte de la biopelícula se construyeron mediante un proceso versátil de moldeo conocido como termoformado. Lo anterior se realizó con el objeto de lograr la mayor área de contacto posible.

La disposición y forma de la placa está sujeta a los parámetros de producción como son: los ángulos de salida (para desmoldar fácilmente), la distancia entre los dientes y el número de ellos, basada en el porcentaje de elongación del material.

Los dientes de las placas son elementos de sujeción entre ellas y de división entre cada placa enrollada o nivel de la cinta, criterios que conjugados dan la mayor área de contacto posible.

Como se muestra en la figura 4, cada placa presenta una superficie dentada, donde cada saliente o "diente" tiene por dimensiones 1.0 x 1.7 cm, y se hallan dispuestas en 9 hileras y 10 columnas, sumando un total de 90 unidades por placa. La distancia existente entre cada una es de 1.3 cm.

La función de estos pequeños componentes es:

1.- Aumentar la superficie de contacto del reactor con el líquido residual a tratar, debido a su geometría "interna" de cubo sin dos de sus caras, lo cual da como resultado una mayor área de transferencia y contacto entre los organismos, el agua a tratar y el aire atmosférico, lo que finalmente favorece el proceso de biodegradación.

2.- Servir como soporte a la capa concéntrica superior de la espiral, y aumentar la turbulencia del agua contenida en la cámara.

Como se mencionó con anterioridad, las placas se unen longitudinalmente unas con otras, a partir de sus porciones terminales, hasta conformar la totalidad de la espiral de la biocinta, la unión de 40 placas dió una longitud de 11.3 m y un diámetro de 40 cm. El acoplamiento de las placas de los tres materiales se realizó de la siguiente manera. La sección central con 14 placas de cloruro de polivinilo (PVC); seguida de una serie de 11 placas de polietileno (PE) y finalmente 15 de poliestireno (PS).

b) Contenedor o "cámara"

Esta estructura se encuentra construida en material acrílico. Su forma geométrica busca obtener un mayor volumen a menor costo de producción. Consta de un recipiente de acrílico transparente, que es un prisma semihexagonal con base rectangular, cuyo volumen total de trabajo es de 15 L.

La cámara consta de tres secciones, una central que sirve de unión a dos laterales. Dicha unión se realiza mediante dos empaques laterales de hule y 8 tornillos de sujeción transversal, ubicados en el contorno del recipiente. La sección central cuenta con dos orificios que sirven para el suministro y desalojo de la cámara, presenta horadaciones que sirven de soporte al eje metálico que proporcionará apoyo y rotación a la biocinta (figura 3).

En relación al volumen de este componente, tomando en cuenta sus medidas, geometría y el nivel de altura del líquido al que opera, se obtiene como resultado una capacidad de 14.9 L, que pueden cargarse al contenedor sin la biocinta, cuando la biocinta es sumergida en el contenedor se obtiene un volumen de trabajo de aproximadamente 14 L.

Un sumario de las principales características estructurales y de operación se pueden apreciar en la tabla 1

Tabla 1.- Características estructurales y de operación del reactor de biocinta.

Característica	Descripción
Estructurales	
Número de etapas	1
Diámetro de la biocinta (cm)	40
Espesor de la biocinta (cm)	12.7
Material de las placas	PVC, PS y PE
Superficie total/etapa (m ²)	41
Volumen total de trabajo (m ³)	0.015
Relación área/volumen (m ² /m ³)	273.3
Porcentaje de área sumergida	40
Operacionales	
Concentración de materia orgánica (mg DQO/L)	2000
Tiempo de residencia hidráulico (h)	18
Velocidad de rotación (rpm)	28

IV.2 Pruebas preliminares al arranque del reactor

Durante las pruebas preliminares al arranque de la biocinta se detectaron problemas de operación para cuya solución se hicieron los ajustes convenientes. Una vez superados se procedió a evaluar de manera preliminar su funcionamiento. Como primer paso se constató que existiera un mezclado homogéneo que favorecería una oxigenación adecuada.

También se estimó el volumen de evaporación de agua por día el cual fue de aproximadamente el 10%. Adicionalmente, se evaluó cualitativamente el crecimiento de la biopelícula y que la estructura de la biocinta resistiera el proceso de deformación inducido por su movimiento y acumulación de biomasa.

En relación al volumen de este componente, tomando en cuenta sus medidas, geometría y el nivel de altura del líquido al que opera, se obtiene como resultado una capacidad de 14.9 L, que pueden cargarse al contenedor sin la biocinta, cuando la biocinta es sumergida en el contenedor se obtiene un volumen de trabajo de aproximadamente 14 L.

Un sumario de las principales características estructurales y de operación se pueden apreciar en la tabla 1

Tabla 1.- Características estructurales y de operación del reactor de biocinta.

Característica	Descripción
Estructurales	
Número de etapas	1
Diámetro de la biocinta (cm)	40
Espesor de la biocinta (cm)	12.7
Material de las placas	PVC, PS y PE
Superficie total/etapa (m ²)	41
Volumen total de trabajo (m ³)	0.015
Relación área/volumen (m ² /m ³)	273.3
Porcentaje de área sumergida	40
Operacionales	
Concentración de materia orgánica (mg DQO/L)	2 000
Tiempo de residencia hidráulico (h)	18
Velocidad de rotación (rpm)	28

IV.2 Pruebas preliminares al arranque del reactor

Durante las pruebas preliminares al arranque de la biocinta se detectaron problemas de operación para cuya solución se hicieron los ajustes convenientes. Una vez superados se procedió a evaluar de manera preliminar su funcionamiento. Como primer paso se constató que existiera un mezclado homogéneo que favorecería una oxigenación adecuada.

También se estimó el volumen de evaporación de agua por día el cual fue de aproximadamente el 10%. Adicionalmente, se evaluó cualitativamente el crecimiento de la biopelícula y que la estructura de la biocinta resistiera el proceso de deformación inducido por su movimiento y acumulación de biomasa.

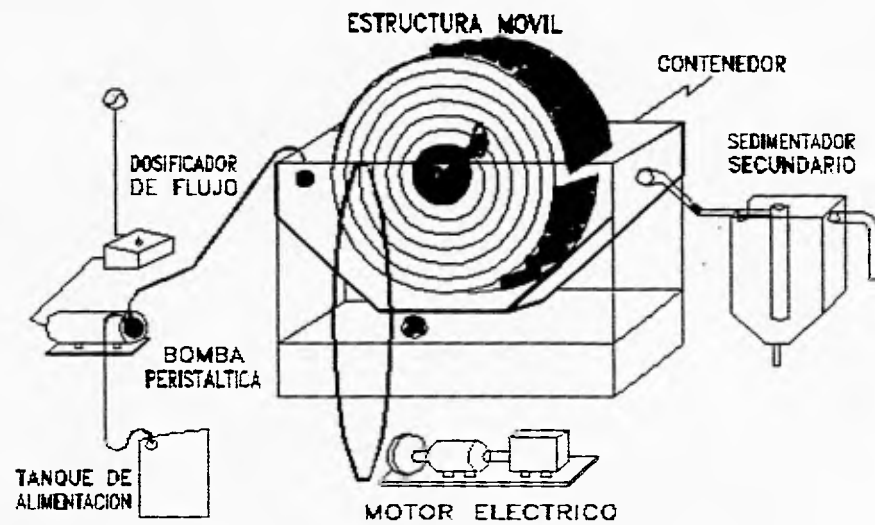


Figura 3.- Estructura del Reactor de Biocinta

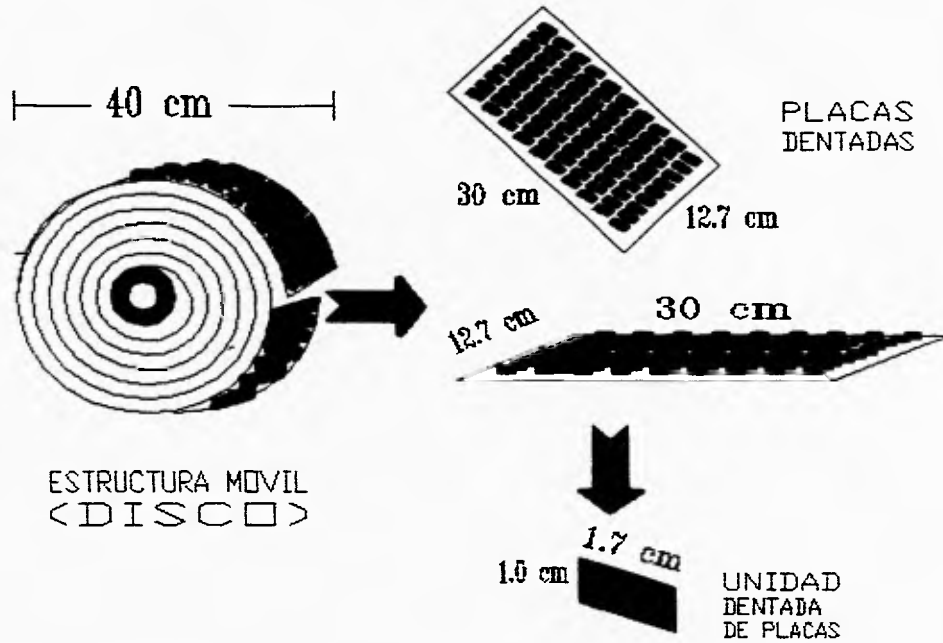


Figura 4. Medio de Soporte del Reactor de Bicinta

En la etapa de arranque, paralelamente, se observó que el sentido y la velocidad de rotación influyen en la expansión o compactación de la biocinta, por lo que se hizo necesario determinar la dirección y velocidad adecuada para el giro de la misma. Al respecto se consideró conveniente que el giro fuera en sentido de las manecillas del reloj evitando de esta forma la compactación de la espiral.

Una vez superados estos inconvenientes y con una mayor certeza del buen funcionamiento del reactor, se procedió a establecer las condiciones de operación permanentes a efecto de determinar el proceso sucesional de las poblaciones de microorganismos durante la colonización del medio de soporte y consecuente formación de la biopelícula.

IV.3 Condiciones de operación permanente

Una vez realizadas las modificaciones correspondientes en cuanto a los aspectos estructurales del reactor, se procedió a establecer los parámetros operativos, tales como velocidad de rotación y tiempo de residencia hidráulico (TRH). Estos parámetros se fijaron a partir de experiencias previas en sistemas rotatorios (biodiscos), los cuales son también sistemas de película fija (Luna-Pabello, 1987).

Adicionalmente, se calculó el volumen de trabajo, área de transferencia disponible y la relación área/volumen (m^2/m^3), lo cual aparece resumido en la tabla 1.

Para suministrar al reactor el agua residual a tratar, se utilizó una bomba peristáltica Masterflex con dosificador y motor eléctrico de tipo Cole-Palmer. Para la recolección del efluente del reactor se empleó un sedimentador secundario con una capacidad total de 10 L. Este sedimentador presenta una estructura central que permite disminuir el tiempo de sedimentación de los lodos generados, permitiendo a su vez una mejor separación del efluente tratado.

Otro parámetro a considerar fue el tipo y concentración del líquido que sería empleado como sustrato, en este caso se seleccionó agua de la nixtamalización del maíz, debido a que representa un efluente de tipo carbonoso concentrado, que es relativamente fácil de obtener. Esto es importante sobre todo para garantizar la continuidad en el suministro del agua a tratar y una calidad relativamente homogénea. Por tal motivo a continuación se presentan algunos datos relevantes al respecto.

IV.4 Origen y composición fisicoquímica del agua residual empleada

El agua residual empleada para la experimentación con la biocinta fue la proveniente de los molinos de nixtamalización de maíz para consumo humano y son conocidas como nejayote (del náhuatl: *nextli*=cenizas de cal; *áyoh*=caldo y *atl*=agua).

La industria de la nixtamalización de maíz es una de las más importantes de México; un diagrama de su proceso puede observarse en la figura 5.

El nejayote es de color amarillento y en ocasiones de consistencia viscosa. Algunas veces, los efluentes provenientes del lavado de los granos tiene apariencia lechosa, debido al excedente de cal empleado en el proceso. Las cargas orgánicas son 100 veces más, para un mismo volumen, que las de las aguas residuales de tipo doméstico.

Entre sus características fisicoquímicas se encuentran: pH de 12-14 unidades, alcalinidad de 2,700 mg de CaCO_3/L , sólidos suspendidos cercanos a 2,000 mg/L, DBO_5 de 8,000 mg OD/L, DQO de 20,000 a 39,200 mg/L, y una relación de carbono:nitrogeno:fósforo de aproximadamente 500:1:0.25, respectivamente (Durán de Bazúa, 1987; Luna-Pabello, 1993).

El agua residual de alimentación del reactor se preparó con una dilución de con agua de la llave 2,000 mg/L de concentración orgánica, medida como DQO, a partir de nejayote concentrado de 39,200 mg DQO/L. Se eligió esta dilución debido a que es una concentración con la cual se habla experimentado anteriormente con reactores de biodiscos, en los cuales dicha concentración no resultó limitante para permitir alcanzar niveles de aerobiosis, es decir más de 2 mg/L (Luna-Pabello, 1987).

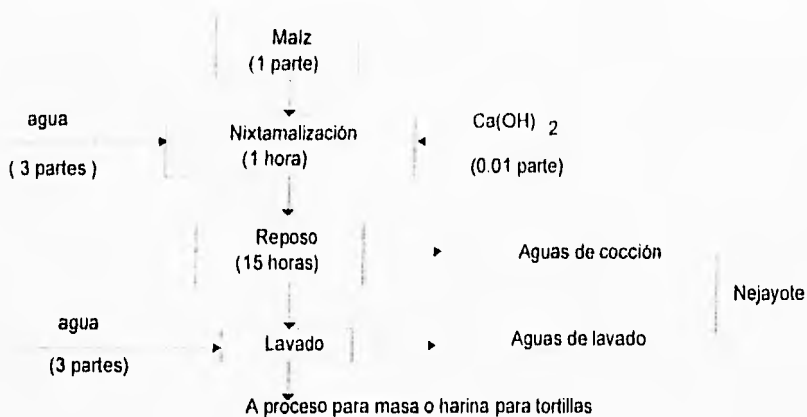


Figura 5.- Proceso de nixtamalización tradicional del Maíz (Durán de Bazúa, 1987)

IV.5 Inducción del inóculo microbiano y la película fija

Con objeto de lograr una rápida estabilización del reactor de biocinta fue necesario realizar un inóculo específico para el tipo de agua residual a tratar. Una vez obtenido éste, se procedió a la inducción de la biopelícula a partir del manejo de las variables de operación fijadas en la tabla 1.

Una ventaja adicional de elaborar de manera previa el inóculo microbiano es que permitiría la determinación anticipada de los posibles géneros y/o especies de interés que pudieran presentarse a lo largo de la experimentación con la biocinta.

IV.5.1 Inóculo aclimatado

Con la finalidad de obtener poblaciones microbianas aclimatadas a los requerimientos experimentales, se procedió a la elaboración de inóculos de la manera siguiente:

A) Se obtuvieron microorganismos provenientes de un reactor biológico rotatorio que depuraba aguas residuales producidas por la deshidratación de la flor mexicana (cempasúchil). Dichos microorganismos fueron cultivados en un matraz Erlenmeyer de 500 mL al que se le añadió gradualmente nejayote diluido a una concentración de materia orgánica, medida como DQO, de 2,000 mg/L (inóculo A).

B) Para la elaboración de un segundo inóculo (cultivo B), se colocó una muestra de suelo fértil con nejayote diluido a igual concentración en otro matraz Erlenmeyer.

Ambos inóculos se realizaron bajo oxigenación constante con objeto de promover el desarrollo de microorganismos aerobios.

Los registros de temperatura mostraron valores de 20-22°C.

En relación al pH en ambos inóculos se registraron al inicio condiciones ácidas 4.0 (A) y 6.0 (B) unidades.

En el caso de los microorganismos, se observó, en ambos casos, una proliferación inicial principalmente de bacterias, después de una semana se encontraron ciliados y flagelados. Dos semanas posteriores a la elaboración de los inóculos se registraron adicionalmente micrometazoarios (nemátodos y rotíferos), los cuales aparentemente fueron más abundantes en el inóculo B.

Con base en estas observaciones se estimó que para el desarrollo de la biopelícula, los dos cultivos promoverían su rápida formación y consecuente estabilización, razón por la que se consideró pertinente inocular la biocinta con ambos.

IV.5.2 Formación de la biopelícula sobre la biocinta

En esta fase de la experimentación se empleó el agua residual de nejayote diluido a una concentración orgánica, medida como DQO, de 2,000 mg/L, con la cual se llevó a su volumen de trabajo el contenedor del reactor.

Durante una semana se suministró diariamente a la cámara del reactor únicamente el volumen de agua residual evaporado, aproximadamente 1 L y 100 mL del inóculo aclimatado. El objetivo era evitar fuertes variaciones de calidad del líquido residual a tratar, favoreciendo así la rápida aclimatación de las poblaciones microbianas.

De acuerdo con las observaciones al microscopio de muestras de agua y la incipiente biopelícula, los microorganismos predominantes durante la primera semana eran bacterias y flagelados.

En la segunda semana de operación, se reinoculó nuevamente el reactor para garantizar la presencia activa de mayor cantidad de poblaciones de microorganismos. A lo largo de este período la biopelícula empezó a hacerse visible, mostrando mayor desarrollo sobre las placas de polietileno (PE), en menor grado en las de cloruro de polivinilo (PVC) y de manera escasa en las de poliestireno (PS). El orden de ellas era, del interior para afuera, de PVC, PE y PS.

VI.6 Técnicas de análisis

Considerando que este trabajo tiene como objetivo primordial la caracterización de la colonización secuencial de microorganismos que ocurre en la "biocinta" y su asociación con las condiciones fisicoquímicas, se hace necesario tomar registros de pH, temperatura, oxígeno disuelto (OD), demanda química y bioquímica (DBO_5) de oxígeno, así como la determinación y cuantificación de microorganismos de interés durante las fases de preestabilización y estabilización o de régimen permanente.

IV.6.1 Parámetros fisicoquímicos

El pH y oxígeno disuelto (OD), fueron registrados "*in situ*" mediante un multímetro Corning 720-A. La temperatura fue medida con un termómetro de bulbo, el cual se mantuvo sumergido en el contenedor. La periodicidad con la que se tomaron dichos parámetros fue de cada tercer día, en el caso de los dos primeros y diariamente para el caso de la temperatura.

Para determinar la eliminación de la materia orgánica disuelta presente en el agua residual durante el tratamiento se recurrió a la determinación de:

- 1) La demanda química de oxígeno (DQO), la cual se aplicó a muestras obtenidas con una periodicidad de dos a tres veces por semana. Estas fueron centrifugadas y sometidas a diluciones y digestión ácida, de acuerdo con el método aprobado por la APHA (1990), (anexo IX.1.1).
- 2) La demanda bioquímica de oxígeno en cinco días (DBO_5). Este parámetro se registró cada semana, utilizando un aparato Voith-Sapromat, (apartado IX.1.2 de los anexos).

IV.6.2 Observaciones al microscopio

Con el propósito de determinar la diversidad, distribución y abundancia de los diversos protozoos ciliados, flagelados, bacterias y micrometazoos establecidos en la biocinta hasta su estabilización se procedió de la siguiente manera:

En observaciones llevadas a cabo al microscopio óptico se detectó que la mayor incidencia de microorganismos se encontró en la biopelícula, no así en el licor mezclado (agua en tratamiento), por lo que se consideró conveniente tomar raspados de la biomasa del soporte a fin de contar con una muestra que permitiera observar la mayor diversidad de grupos de microorganismos, éstos fueron de tres zonas, correspondiendo cada una de ellas a los diferentes materiales plásticos con los que se encuentra construido dicho soporte.

Cada raspado de 1 mm² fue tomado al azar con una espátula y llevado a un volumen de 10 mL de agua residual, esto con el objeto de contar durante el análisis tanto con un volumen conocido como un mezclado homogéneo de los microorganismos en la muestra.

En relación a la forma en la cual se realizó la cuenta de los ciliados, se recurrió a la técnica de Lackey (APHA, 1990) modificada, debido a que esta permite analizar volúmenes de muestra menores a 0.1 mL, aún más pequeños que los propuestos por los métodos del hemocitómetro, reduciendo notablemente el tiempo invertido en el análisis. El número de muestras observadas al microscopio fue de tres por cada raspado (Ver anexo IX.2.2).

Para la determinación de los microorganismos, se llevaron a cabo observaciones de preparaciones temporales y permanentes empleando un microscopio de contraste de fases Olympus LHS con cámaras fotográfica y de video integradas.

a) Preparaciones temporales

En las preparaciones temporales, para retardar el movimiento ciliar se empleó metil-celulosa al 10%, se utilizaron colorantes vitales como verde brillante, rojo y azul de metilo al 1%, para resaltar estructuras de importancia taxonómica, como cilios peristomales, cirros, aparato nuclear, y nigrosina al 1% para la observación de la ciliatura somática (Gaviño *et al.*, 1972).

b) Preparaciones permanentes

En el caso de los ciliados, para su determinación a nivel de género o bien especie, fue necesaria la elaboración de preparaciones permanentes, por lo que se elaboraron medios de cultivo con infusiones de trigo, con objeto de aumentar las poblaciones de los mismos. Posteriormente, se aplicó la técnica de impregnación

argéntica de Klein para resaltar cilios, cinetosomas, cinetias y argiroma, además la de protargol (Lee *et al*, 1985) para destacar núcleo, cilios, cinetosomas y poros de vacuolas. En el caso de las bacterias dado su amplia diversidad y difícil determinación se optó por separarlas según su morfología y la respuesta obtenida a la aplicación de la tinción de Gram.

Adicionalmente se tomaron fotomicrografías de los microorganismos de preparaciones tanto temporales como permanentes. En el reconocimiento de los diferentes grupos de microorganismos se recurrió, en el caso de los ciliados se empleó la clave de Small y Lynn (1985) y descripciones de Luna-Pabello (1987, 1990 y 1993); para los flagelados la clasificación de Levine *et al* (1980); los sarcodinos con la clasificación de Sleigh (1979) y de micrometazoarios, la propuesta por Margullis y Schwartz, (1981).

Las muestras de película fija provenientes del reactor se observaron al microscopio con intervalos de tres a cuatro días hasta que el reactor alcanzó su equilibrio funcional, lo cual se constató tanto por los análisis fisicoquímicos como por el hecho de que las poblaciones se mantuvieron constantes. Se consideró adecuado hacer esta frecuencia de muestreo debido a que los protozoos, bacterias y micrometazoarios presentan ciclos de vida muy cortos y, por tanto, el establecimiento de nuevas poblaciones es muy rápido. Este tipo de muestreo permitió conocer los diversos organismos presentes antes y durante la fase estable del sistema de tratamiento del líquido, es decir la secuencia de aparición poblacional en función del grado depurativo logrado por la biocinta.

IV 6.3 Cálculo del índice de diversidad de ciliados

Por otro lado, reiterando en la importancia que tiene conocer la diversidad del grupo de los ciliados con la evolución del proceso depurativo, se aplicó el índice Shannon-Weiner, el cual considera el número de especies presentes y su abundancia relativa (Begon *et al.*, 1986). A continuación será descrita la ecuación que fue aplicada en la obtención de dicho índice.

Índice de Shannon-Weiner (diversidad):

$$H = - \sum_{i=1}^s (p_i) (\log_2 p_i) \text{ o bien } H = \frac{1}{N} \log_2 \frac{1}{N}$$

donde:

H = Índice de diversidad de especies.

s = número de especies

p_i = proporción del total de la muestra que corresponde a la especie i (n_i/N)

n_i = número de individuos por especie

N = total de los valores de importancia

Otro aspecto relevante es la homogeneidad o equidad (E) de la comunidad, para su estimación se puede recurrir a la siguiente ecuación:

$$E = H/H_{\max}$$

donde:

E = homogeneidad o equidad (gama de 0 a 1)

H = diversidad de especies observadas

H_{\max} = diversidad máxima de especies

$$H_{\max} = \log_2 S$$

S = número de especies

El valor de la diversidad máxima (H_{\max}) permite inferir el número máximo de especies que potencialmente pudieran incorporarse a la comunidad en un determinado hábitat.

IV.6.4 Cálculo del índice de calidad del agua

Por otro lado, para determinar la calidad del agua en base a la proporción estimada de especies, se aplicó el índice de calidad del agua propuesto por Plantle y Buck (IS_{PB}), mencionado en Foissner (1992).

$$IS_{PB} = (N \cdot IS_i) / N$$

donde:

IS_{PB} = Índice de sprobiedad Plantle y Buck

N= número individual estimado para cada especie (1=pocas; 2=muchos; 5=demasiados)

IS=índice de saprobiedad (el cual es tomado de una tabla ya establecida, tiene valores de 0-8)

i = especie

Según los valores establecidos por este índice, se distinguen cuatro clases correspondiendo cada una a la clasificación de saprobiedad de Foissner (1992), de esta forma, cuando IS_{PB} es igual a:

1.0-1.5 Clase I (oligosaprobía)

1.5-2.5 Clase II (beta-mesosaprobía)

2.5-3.5 Clase III (alfa-mesosaprobía)

> 3.5 Clase IV (polisaprobía)

V RESULTADOS

V.1 Parámetros fisicoquímicos

a) Temperatura.- De acuerdo con los registros de temperatura se detectó que esta se mantuvo en un intervalo de 10 a 14°C; esta variación se debió probablemente a la influencia de las oscilaciones de la temperatura ambiental (tabla 2), ya que el laboratorio no tiene ajuste de temperatura.

b) pH.- Los valores del pH a lo largo de la primera semana fueron, de ligeramente ácidos, 6.5 unidades, después de este lapso se registró un ascenso de 7.0 a 7.5. Posteriormente, este parámetro alcanzó un valor máximo de 8.0 unidades manteniéndose así hasta que la biocinta se estabilizó funcionalmente (tabla 2).

c) Oxígeno disuelto (OD).- Desde el arranque del reactor el oxígeno disuelto presentó concentración entre 7.5-7.7 mg/L, que se mantuvieron constantes a lo largo de todo el período experimental (tabla 2).

d) Demanda química de oxígeno (DQO).- En relación a la materia orgánica disuelta removida, medida como DQO, se pudo observar que en la primera semana ocurrió una remoción del 7% (1,860 mg DQO/L) y en las 7 semanas posteriores, un máximo del 80% (400 mg DQO/L), este último valor indica una alta concentración de material biodegradable eliminado y buena efectividad del sistema una vez alcanzada su estabilidad funcional (tabla 3 y figura 6).

e) Demanda bioquímica de oxígeno (DBO₅).- Referente a este parámetro, se estimó que la remoción inicial por parte de la biocinta fue del 6% (550 mg DBO₅/L), alcanzando hasta el 88% (70 mg DBO₅/L) durante la fase de régimen permanente (tabla 3 y figura 6).

Es importante mencionar que se consideró la fase estable de operación del reactor de biocinta cuando los valores de DQO, se mantuvieron constantes (\pm 5% de variación) por lo menos a lo largo de tres evaluaciones consecutivas.

Tabla 2.- Valores promedio de temperatura, pH y oxígeno disuelto (OD), registrados a lo largo de la fase experimental

Semana	Temperatura (°C)	pH	OD (mg/L)
1	10±0.70	6.5±0.12	7.6±0.10
2	11±0.10	6.5±0.11	7.6±0.10
3	10±1.00	7.0±0.07	7.7±0.08
4	13±1.5	7.5±0.11	7.5±0.05
5	12±0.70	7.5±0.05	7.5±0.15
6	13±0.90	8.0±0.07	7.6±0.11
7	14±1.30	8.0±0.10	7.6±0.15
8	14±0.80	8.0±0.15	7.6±0.15
9	14±1.00	8.0±0.26	7.6±0.15
10	14±0.80	8.0±0.10	7.6±0.10

Tabla 3.- Valores promedio de la concentración y porcentajes de remoción de materia orgánica, medida como DQO y DBO₅, de diferentes muestras provenientes de la biocinta

Semana	DQO (mg/L)	DQO (%remoción)	DBO ₅ (mg/L)	DBO ₅ (%remoción)
1	1860±138	7	550±10	6
2	1500±223	25	320±10	45
3	1200±158	40	260±11	56
4	1000±158	50	220±15	62
5	800±158	62	160±12	73
6	400±81	80	70±2	88
7	400±70	80	70±2	88
8	400±82	80	70±5	88
9	400±76	80	70±3	88
10	400±86	80	70±2	88

Nota: DQO inicial= 2 000 mg/L; DBO₅ inicial= 580 mg/L

V.2 Observaciones al microscopio

V.2.1 Crecimiento de la biopelícula sobre el medio de soporte

Una semana posterior a la inoculación y operación bajo condiciones dinámicas, la biopelícula comenzó a hacerse visible en el medio de soporte, observándose la proliferación de bacterias y escasos flagelados. Conforme aumentó el grosor de la biopelícula la diversidad microbiana también creció, asentándose de manera secuencial poblaciones de flagelados, ciliados, nemátodos, amebas y rotíferos. Cabe hacer mención que la mayor diversidad de microorganismos se presentó una vez que el reactor se encontró bajo condiciones de estabilidad funcional y alta eficiencia depuradora, condiciones de régimen pseudopermanente.

Por otra parte se observó que la biopelícula se desarrolló más rápida y primeramente sobre las placas de polietileno (PE), sección media, en segundo lugar en las de poliestireno (PS), sección más externa, y finalmente en las de cloruro de polivinilo (PVC) sección interna, la disposición de las placas se encuentra dada con respecto al eje central de la biocinta.

A pesar de la diferente rapidez de colonización en los materiales del soporte, la distribución de microorganismos no se vió afectada, ya que en todas ellas se presentó la misma riqueza de microorganismos.

La biopelícula mostró un crecimiento similar uniforme en los tres materiales plásticos una vez que el reactor alcanzó su estabilidad funcional.

En las observaciones de los microorganismos realizadas durante el tratamiento del agua de nejayote, se registró la presencia de bacterias, cocos y bacilos (gram-negativas, en su mayoría), flagelados, sarcodinos (amebas), ciliados, nemátodos y rotíferos.

V.2.2. Cuenta de microorganismos

Los resultados de la cuenta de microorganismos registrados durante los diferentes porcentajes de depuración logrados se observan en la tabla 4.

Tabla 4. Abundancia de los microorganismos/0.1 mL de muestra en los diferentes porcentajes de materia orgánica removida, medida como DQO (*)

MICROORGANISMO	*25	*40	*50	*62	*80
Ciliados	136	378	414	360	314
Flagelados	810	620	613	715	619
Amebas	0	0	0	72	90
Nemátodos	0	54	90	65	78
Rotíferos	0	0	0	54	144
Total	946	1052	1117	1266	1245

Tomando en consideración que es el grupo de los ciliados al que se le ha dado mayor relevancia, en la tabla 5 se hará un desglose de sus abundancias relativas en función de los porcentajes de remoción de materia orgánica logrados por la biocinta.

Tabla 5. Número de ciliados encontrados a diferentes porcentajes de remoción de materia orgánica, medida como DQO (*)

CILIADO	*25	*40	*50	*62	*80
<i>Colpidium colpoda</i>	45	108	72	45	48
<i>Cyclidium glaucum</i>	0	27	9	0	0
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	0	27	90	27	18
<i>Oxytricha fallax</i>	73	0	0	54	110
<i>Litonotus lamella</i>	0	45	45	72	31
<i>Euplotes sp</i>	0	0	0	81	31
Subtotal libres nadadores	118	207	216	279	238
<i>Opercularia coarctata</i>	0	36	90	27	9
<i>Epistylis plicatilis</i>	0	90	72	27	31
<i>Vorticella campanula</i>	0	45	36	9	9
Formas móviles de peritrico	18	0	0	18	27
Subtotal sésiles	18	171	198	81	76
Total	136	378	414	360	314

Como puede observarse en la tabla 5 se determinaron nueve géneros y ocho especies de ciliados. Con excepción del género *Euplotes sp*, los restantes han

sido registrados anteriormente el tratamiento de nejayote, empleando el sistema de película fija como los biodiscos (Luna-Pabello 1987, 1992 y 1993).

En la tabla 5 se observa que los ciliados libres nadadores en general sobrepasan a los sésiles; sin embargo a un porcentaje de remoción de 50% (1000 mg DQO/L), ambos tipos de ciliados tuvieron abundancias similares.

En comparación con los micrometazoarios los protozoos tanto flagelados, ciliados y sarcodinos, se presentaron en mayor abundancia, siendo los flagelados los más numerosos (tabla 4).

V.2.3 Valores de abundancia y diversidad de ciliados

En la tabla 6 se muestran los valores de los porcentajes relativo de los ciliados encontrados a los diferentes porcentajes de remoción de MOD, medido como DQO.

Tabla 6. Porcentaje relativo de los microorganismos registrados en la biocinta durante el tratamiento del nejayote, porcentaje de MOD removida, medida como DQO (*)

CILIADO	*25	*40	*50	*62	*80
<i>Colpidium colpoda</i>	33	29	17	13	15
<i>Cyclidium glaucoma</i>	0	7	2	0	0
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	0	7	22	8	6
<i>Oxytricha fallax</i>	54	0	0	15	35
<i>Litonotus lamella</i>	0	12	11	20	10
<i>Euplotes sp</i>	0	0	0	23	10
Subtotal libres nadadores	87	54	52	76	75
<i>Opercularia coarctate</i>	0	10	22	8	3
<i>Epiplatylus plicatilis</i>	0	24	17	8	10
<i>Vorticella campanula</i>	0	12	9	3	3
Formas móviles de peritrico	13	0	0	5	9
Subtotal sésiles	13	46	48	24	25
Total	100	100	100	100	100

En la tabla 7 se muestran los Índices de diversidad encontrados a los diferentes porcentajes de remoción evaluados como DQO, a lo largo de toda la fase experimental.

Tabla 7.- Valores de los índices de diversidad (H) Shannon-Weiner, diversidad máxima (H_{máx}) y homogeneidad (E).

Porcentaje de remoción de materia orgánica disuelta	H	H _{máx}	E
25	0.959	0.9691	0.9896
40	2.6660	2.8074	0.9285
50	2.6084	2.8074	0.9212
62	2.7176	2.9999	0.9062
80	2.5658	2.9999	0.8555

En las siguientes tablas 8-a, 8-b, 8-c, 8-d, 8-e, se indican los datos requeridos para el cálculo del Índice de diversidad (H) de Shannon-Weiner, diversidad Máxima (H_{máx}) y equidad (E) de la comunidad de ciliados, para cada uno de los porcentajes de MOD removida a lo largo de la fase experimental.

Tabla 8-a.- Datos requeridos para el cálculo del Índice de diversidad (H) de Shannon-Weiner, de diversidad máxima (H_{máx}) y equidad (E) de la comunidad de ciliados, para un porcentaje de remoción del 25%, medido como DQO

CILIADO	Número de individuos	PI	PI(log PI)
<i>Colpidium colpoda</i>	45	0.381	0.1597
<i>Cyclidium glaucoma</i>	0	0.000	0.0000
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	0	0.000	0.0000
<i>Oxytricha fallax</i>	73	0.618	0.1290
<i>Litonotus lamella</i>	0	0.000	0.0000
<i>Euplotes sp</i>	0	0.000	0.0000
<i>Opercularia coerctata</i>	0	0.000	0.0000
<i>Epistylis plicatilis</i>	0	0.000	0.0000
<i>Vorticella campanula</i>	0	0.000	0.0000
Total	118	1.000	0.2887

H=0.2887

Para realizar la conversión del \log_{10} a \log_2 , basta multiplicar el resultado por el factor 3.32192805, obteniéndose el valor final de H, por lo que para el particular da H=0.9590

Tabla 8-b.- Datos requeridos para el cálculo del Índice de diversidad (H) de Shannon-Weiner, de diversidad máxima (H_{máx}) y equidad (E) de la comunidad de ciliados, para un porcentaje de remoción del 40%, medido como DQO

CILIADO	Número de individuos	PI	Pi(log Pi)
<i>Colpidium colpoda</i>	108	0.2857	0.1554
<i>Cyclidium glaucoma</i>	27	0.0714	0.0818
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	27	0.0714	0.0818
<i>Oxytricha fallax</i>	0	0.0000	0.0000
<i>Litonotus lamella</i>	45	0.1190	0.1100
<i>Euplotes sp</i>	0	0.0000	0.0000
<i>Opercularia coarctata</i>	36	0.0952	0.0972
<i>Epistylis plicatilis</i>	90	0.2381	0.1484
<i>Vorticella campanula</i>	45	0.1190	0.1100
Total	378	1.0000	0.7847

H=0.7847 multiplicado por el factor de conversión da H=2.6066

Tabla 8-c.- Datos requeridos para el cálculo del Índice de diversidad (H) de Shannon-Weiner, de diversidad máxima (H_{máx}) y equidad (E) de la comunidad de ciliados, para un porcentaje de remoción del 50%, medido como DQO.

CILIADO	Número de individuos	PI	Pi(log Pi)
<i>Colpidium colpoda</i>	72	0.1739	0.1321
<i>Cyclidium glaucoma</i>	9	0.0127	0.0361
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	90	0.2174	0.1440
<i>Oxytricha fallax</i>	0	0.0000	0.0000
<i>Litonotus lamella</i>	45	0.1086	0.1047
<i>Euplotes sp</i>	0	0.0000	0.0000
<i>Opercularia coarctata</i>	72	0.1739	0.1321
<i>Epistylis plicatilis</i>	90	0.2174	0.1440
<i>Vorticella campanula</i>	36	0.0869	0.0922
Total	414	1.0000	0.7852

H=0.7852 multiplicado por el factor de conversión da H=2.6084

Tabla 8-d.- Datos requeridos para el cálculo del Índice de diversidad (H) de Shannon-Weiner, de diversidad máxima (H_{máx}) y equidad (E) de la comunidad de ciliados, para un porcentaje de remoción del 62%, medido como DQO

CILIADO	Número de individuos	Pi	Pi(log Pi)
<i>Colpidium colpoda</i>	45	0.1316	0.1159
<i>Cyclidium glaucoma</i>	0	0.0000	0.0000
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	27	0.0789	0.0812
<i>Oxytricha fallax</i>	54	0.1578	0.1265
<i>Litonotus lamella</i>	72	0.2105	0.1425
<i>Euplotes sp</i>	81	0.2368	0.1481
<i>Opercularia coarctata</i>	27	0.7890	0.0812
<i>Epiplatys plicatilis</i>	27	0.7890	0.0812
<i>Vorticella campanula</i>	9	0.0236	0.0415
Total	342	1.0000	0.8181

H=0.8181 multiplicado por el factor de conversión da H=2,7176

Tabla 8-e.- Datos requeridos para el cálculo del Índice de diversidad (H) de Shannon-Weiner, de diversidad máxima (H_{máx}) y equidad (E) de la comunidad de ciliados, para un porcentaje de remoción del 80%. medido como DQO

CILIADO	Número de individuos	Pi	Pi(log Pi)
<i>Colpidium colpoda</i>	48	0.1672	0.1298
<i>Cyclidium glaucoma</i>	0	0.0000	0.0000
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	18	0.0627	0.0754
<i>Oxytricha fallax</i>	110	0.3832	0.1596
<i>Litonotus lamella</i>	31	0.1080	0.1044
<i>Euplotes sp</i>	31	0.1080	0.1044
<i>Opercularia coarctata</i>	9	0.0314	0.0472
<i>Epiplatys plicatilis</i>	31	0.1080	0.1044
<i>Vorticella campanula</i>	9	0.0314	0.0472
Total	287	1.0000	0.7724

H= 0.7724 multiplicado por el factor de conversión da H=2.5658

V.2.4 Intervalos de saprobiaidad de ciliados

En la siguiente tabla se muestran los intervalos de tolerancia a la contaminación orgánica, presentada por la comunidad de ciliados registrada en el estudio.

Tabla 9. Ciliados registrados en el reactor de biocinta a los diversos intervalos de contaminación orgánica medida como DBO₅

CILIAADO	Intervalo de DBO ₅ (mg/L)
<i>Colpidium colpoda</i>	*550 - 70
<i>Cyclidium glaucoma</i>	*260 - 220
<i>Oxytricha fallax</i>	*550 - 70
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	*260 - 70
<i>Litonotus lamella</i>	*260 - 70
<i>Euplotes sp</i>	160 - 70
<i>Opercularia coarctata</i>	*260 - 70
<i>Epistylis plicatilis</i>	*260 - 70
<i>Vorticella campanula</i>	*260 - 70

* El análisis se hizo considerando sólo a las especies señaladas, debido a que los sistemas saprobios preferentemente son aplicables a este nivel taxonómico.

V.2.4.1 Valores del índice de saprobiaidad de ciliados

Tabla 10. Datos requeridos para el cálculo del índice de calidad del agua (IS_{PB})

ESPECIE	N	IS	N.IS
<i>Cyclidium glaucoma</i>	5	3.1	15.5
<i>Epistylis plicatilis</i>	5	2.8	14.0
<i>Litonotus lamella</i>	5	2.8	14.0
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	5	4.1	20.5
<i>Oxitricha fallax</i>	5	3.0	15.0
<i>Colpidium colpoda</i>	5	4.0	20.0
<i>Vorticella campanula</i>	5	2.4	12.0
<i>Opercularia coarctata</i>	5	2.9	14.5
Total	40	25.1	125.5

por lo que:

$$IS_{PB} = 125.5/40 = 3.138$$

V.2.5 Ubicación taxonómica de los ciliados encontrados

De acuerdo con las observaciones realizadas, tanto en las preparaciones temporales como permanentes, se identificaron un total de nueve géneros y ocho especies pertenecientes al Phylum Ciliophora. Así mismo, se observaron, aunque no se realizaron sus respectivas determinaciones, representantes de los Phyla Sarcomastigophora, Nematoda y Rotifera.

Se da a continuación la posición taxonómica de acuerdo con Small y Lynn (1985) y referida en Luna-Pabello (1987, 1990 y 1993), además de algunos comentarios sobre sus hábitos alimenticios y presencia en sistemas de tratamiento.

PHYLUM	CILIOPHORA Doflein, 1901
Clase	Spiritrichea Bütschli, 1889
Subclase	Stichotrichia Small y Lynn, 1985
Orden	Stichotrichida Fauré-Fremiet, 1961
Suborden	Sporothricina Fauré-Fremiet, 1961
Familia	Oxytrichidae Ehrenberg, 1838

Oxytricha fallax Stein, 1859

Su alimento lo constituyen las bacterias, algas y flagelados. Ha sido registrado en sistemas de lodos activados, filtros percoladores, tanques Imhoff, aguas residuales no tratadas (Curds, 1975; Rico-Ferrat y López-Ochoterena, 1976a,b; Rivera *et al.*, 1988) y reactores de biodiscos, (Luna-Pabello *et al.*, 1990a,b; Sánchez, 1994).

Subphylum	Rhabdophora Small, 1976
Clase	Litostomatea Small y Lynn, 1981
Subclase	Haptoria Corliss, 1974
Orden	Pleurostomatida Schewiakoff, 1896
Familia	Amphileptidae Bütschli, 1889

Litonotus lamella Mueller, 1773

Se alimenta de flagelados y ciliados, presenta distribución cosmopolita, comúnmente se le encuentra en aguas ricas en material orgánico en descomposición. Se ha registrado en filtros percoladores (Bick, 1972; Curds, 1975) y sistemas de biodiscos (Rivera *et al.*, 1988 y Luna-Pabello, 1993).

SUBPHYLUM **Cyrtophora** Small, 1976
Clase **Nassophorea** Small y Lynn, 1981
Subclase **Hypotrichia** Stein, 1859
Orden **Euplotida** Small y Lynn, 1985
Suborden **Euplotina** Small y Lynn, 1981
Familia **Euplotidae** Ehrenberg, 1838

***Euplotes* sp** Wrezniewsky, 1870

Este género se alimenta principalmente de bacterias, estos ciliados proliferan, tanto en aguas dulces, como salobres y marinas (Aladro-Lubel, *et al.*, 1990). También se le ha reportado en lagunas de oxidación de efluentes petroquímicos (Anaya-Huertas, 1992).

Clase **Oligohymenophorea** de Puytorac *et al.*, 1974
Subclase **Hymenostomatia** Delage y Hérouard, 1896
Orden **Hymenostomatida** Delage y Hérouard, 1896
Suborden **Tetrahymenina** Fauré-Fremiet, en Corliss, 1956
Familia **Tetrahymenidae** Corliss, 1952

Tetrahymena pyriformis Ehrenberg, 1831

Su dieta alimenticia abarca detritos, bacterias y algas. Es un ciliado con distribución cosmopolita y, comúnmente, cambia de forma en respuesta a presiones locales. Habita aguas contaminadas con materia orgánica en descomposición (Bick, 1972). Prolifera en filtros percoladores, reactores biológicos rotatorios, lagunas de oxidación y canales de aguas residuales domésticas (Bick, 1976; Curds, 1975; Rico-Ferrat y López-Ochoterena 1976 a,b; Rivera *et al.*, 1988; Sánchez, 1994).

Familia **Turaniellidae** Didier, 1971

Colpidium colpoda Losana, 1829

Se alimenta de detritos, bacterias, flagelados y algas. Es cosmopolita, habita en aguas ricas en materia orgánica en descomposición (Bick, 1972). Proliferan en filtros percoladores, lodos activados (Curds, 1975) y sistemas de biodiscos (Luna-Pabello 1990; Luna-Pabello *et al.*, 1990a,b).

Suborden **Pleuronematina** Fauré-Fremiet en Corliss, 1956
Familia **Cyclidiidae** Ehrenberg, 1838
Cyclidium glaucoma Müller, 1773

Su alimento lo constituyen las bacterias y algas, presenta una distribución amplia, se desarrolla en aguas con materia orgánica en descomposición (Bick, 1972). Se ha registrado como habitante de filtros percoladores, lodos activados, tanques Imhoff, sistemas rotatorios de biodiscos y aguas negras sin tratar (Curds, 1975; Rico-Ferrat y López-Ochoterena 1976 a, b; Rivera *et al.*, 1988; Luna-Pabello, 1993; Sánchez, 1994).

Subclase Peritrichia Stein, 1859
Orden Sessilida Kahl, 1933
Familia Epistylididae Kahl, 1933

Epistylis plicatilis Ehrenberg, 1831

Es un ciliado sésil que se alimenta de bacterias y se le encuentra en aguas con materia orgánica disuelta, (Bick, 1972). Se le ha registrado en filtros percoladores y lodos activados (Curds, 1975), así como en sistemas de biodiscos (Luna-Pabello, 1993), en estos sistemas de tratamiento biológico del agua se le ha observado adherido a detritos y agregados bacterianos.

Familia Operculariidae Fauré-Fremiet en Corliss, 1979

Opercularia coarctata Claparède y Lachmann, 1858

Se alimenta de bacterias, detritos y flagelados. Al igual que los demás ciliados se desarrolla en aguas ricas en material orgánico en descomposición. Se ha registrado en filtros percoladores, lodos activados (Curds 1975) y biodiscos (Luna-Pabello *et al.*, 1990 a, b; Luna-Pabello, 1990; 1993). Se adhiere a detritos y grumos bacterianos.

Familia Vorticellidae Ehrenberg, 1838

Vorticella campanula Ehrenberg, 1831

Su alimento lo constituyen las bacterias. Es un organismo sésil de distribución cosmopolita, se presenta, tanto en aguas estancadas como fluidas (Bick, 1972). Usualmente se encuentran adheridos a diversos soportes. Se han registrado que habita en filtros percoladores, lodos activados y sistemas de biodiscos (Curds, 1975; Rivera *et al.*, 1988; Luna-Pabello, 1990 y 1993).

VI ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

VI.1 Efecto de los parámetros fisicoquímicos

De acuerdo con los valores de temperatura registrados en el agua contenida en el reactor (tabla 2), éstos no resultaron limitantes para la proliferación de los microorganismos depuradores. El intervalo de temperatura osciló entre 10 y 14°C, lo cual corresponde a un ambiente adecuado para organismos psicrófilos. Es posible esperar que a temperaturas mayores, se incremente la actividad microbiana y se presente una mayor abundancia poblacional (Luna-Pabello *et al*, 1992).

Por otra parte, los valores de pH, denotan que la acidez del líquido de alimentación (6.0-6.5 unidades) se neutraliza rápidamente después de la primera semana de operación, a flujo cerrado, lapso en el cual el agua residual bajo tratamiento mostró una tendencia hacia valores de pH neutro-alcalinos (7.0-7.5 unidades) hasta que finalmente se alcanzaron condiciones alcalinas (8.0 unidades). Este fenómeno de neutralización aparece indicado en trabajos previos realizados en otro tipo de sistemas aerobios depurando este mismo tipo de aguas residuales (Bekris, 1992). Por este motivo no es necesario someter el agua de alimentación a un tratamiento previo de neutralización (tabla 2).

Debe hacerse énfasis en que el pH constituye un factor limitante en la manifestación trófica microbiana. Mientras más cercanos sean los valores a un pH neutro, se hace menos restrictiva la presencia de mayor número de microorganismos. Valores de pH fuertemente ácidos impiden el desarrollo de protozoos ciliados y micrometazoos, los cuales son degradadores de materia orgánica y consumidores de bacterias. El cambio hacia un pH neutro-alcalino, se induce inicialmente por la actividad microbiana de las bacterias y flagelados que son los primeros colonizadores del medio de soporte (espiral). Este tipo de seres promueven el amortiguamiento del pH como consecuencia del desprendimiento de CO₂ metabólico y de la reacción de éste con el agua y la cal (contenida en el agua bajo tratamiento) formando bicarbonatos.

El reactor de biocinta operó permanentemente bajo condiciones aerobias, es decir, con oxígeno disuelto a concentraciones mayores de 2 mg/L. Los valores registrados en el licor mezclado (agua residual en tratamiento), fueron entre 7.5 y 7.7 mg OD/L, por lo que el oxígeno disuelto no constituyó un elemento limitante para el metabolismo aerobio.

Concentración de MOD medida como DQO y DBO5 (mg/L)

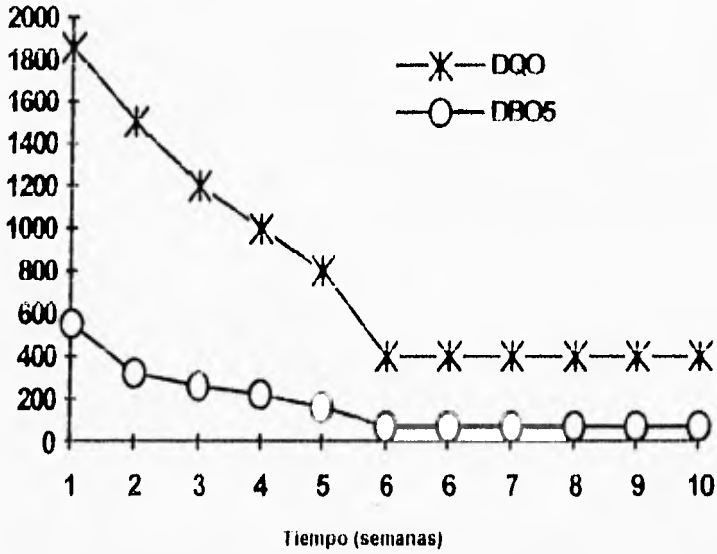


Figura 6.- Concentración de material orgánico disuelto medido como DQO y DBO5.

En consecuencia sería posible bajo iguales circunstancias de operación alimentar una mayor concentración de materia orgánica disuelta (superior a los 2,000 mg/L, medida como DQO), a la biocinta y obtener el mismo nivel depurativo. Lo anterior es factible dado que la turbulencia generada por rotación del soporte permite una alta transferencia de oxígeno atmosférico hacia el agua en tratamiento.

Considerando los valores de remoción de materia orgánica disuelta (MOD) logrados por la biocinta, éstos se pueden considerar satisfactorios debido a que, en términos de DQO, se logró la eliminación del 80% de su contenido total, mientras que, medido como DBO₅, la remoción fue de aproximadamente el 90% (figura 6).

De manera global puede decirse que bajo las condiciones de operación establecidas, la biocinta resultó ser un sistema de tratamiento adecuado para remover MOD en concentraciones moderadas y que es posible lograr la misma remoción en menor tiempo al incrementar la temperatura de operación o bien depurar mayor volumen de agua con eficiencias similares e inclusive, dados los niveles de oxigenación alcanzados, tratar aguas residuales con mayor contenido de contaminantes orgánicos disueltos, debido a que el oxígeno no es factor limitante para la actividad metabólica de los microorganismos aerobios.

De manera adicional, puede mencionarse que como consecuencia de la alta turbulencia generada por el medio de soporte (biocinta) existió una alta producción de espuma, lo que merma el funcionamiento del eje de rotación, por lo cual resulta conveniente pensar en incorporar una estructura que proteja o desaloje de manera eficiente dicha espuma a fin de evitar eventuales paros operacionales a consecuencia de las actividades de mantenimiento prematuro, con la consiguiente desestabilización del reactor.

Con respecto a la estructura del soporte, ésta resultó poco resistente, dado que perdió su consistencia una vez que fue completamente colonizado, propiciando que perdiera su arreglo espiralado, tornándose amorfo al final de la experimentación. En este sentido, es recomendable idear una estructura complementaria que dé consistencia al soporte o bien construirlo con un material de mayor resistencia a la deformación mecánica.

VI.2 Ecología microbiana

En relación al estudio de los microorganismos que intervienen durante el proceso depurativo, puede decirse, que en general, se encuentran representados por ejemplares, tanto del tipo procarionte (bacterias), como eucarionte (protozoos, nemátodos y rotíferos).

A este respecto se pudo constatar la alta abundancia de bacterias en forma bacilar y de cocos gram-negativos, lo cual ha sido comúnmente reportado para sistemas de aguas residuales domésticas e industriales biodegradables. Es importante recordar que las bacterias constituyen un alimento importante de los protozoos. Además se les atribuye entre el 50 y 80% de remoción de la materia orgánica disuelta biodegradable (Madoni, 1981)

Referente a los protozoos (figura 7), fue posible observar tróficamente activos, flagelados, ciliados y amebas. Lo primeros se encontraron en mayor concentración durante todo el tratamiento del líquido, mientras que los segundos estuvieron más representados en las etapas de contaminación intermedia del 40% al 62% (1,200-1,000 mg DQO/L). En cuanto a las amebas, éstas fueron poco abundantes y se presentaron durante los periodos de menor contaminación, es decir de alto porcentaje de remoción (aguas con concentraciones de MOD de 400 mg DQO/L). Lo anterior coincide con la sucesión microbiana descrita, tanto para cuerpos acuáticos naturales contaminados orgánicamente, como para plantas depuradoras de aguas residuales domésticas (Cairns *et al*, 1972; Kinner y Curds, 1988; Torreblanca, 1992).

Con respecto a los micrometazoos, se pudo apreciar que los rotíferos resultaron más abundantes que los nemátodos, en los niveles de mayor remoción de MOD (figura 7). Su presencia ha sido estrechamente relacionada con una "buena" calidad del agua tratada (Kinner y Curds 1988), lo cual se vió corroborado con los parámetros fisicoquímicos evaluados en el presente estudio.

Acorde con lo anteriormente descrito puede decirse que, desde el punto de vista fisicoquímico y biológico, la biocinta alcanzó durante su etapa de operación estable, una alta eficiencia depuradora. Adicionalmente, la presencia de diferentes grupos de microorganismos confirma que la calidad del agua no es nociva o restrictiva para su proliferación. Lo anterior puede interpretarse como sigue: una amplia representación de dichos grupos es reflejo de niveles de contaminación bajos. Tomando como punto de partida los estudios referentes a la estructura comunitaria de ambientes acuáticos contaminados, existe menor diversidad de seres vivos conforme la contaminación del agua es mayor y viceversa (Cairns, 1982).

De manera particular, el grupo de los ciliados estuvo representado por nueve géneros y ocho especies (tabla 5), todos ellos previamente registrados y descritos como organismos comunes en reactores biológicos rotatorios que depuran aguas residuales de la industria de la nixtamalización de maíz (Luna-Pabello *et al*, 1988) y en sistemas de tratamiento aerobio de aguas domésticas (Curds, 1975; Rivera *et al*, 1988). Un aspecto interesante de remarcar es que, comparando la riqueza de especies de ciliados encontrados en el presente estudio, es significativamente menor que las registradas durante el tratamiento de las aguas residuales con los

reactores de biodiscos. Lo anterior podría implicar la presencia de algún factor limitante para la proliferación de un número mayor de especies

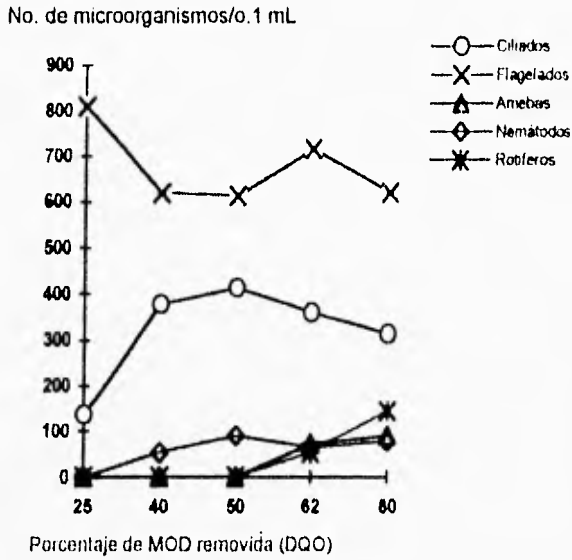


Figura 7.- Abundancia de los diferentes grupos de microorganismos encontrados a diferentes porcentajes de remoción de MOD, medida como DQO.

VI.3 Relación de la materia orgánica disuelta removida y los microorganismos de la biopelícula

Las observaciones realizadas al microscopio pusieron de manifiesto que los primeros microorganismos en proliferar y colonizar la biocinta fueron las bacterias gram-negativas (cocos y bacilos principalmente). Estas bacterias constituyen en sí la matriz gelatinosa (bacteriana) y, posteriormente se presentaron bacterias de tipo filamentosas, las cuales formaron flóculos. A continuación, se detectó la presencia de un bajo número de algas y protozoos zooflagelados. Dicha composición microbiana se observó cuando la biocinta solamente había conseguido remover aproximadamente el 7% del total de MOD, lo cual es equivalente a una concentración de material orgánico, en el líquido residual en tratamiento de aproximadamente 1,860 mg DQO/L.

De manera paulatina, se fueron incorporando al consorcio de microorganismos presente de manera activa, ciliados de las especies *Oxytricha fallax* y *Colpidium colpoda*, así como escasas formas móviles de peritricos. En tales circunstancias, la remoción lograda fue cercana al 25% de la DQO, por lo cual el líquido contenido en el reactor tenía una concentración aproximada de 1,500 mg DQO/L de MOD (figura 8).

Cuando se llegó al 40% de eliminación del material biodegradable, equivalente a 1,200 mg DQO/L, los ciliados pedunculados, *Vorticella campanula*, *Opercularia coarctata* y *Epistylis plicatilis*, empezaron a ser registrados. Durante esta etapa de preestabilización se incorporaron a la comunidad de microorganismos presente en la biopelícula, los ciliados de nado libre *Cyclidium glaucoma*, *Tetrahymena pyriformis* y *Litonotus lamella* (tabla 5 y figura 9).

A un porcentaje de remoción del 50%, es decir 1,000 mg DQO/L, se encontró la mayor abundancia, siendo muy similares entre sí la cantidad de ciliados libres nadadores respecto de los de tipo sésiles (tablas 5 y figura 10).

Es importante mencionar que los ciliados sésiles se consideran un grupo de protozoos relevante, debido a que su actividad refleja mayor estabilidad de las condiciones del medio y al ser organismos esencialmente filtradores, reducen la cantidad de bacterias suspendidas las cuales se encuentran estrechamente relacionadas con la turbidez del agua en tratamiento (Madoni, 1981).

Cuando la eliminación de MOD fue del 62%, es decir una concentración de 800 mg DQO/L, ambos tipos de ciliados tendieron a disminuir en número, incrementando de manera paralela la abundancia de los nemátodos. Es importante señalar que bajo estas circunstancias, los rotíferos y las amebas se incorporan como nuevos elementos de la comunidad microbiana prevaleciente en la biopelícula. También es notable la aparición del ciliado del género *Euplotes* sp (figura 11 y tabla 4).

Asimismo, coincide con la secuencia microbiana descrita para lodos activados, filtros percoladores y biodiscos que depuran aguas residuales domésticas (Curds, 1975; Kinner, 1984).

Cuando la concentración de materia orgánica disuelta fue de 400 mg DQO/L, se obtuvo el 80% de remoción de dicho contaminante, (tabla 4 y figura 12). En éstas circunstancias se hizo notable, por un lado, la disminución de los ciliados y por otro, el incremento de los nemátodos y rotíferos. Asimismo, dada la diversidad de microorganismos presentes en este nivel de remoción de MOD, se deduce el establecimiento de una avanzada complejidad en la estructura comunitaria que conforma la biopelícula.

Esta apreciación ya ha sido descrita para cuerpos de agua naturales, en los cuales dichos microorganismos (los micrometazoarios) se presentan siempre y cuando la contaminación orgánica prevaleciente fuera baja y el agua estuviera suficientemente oxigenada, razón por la cual se consideró que el reactor al mostrar dicha complejidad y composición microbiana, alcanzó desde el punto de vista biológico su estabilidad funcional.

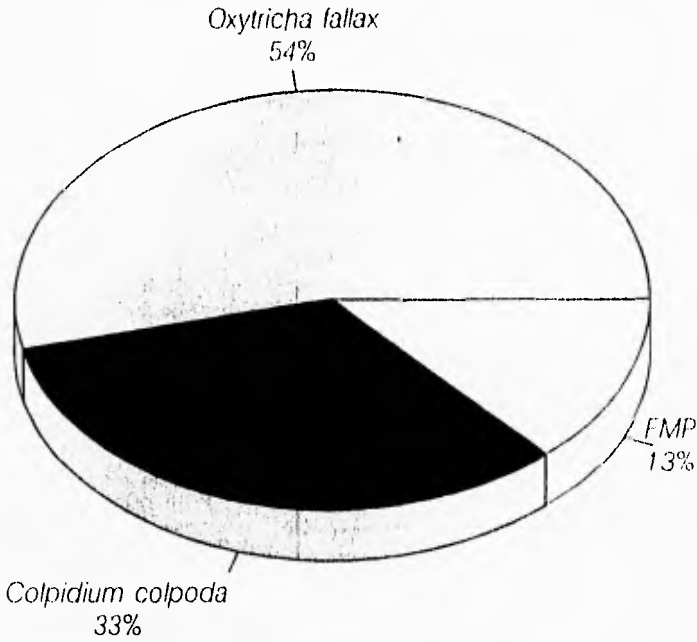


Figura 8.- Porcentaje de ciliados encontrados a una remoción del 25% (1,500 mgDQO/L). FMP (Formas móviles de peritrico)

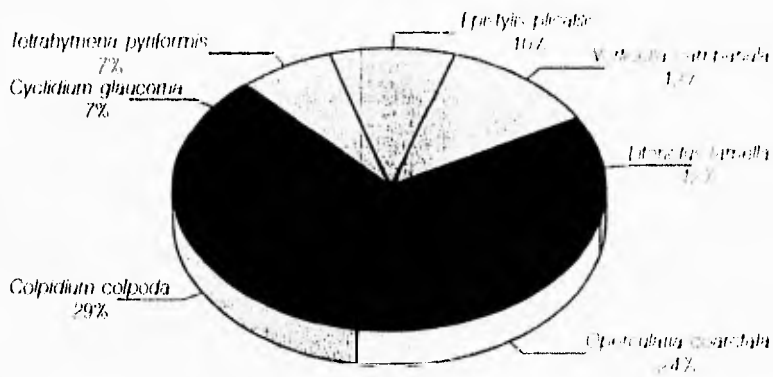


Figura 9.-Porcentaje de ciliados encontrados a una remoción del 40% (1,200 mg/L)

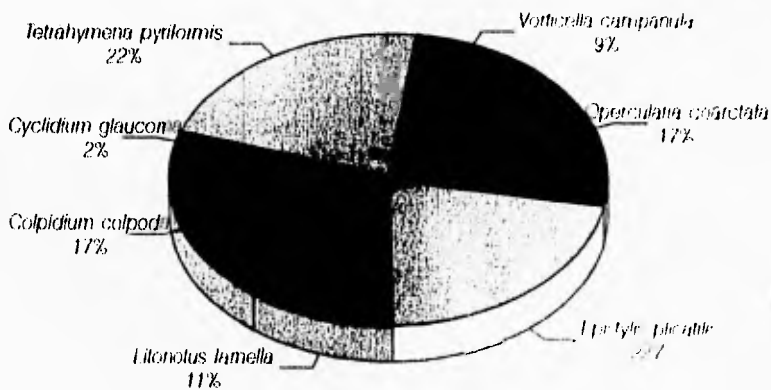


Figura 10.- Porcentaje de ciliados encontrados a una remoción del 50% (1,000 mgDQO/L).

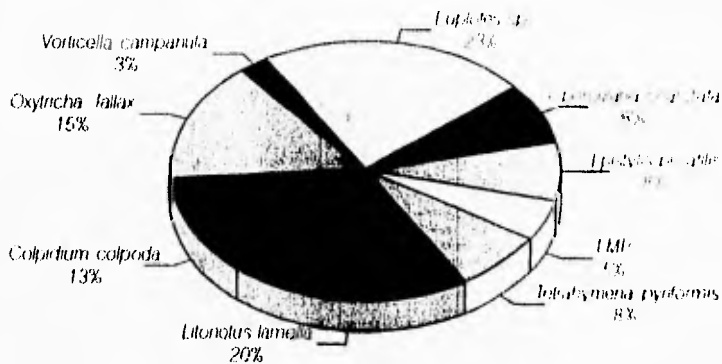


Figura 11.- Porcentaje de ciliados encontrados a una remoción del 62% (800 mgDQO/L). FMP (Formas móviles de peritrico)

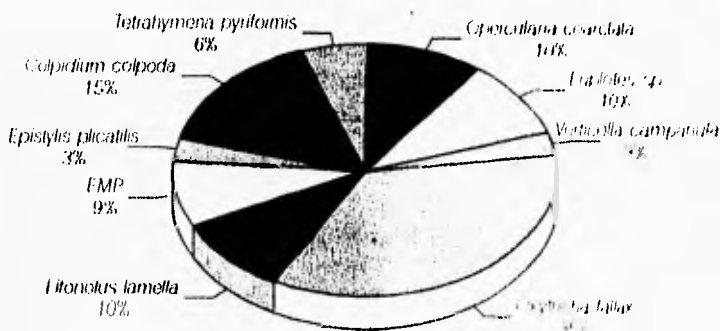


Figura 12.- Porcentaje de Ciliados encontrados a una remoción del 80% (400 mg/L). FMP (Formas móviles de peritrico).

De manera complementaria puede decirse, que desde el punto de vista fisicoquímico y bioquímico, el reactor alcanzó su estabilidad funcional (régimen permanente), debido a que los valores de remoción de MOD medido como DQO y DBO₅, se mantuvieron relativamente constantes por lo menos durante tres evaluaciones consecutivas (tabla 3).

Colpidium colpoda, resultó ser el ciliado nadador más frecuente a lo largo del tratamiento del agua de nejayote utilizando el reactor de biocinta (figura 13), por lo que podría catalogarse como un organismo euribionte o de amplia tolerancia ambiental. Además, se presentó de manera permanente (eurisaprobio) durante el proceso de colonización del medio de soporte y puede considerarse como organismo pionero. Este hecho ha sido reportado en investigaciones previas en sistemas de tratamiento de película fija (Kinner y Curds, 1988).

De los ciliados sésiles es ***Epistylis plicatilis***, el que presentó una mayor abundancia (figura 14). Este peritrico ha sido reportado en sistemas de tratamiento como filtros percoladores y de lodos activados y está frecuentemente asociado con una buena evolución del proceso depurativo (Kinner, 1984; Madoni, 1986; Foissner, 1990).

La estructura de la comunidad microbiana asentada en la biocinta se vuelve más compleja a medida que aumenta la remoción orgánica, estableciéndose mayor número de eslabones tróficos. En el presente caso, la materia orgánica disuelta representa la fuente principal de alimento y está integrada en parte por aquella contenida en el líquido residual suministrado al reactor y por los productos del metabolismo de los microorganismos y microorganismos muertos.

Posteriormente, se encuentran los consumidores primarios, como las bacterias y los consumidores secundarios como los flagelados y algunos ciliados tipo ***Colpidium colpoda***, ***Tetrahymena pyriformis***, ***Opercularia coarctata***, así como los nemátodos y finalmente consumidores terciarios, tipo ciliados "carnívoros" como ***Litonotus lamella*** y omnívoros como amebas y rotíferos (figura 15).

A partir de la trama alimenticia descrita se infiere que se establece un equilibrio entre las diversas poblaciones microbianas, pudiéndose observar sobre la espiral de la biocinta, una película biológica muy densa, mostrando un grado de complejidad microbiana, similar al de un cuerpo de agua natural (Fernández-Galiano, 1990) y en humedales (Pratt y Cairns, 1985).

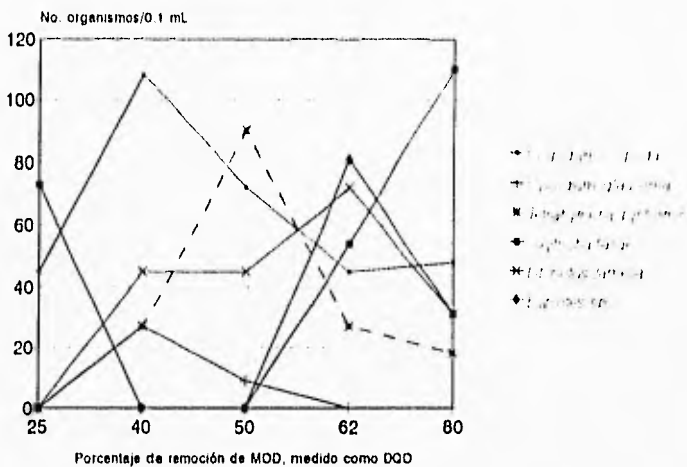


Figura 13.- Abundancia de los ciliados libres nadadores encontrados a diferentes porcentajes de remoción de MOD, medida como DQO.

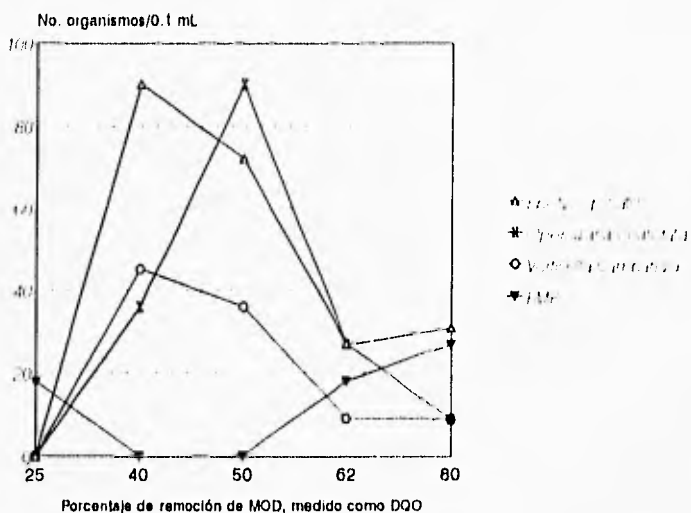


Figura 14.- Abundancia de los ciliados sésiles encontrados a diferentes porcentajes de remoción de MOD, medida como DQO.

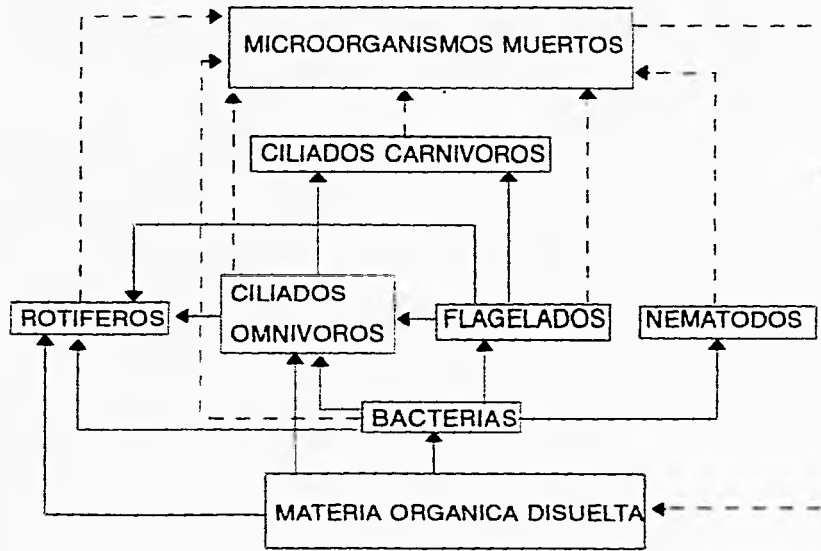


Figura 15.- Trama trófica presente durante la etapa de operación estable de la biocinta

VI.4 Abundancia y diversidad de ciliados

Para el caso particular del reactor de biocinta, alimentado con nejayote, los ciliados y micrometazoarios se distribuyeron de manera uniforme sobre el soporte, presentando abundancias variables a lo largo de la fase experimental. Cabe hacer mención que, a lo largo de todo el período experimental, los ciliados libres nadadores se presentaron en mayor abundancia que los de tipo sésil, pero en la etapa final los primeros tendieron a disminuir (tabla 5). En cambio, los micrometazoarios aumentaron progresivamente su abundancia conforme el porcentaje de depuración lo hacía.

Como se observa en las fases intermedias, 40% y 62% de eliminación de MOD (tabla 6 y figura 16), se presenta una abundancia similar entre ciliados de nado libre y sésiles, lo que pudiera ser debido a la existencia de una mayor concentración de bacterias, las cuales constituyen su alimento principal, y a la existencia de condiciones fisicoquímicas menos restrictivas para su proliferación (Luna-Pabello, 1993).

Cabe mencionar que, posiblemente, la conformación estructural del medio de soporte y la alta turbulencia generada con su desplazamiento dentro del líquido halla sido restrictiva para el establecimiento de un mayor número de individuos de tipo sésil (tabla 6).

Es importante destacar que las bacterias, a pesar de que no fueron determinadas ni contadas, constituyen junto con los flagelados los grupos más numerosos, por lo que se hace necesario considerar un estudio específico sobre los mismos, a fin de ponderar con mayor certeza la importancia de cada grupo en la formación de la biopelícula durante las fases pre-estable y estable del reactor.

Por otra parte, para el caso en particular, se aplicó el cálculo numérico del índice de diversidad (H) de Shannon-Weiner a fin de asociar el nivel depurativo logrado por la biocinta (concentración de MOD removida), con el número de especies de ciliados presentes en cada porcentaje de remoción medido.

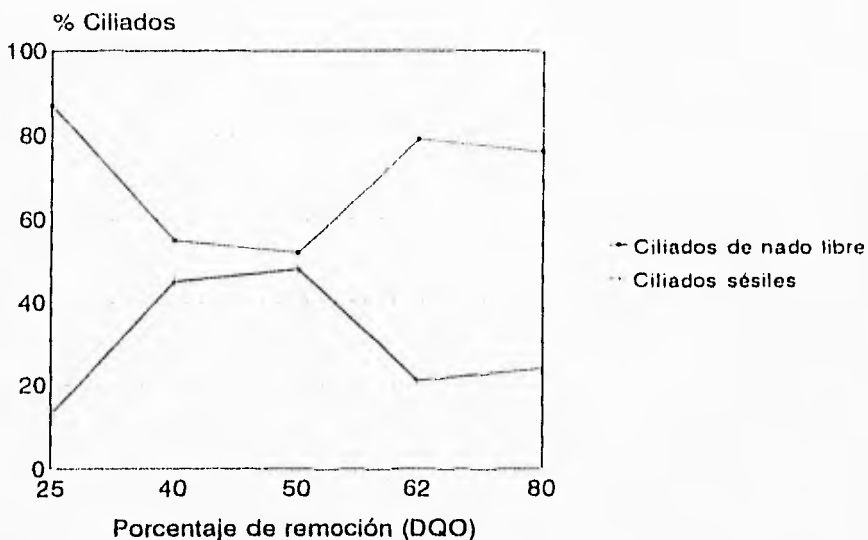


Figura 16.- Abundancia relativa de ciliados de nado libre y sésiles, encontrados a los diferentes niveles de remoción de materia orgánica disuelta, medida como DQO.

Como puede observarse en la tabla 7 y figura 17, conforme disminuye la concentración de MOD, medida como DQO, en el reactor de biocinta la diversidad aumenta encontrándose en las fases intermedias de contaminación (40 al 62% de remoción, medido como DQO) la mayor diversidad de los ciliados y en las concentraciones extremas más y menos contaminadas del tratamiento del nejayote, el índice de diversidad es menor, lo cual indica que el número y la abundancia relativa de las especies y/o géneros que integran la comunidad también baja.

Para este caso en particular, se considera que el valor de H se ve afectado principalmente por la disminución de los porcentajes relativos de las especies, no así por su número debido a que la riqueza específica constante se conserva. Este hecho puede explicarse si se considera que al aumentar el nivel depurativo de la biocinta, la concentración de MOD se vuelve un factor limitante para el crecimiento bacteriano y con ello para los ciliados, estableciéndose una fuerte competencia inter e intraespecífica por el alimento y, consecuentemente, originando el decremento de su abundancia.

Por otro lado, en términos de homogeneidad (E), a medida que este valor se parezca más a 1, la comunidad será más homogénea y su riqueza específica será más similar a la abundancia esperada para ese ecosistema. Podría interpretarse que, en el ambiente evaluado, no existen factores restrictivos para la manifestación de especies posibles de estar presentes Iróficamente activas.

Al respecto, en el reactor de biocinta, los valores de E, tuvieron un comportamiento similar a los de H, disminuyendo su valor durante las fases de preestabilización y régimen permanente.

Como se puede observar en la tabla 7, en el primer intervalo E es igual a entre 0.9896 y se encuentra más cerca de la unidad, por lo que se puede afirmar que existe igualdad entre la distribución de recursos y las especies presentes. En el segundo caso (80% de remoción) E es igual a 0.8555, valor que se aleja de 1, por lo que la comunidad tiende a ser heterogénea y perder su equitatividad. Adicionalmente, se estima que la disponibilidad de los recursos también tiende a ser desigual para la comunidad de ciliados.

Como se mencionó anteriormente, los valores de H_{\max} o diversidad máxima, permiten estimar el número de especies que potencialmente pueden encontrarse como integrantes de una comunidad en un ambiente dado. A partir de su comparación con H, se puede deducir qué proporción de los ciliados presentes conformaron la biopelícula, para cada uno de los diferentes porcentajes de remoción de MOD evaluados (tabla 7).

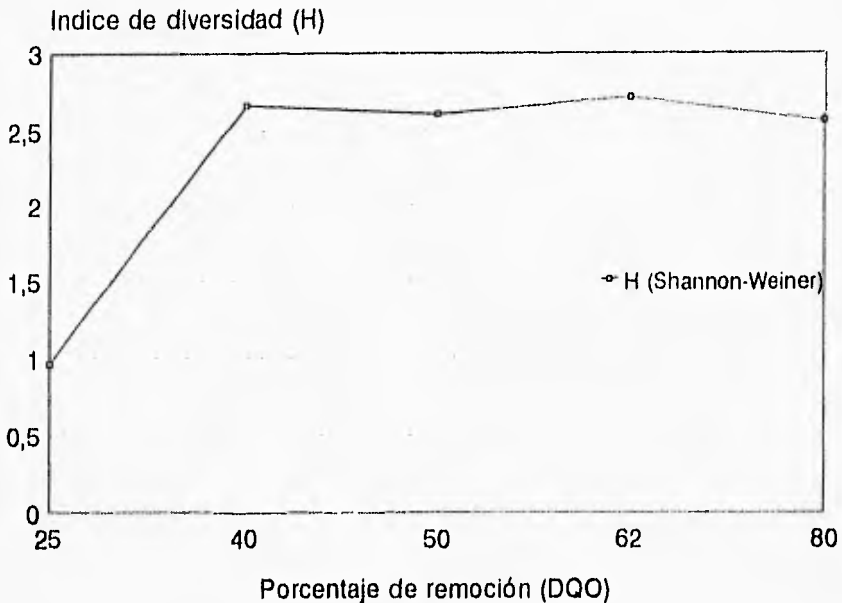


Figura 17.- Indices de diversidad de la comunidad de ciliados encontrados a los diferentes porcentajes de remoción de MOD, medido como DQO.

A lo largo de la fase de preestabilización se encontró que la representación de la comunidad de ciliados fue superior al 90% de la esperada, en tanto que durante la fase de régimen permanente o estable del reactor, sólo se encontró aproximadamente el 85% de las especies que pueden conformar de manera real a la comunidad de ciliados. Este fenómeno puede parcialmente explicarse debido a la disminución de la MOD en el líquido bajo tratamiento

VI.5 Evaluación de la calidad del agua

De acuerdo al sistema de saprobiedad propuesto por Foissner (1992), en la depuración del agua del nejayote mediante la biocinta, las condiciones iniciales del reactor fueron polisaprobias pues se encontraron abundantes bacterias y flagelados.

Con base en los datos de la tabla 9, se puede decir que en su mayoría son especies capaces de sobrevivir en un amplio intervalo de concentración de MOD en el medio, por lo que se dice son eurisaprobios. *Colpidium colpoda* y *Oxytricha fallax* presentaron el mayor intervalo de tolerancia a cambios de concentración (550-70 mg DBO₅/L).

El ciliado *Cyclidium glaucoma* se registró en un intervalo de concentración de DBO₅ relativamente estrecho (260-220 mg DBO₅/L), por lo que puede considerarse como esteno-saprobio. Este organismo puede ser empleado bajo iguales circunstancias de operación como un indicador específico para dicho intervalo, en el caso de la depuración del nejayote, empleando la biocinta.

Considerando la clasificación saprobia se observa que las especies, *Colpidium colpoda*, *Litonotus lamella*, *Tetrahymena pyriformis*, y *Oxytricha fallax*, se colocan como ciliados polisaprobios, en tanto que *Epistylis plicatilis* y *Opercularia coarctata*, son catalogados como organismos alfa-mesosaprobios.

En el caso de *Cyclidium glaucoma*, el nivel corresponde a la categoría de isosaprobio y, finalmente, *Vorticella campanula*, como ciliado beta-alfa-mesosaprobio.

Considerando el valor obtenido para IS_{PB} de 3.138, la calidad del agua en la biocinta correspondió a la clase III, indicando la predominancia de condiciones alfa-mesosaprobias, es decir, concentración de MOD moderadamente alta y procesos de mineralización aún bajos (Tabla 10).

En este caso, la saprobiedad estimada de acuerdo a Foissner (1992), no es acorde con el Índice saprobio aplicado, en cuanto a la calidad del agua, debido a que de las especies de ciliados encontrados, solo *Epistylis plicatilis*, corresponde a la zona alfa-mesosaprobia, *Cyclidium glaucoma*, es considerado como isosaprobio, y *Vorticella campanula*, es beta-alfa-mesosaprobio y las demás especies son características de la zona polisaprobia.

Por otra parte, de acuerdo al sistema saprobio propuesto por Sládeček (1985), el cual correlaciona la concentración de la MOD del medio acuoso con los microorganismos, el agua residual (nejayote diluido) tratada mediante la biocinta, se encontró bajo condiciones meta-iso-polisaprobias pues la concentración de MOD osciló entre los 570 -70 mgDBO₅/L, reiterando de esta manera el amplio intervalo de tolerancia en el que se presentaron las especies registradas.

Además, se puede decir que los ciliados encontrados en las muestras observadas, a excepción de *Colpidium colpoda* y *Oxytricha fallax*, se presentaron en el intervalo de 260-70 mg DBO₅, motivo por el cual corresponde a estos organismos el nivel de iso-polisaprobiedad.

Se consideró conveniente realizar esta comparación entre sistemas saprobios debido a que Foissner (1992), no hace una relación directa de la concentración de MOD, medida como DBO₅, por lo que los resultados no aportarían información suficiente en cuanto a la evaluación de la calidad del agua, mediante el uso exclusivo de microorganismos como indicadores de contaminación orgánica.

Es importante mencionar que, no obstante estos resultados, los sistemas e Índices constituyen una herramienta útil y rápida en la evaluación de la contaminación del agua. Estos deben ser apoyados con parámetros fisicoquímicos, a fin de obtener un resultado satisfactorio y confiable. Además, deben ser aplicados, solamente cuando las condiciones experimentales sean similares a las evaluadas de manera previa.

Finalmente, las especies de ciliados que conformaron la biopelícula del reactor, dada su amplia tolerancia, se estima que no son exclusivas de este tipo de sistemas de tratamiento de agua de condiciones fisicoquímicas particulares; sin embargo, al ser observadas en conjunto, permiten deducir que el proceso depurativo se está llevando a cabo de manera favorable.

VII CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

VII.1 CONCLUSIONES

Respecto a la operación de la biocinta se puede decir que:

- La máxima remoción de materia orgánica disuelta durante la etapa de régimen permanente fue del 80% como mg DQO/L y de 88% como mg DBO₅/L, cuando el reactor opera entre 10 y 12°C, con un tiempo de residencia hidráulico de 18 horas y una velocidad de rotación del soporte de 28 rpm.
- Los valores de oxígeno disuelto en el licor mezclado (7.0-7.6 mg/L), permiten inferir que es posible tratar de manera aerobia aguas residuales con concentraciones mayores a 2,000mg/L como DQO y 585 mg DBO₅/L.
- Debido a que el mismo proceso de biodegradación induce el cambio hacia un pH neutro-alcalino, la actividad depuradora microbiana no se ve limitada, por lo que no es necesaria la neutralización previa del agua residual a tratar.

Respecto a los microorganismos encontrados en la biocinta se puede decir que:

- En el licor mezclado se observó la dominancia de bacterias libres en su mayoría Gram-negativas y la presencia de protozoos y micrometazoos.
- Los primeros microorganismos que se presentaron al inicio de la operación, tanto en el licor mezclado como en la formación de la biopelícula, fueron las bacterias y los flagelados.
- La secuencia de aparición de microorganismos tróficamente activos dentro del reactor fue: bacterias, flagelados, ciliados, nemátodos, amebas y rotíferos. Esta coincide con lo reportado tanto para sistemas artificiales de depuración biológica, como para la autodepuración de cuerpos acuáticos naturales contaminados con MOD.
- Durante la etapa de régimen estable de la biocinta se encontraron, de manera simultánea, representantes de los grupos microbianos antes citados, siendo su abundancia, en términos generales, inversamente proporcional al tamaño del organismo en cuestión. Es decir, las bacterias son las más abundantes y los micrometazoos los menos.

- En general pudo notarse que, conforme la biocinta aumenta su nivel depurativo, la complejidad de la estructura comunitaria también se incrementa, lo cual corroboró los datos fisicoquímicos efectuados de manera paralela.
- La presencia de micrometazoos en la etapa final de experimentación demuestra que el reactor de biocinta alcanzó un nivel satisfactorio de eliminación de materia orgánica.
- La biocenosis del reactor tiene una estructura y dinámica similar a la de un cuerpo de agua natural.
- De manera particular, los ciliados constituyeron un grupo importante en el proceso de depuración del agua residual, pudiendo asociar su presencia y abundancia con la calidad saprobial de la misma.
- En la etapas intermedias de contaminación se encontró la mayor diversidad de ciliados, en el intervalo del 40% al 62% de remoción de materia orgánica.
- Al alcanzar la biocinta su máxima capacidad depurativa, la diversidad y equidad de los ciliados tendió a disminuir, ubicándose en valores similares a los del inicio de operación, por lo que debe tenerse cuidado en la interpretación de éstos, ya que cifras iguales pueden tener diferente significado.
- A partir de la estructura de la comunidad de los ciliados es posible establecer una correlación cualitativa de la calidad del efluente en tratamiento, encontrándose mayor número de eslabones conforme el agua residual disminuye su contaminación orgánica.
- La clasificación saprobial del agua basada únicamente en el número de especies catalogadas saprobias, no siempre es aplicable a reactores de tratamiento biológico.

En relación a los aspectos taxonómicos se concluye lo siguiente:

- Se encontraron nueve géneros y ocho especies de ciliados, de ellos seis son libres nadadores y tres sésiles.
- *Colpidium colpoda*, fue el ciliado libre nadador más abundante, mientras que *Eplstylys plicatilis* fue, en el caso de los sésiles, el de mayor abundancia.
- La técnica de cuenta de microorganismos propuesta por Lackey (AHPA, 1990), se considera la más adecuada para el estudio de ciliados y micrometazoarios en sistemas de tratamiento como la biocinta.

VII.2 RECOMENDACIONES

- Hacer las modificaciones convenientes para evitar la deformación del medio de soporte, a fin de garantizar el crecimiento microbiano indefinidamente.
- Continuar con los estudios sobre la composición de las diversas poblaciones de microorganismos de la biopelícula y valorar la importancia de cada grupo en el proceso depurativo.
- Abundar en lo referente a la aplicación cualitativa de los índices de saprobiedad, aplicables a éste tipo de sistemas de tratamiento de agua.
- Estudiar el crecimiento microbiano bajo diferentes condiciones de operación como serían aguas residuales más contaminadas, tiempos de residencia hidráulicos más cortos, etc.
- Realizar un estudio detallado enfocado al tipo de bacterias predominantes en las diferentes etapas de funcionamiento de la biocinta.

VIII LITERATURA CONSULTADA

- Aladro-Lubel, M. A., Martínez-Murillo, M. E. y Mayén-Estrada, R. 1990. *Manual de ciliados psamófilos marinos y salobres de México*. Cuadernos, Instituto de Biología, UNAM. México. Vol 9 pp:10-11.
- Alleman, J., Veil J. y Canaday J. 1982. Scanning electron microscope evaluation of rotating biological contactor biofilm. *Wat. Res.*, **16** (5):43-55.
- Anaya-Huertas, C. C. 1992. Estudio de los protozoarios ciliados presentes en un sistema de tratamiento biológico de un efluente industrial petroquímico. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 156 pp.
- APHA. 1990. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. American Public Health Association Washington D. C. EEUUA. 1134 pp.
- Bèbin, J. 1988. La depuración biológica del agua. *Mundo Científico*. **78**:276-283.
- Begon, R.D., Harper J. y Colin, R., 1986. *Ecología*. Omega, México. 876 pp.
- Bekris, J., 1992. Aplicación de la ecuación de Arrhenius al efecto de la temperatura en la operación de un reactor de biodiscos. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM. 77 pp.
- Bick, H. 1972. An illustrated guide to ciliated protozoa used as "Biological Indicators". En: *Fresh water ecology*. (Eds) Fasc. I-IX, WHO. Washington, D. C. EEUUA.
- Bick, H. 1976. Zusammenfassung von autökologischen und saprobiologischen Befunden. *Arch. Hydrobiol.*, **20**:338-3381
- Bryers, J.D. 1982. Processes involved in early biofilm formation. En: *First International Conference on Fixed Film Biological Processes*. Wu, Y.C; Smith, D; Miller, R.D. y Patken E.J.O. (Eds) Ohio, EEUUA. (1):155-183.
- Cairns, J. Jr. 1982. Fresh protozoa communities. En: *Microbial interactions and communities*. Bull A. T. Wattensan y A. R. K.(Eds). Academic Press Inc. Londres, Inglaterra. Vol. 1.pp:249-285.
- Cairns, J.; Lanza, R. G. y Parcet, C.B. 1972. Pollution related to structural and functional changes in aquatic communities with emphasis in freshwater algae and protozoa. *Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, **124**(5):79-127

- Castro, J.M. y Villegas, R. 1989. Obtención de proteína microbiana a partir del tratamiento biológico aerobio de las aguas de ingenios azucareros-alcoholeros. Tesis de Licenciatura. Facultad Ciencias Químicas, U.S.L.P., México. 101 pp.
- Characklis, W.G., y Cooksey, K. 1983. Biofilms and microbial Fouling. *Adv. Appl. Microbiol.* 20: 93-138.
- Curds, C.R. 1975. Protozoa. En: *Ecological aspects of used-water treatment*. Curds, C.R. y Howkes, H.A. (Eds). Academic Press. Inglaterra. pp: 203-268 .
- Durán de Bazúa, C. 1987. Effluents of the food industry in México. Environmental impacts on soil and water resources and possible solutions using the biotechnological approach. Case problem: The corn industry. En: *Global Bioconversions* Vol. II Cap. 4. CRC Press Inc. Boca Raton, EEUUA. pp: 75-120.
- Durán de Bazúa, C; Engelmann, G. y Hartmann, L. 1982. Aprovechamiento de efluentes de la industria alimentaria. En: *Seminario Ecotecnologías para el desarrollo de México*. Inst. Mex. Tecnol. Apropriadas e Inst. Ecología, México. pp: 119-123.
- Durán-Domínguez, M.C.; Pedroza-Islas, R.; Rosas-Vázquez, C.; Luna-Pabello, V.M.; Sánchez-Zamora, A.; Capilla-Rivera, A.; Paredes-Gómez, L.; Valderrama-Herrera, S.B. y Vázquez Cedeño, I. 1991. Producción de alimentos para peces: Utilización de subproductos del tratamiento de aguas residuales. En Premio Nacional Serfin El Medio Ambiente. J.J. de Olloqui, ed. Futura Editores. S.A. de C.V. Villa Nicolás Romero, Mex., México. pp 79-106.
- Escárcega, C. A. y Pulido R. 1986. Modelo cinético para un reactor biológico rotatorio usado en el tratamiento aerobio de efluentes. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM. México D.F. 193 pp.
- Famularo, J.; Muller, J. y Mulligan, T. 1978. Application of mass transfer to rotating biological contactors. *JWPCF*, 50:633- 671.
- Fernández-Galliano, D. 1990. Las nuevas clasificaciones de los organismos eucarióticos unicelulares. Protistología versus Protozoología. *Bol. R. Soc. Hist. Nat. (Sec. Biol.)*, 85(1-4):107-125.

- Foissner, W. 1990. Dynamics of ecology of free living protozoa. Ed. Universität Salzburg. Institut Zoologie. Austria. *Rev. Zool. Sci. (Supplement)*, pp.155-165.
- Foissner, W. 1992. Protocols in protozoology. En : Pub. *Society of Protozoologists*. Lee, J. J. y Soldo, A. T. (Eds). Allen Press, Inc. Kansas, EEUUA.
- García, G. 1988. Producción de proteína microbiana a partir del tratamiento biológico aerobio de las aguas residuales de un ingenio azucarero. Informe Terminal. UAM-Iztapalapa. México D.F. pp 89.
- Gaviño, T.G.; Juárez, L.C. y Figueroa, T.H. 1972. *Técnicas selectas de laboratorio y campo*. Limusa, México. 251 pp.
- Hoehen, R. C. y Ray A. D. 1973. Effects of thickness on bacterial film. *JWPCF*, **45** (11):2302-2320.
- Jewell, J. W. 1982. Anaerobic attached film expanded bed fundamentals. En: *First International Conference on Fixed Film Biological Processes*. Wu, Y.C.; Smith, D; Miller, R.D. y Patken E.J.O. (Eds). Ohio, EEUUA. 1:17-42.
- Kinner, N. E. 1984. An evaluation of feasibility of using protozoa and metazoa as indicators of RBR effluent quality. En: *Second International Conference on Fixed-Film Biological Processes*. Arlington, Virginia, EEUUA. 1:74-122.
- Kinner, N. E. y Curds, C. R. 1988. Development of Protozoan and Metazoan Communities in Rotating Biological Contactors Biofilm. *Wat. Res.*, **21**(4):481-490
- Kinner, N. E., Curds, C. R. y Meeker, L. D. 1988. Protozoa and metazoa as indicators of effluent quality in rotating biological contactors. *Wat. Sci. Tech.*, **20**(11/12):199-204.
- Krebs, C. J. 1985. *Ecología*, Harla, México. 753 pp.
- Lee, J. J.; Hunter, S. H. y Bovee, E. C. 1985. *An Illustrated guide to the protozoa*. Society of Protozoologists. Allen Press, Inc. Kansas, EEUUA. 629 pp.

- Levine, N. D., Corliss, J. O., Cox, F. E. G., Deroux, G., Gain, J., Honigberg, B. M., Leedale, G. F., Loeblich, A.R., Lom, J., Lynn, D. H., Merinfeld, E. G., Page, E. C., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J. y Wallace, F. G. 1980. A newly revised classification of the protozoa. *J. Protozool.*, **27**(1): 37-58. Traducción al español: Dra. Ma. Antonieta Aladro Lubel. Laboratorio de Protozoología. Facultad de Ciencias, UNAM. México.
- Luna-Pabello, V. M. 1987. Estudio de los protozoarios ciliados presentes en un sistema de tratamiento por medio de "biodiscos". Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. México. 86 pp.
- Luna-Pabello, V. M. 1990. Efecto de la temperatura en las poblaciones de protozoarios ciliados en un reactor de biodiscos. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 123 pp.
- Luna-Pabello, V.M., 1993. Estudio comparativo de las poblaciones de ciliados en un reactor de biodiscos alimentado con diferentes substratos. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias. UNAM, México. 152 pp.
- Luna-Pabello, V. M., Durán de Bazúa, C., Mayén-Estrada, R., Aladro-Lubel, Ma. A., Olvera-Viascan, V. y Saavedra-Solá, J. 1988. Estudio de los protozoarios ciliados para determinar la calidad depurativa de sistemas rotatorios biológicos para tratamiento de aguas residuales. *Universidad y Ciencia*, **5**(10):109-132.
- Luna-Pabello, V. M., Mayén-Estrada, R., Olvera-Viascan, V., Saavedra, J. y Durán de Bazúa, C. 1990a. Ciliated protozoa as indicators of a wastewater treatment system performance. *Biol. Wastes*, **31**(2):81-90.
- Luna-Pabello, V. M., Aladro-Lubel, Ma. A. y Durán de Bazúa, C. 1990b. *Microorganismos indicadores del tratamiento biológico de aguas residuales: Efecto de la temperatura sobre la diversidad y abundancia de protozoarios ciliados*. Pub. PIQAYQA-FQ-UNAM. Vol. 1. Serie: Química Ambiental del Agua. México. 110 pp.
- Luna-Pabello, V. M., Aladro-Lubel, Ma. A. y Durán de Bazúa, C. 1992. Temperature effects on ciliates diversity and abundance in a rotating biological reactor. *Bioresource Technol.* **39**:55-60.
- Madoni, P. 1981. *I protozoi ciliati degli impianti biologi di depurazione*. Consiglio Nationali della Ricerche. Roma, Italia. 134 pp.

- Madoni, P. 1986. Protozoa in waste treatment systems. *Proc. IV ISME*. Parma, Italia. pp: 86-90.
- Margullis, L. y Schwartz, K. V. 1981. *Cinco Reinos. Guía ilustrada de los phyla de la vida en la Tierra*. Labor. Barcelona, España. 137 pp.
- Moreno, R. G. 1985. Análisis de protozoarios en un sistema de biodiscos empleado en la planta de tratamiento de C. U. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. México. 90 pp.
- Norouzian, M. 1984. *La microbiología de procesos de película fija*. Serie Inst. Ingeniería. UNAM. México. 14 pp.
- Pedroza, R. 1985. Estudio de la degradación biológica aerobia de los efluentes de la nixtamalización. Tesis de Maestría. Universidad Iberoamericana. México. 163 pp.
- Peters, R. W. y Alleman J.E. 1982. The history of fixed wastewater treatment systems. En: *First International Conference on Fixed Film Biological Processes*. Wu, Y.C; Smith, D; Miller, R.D. y Patken E.J.O. (Eds). Ohio, EEUU. (1):68-88.
- Pratt, J. R. y Cairns, J. Jr. 1985. Functional groups in the protozoa: Roles in different ecosystems. *J. Protozool.*, **32**(3):415-423.
- Reiber, S. y Stensel, D. 1985. Biologically enhanced oxygen transfer in a fixed-film system. *JWPCF*. **57**(2):135-142.
- Rico-Ferrat, G. y López-Ochoterena, E. 1976a. Aspectos biológicos de los protozoarios de las aguas negras de la zona metropolitana de la Ciudad de México. *Rev. Soc. Mex. Hist. Nat.*, **37**:221-227.
- Rico-Ferrat, G. y López-Ochoterena, E. 1976b. Protozoarios ciliados de México. XXIII. Frecuencia de algunas especies que habitan en el drenaje doméstico. *Rev. Soc. Mex. Hist. Nat.*, **37**:229-232.
- Rivera, F., Castro, F., Moreno, G., Lugo, A., Gallegos, E. y Norouzian, M. 1988. Protozoa of a rotatory biological contactor in a water treatment plant in México. *Wat. Air Soil Pollut.*, **42**:281-301.
- Sánchez, M.R. 1994 Colonización de sustratos artificiales por protozoos ciliados como un método de evaluación de la eficiencia de depuración de estanques de estabilización. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias. UNAM, México. 154 pp.

- S.A.R.H. 1992. Ley de Aguas Nacionales. S.A.R.H.-Comisión Nacional del Agua. México. 77 pp.
- Sleigh, M. A. 1979. *Biología de los protozoos*. Blume. Madrid, España. 399 pp.
- Sládeček, V. 1985. Systems of water quality from the biological point of view. *Arch. Hidrobiol.*, 7:1-218.
- Small, E. B. y Lynn, D. H. 1985. Phylum Ciliophora. En: *An illustrated guide to the protozoa*. Society of Protozoologists. Lee, J. J., Hunter, S. H. y Bovee, E. C. (Eds) . Allen Press Inc. Lawrence, Kansas, EEUUA. pp: 393-575.
- Stengelin, 1976. Package wastewater treatment plant Type Necker. Manual de operación. Tuttligen, Alemania Federal.
- Stuckey, D.C. 1990. *Biological treatment of liquid effluents from refineries and petrochemical plants*. Dept. Chemical Engineering, Imperial College, Londres, Inglaterra.
- Torreblanca, A. 1992. Cuantificación de comunidades microbianas a lo largo de un reactor biológico rotatorio operado a tres diferentes temperaturas. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. México. 76 pp.
- Trulear, M.G. y Characklis W. G. 1992. Dynamics of film process. *JWPCF*, 54(9):1288-1301.
- Valderrama, B. 1989. Estudios químicos y biológicos de la biomasa microbiana generada en un sistema aerobio de tratamiento de aguas residuales de la industria alimentaria. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM, México. 85 pp.

IX ANEXOS

IX.1 TÉCNICAS DE ANÁLISIS QUÍMICO Y BIOQUÍMICO DE MATERIA ORGÁNICA

IX.1.1 Demanda química de oxígeno (DQO)

Método volumétrico de oxígeno con dicromato de potasio (APHA, 1990)

Fundamento:

El método se basa en una oxidación enérgica de la materia orgánica e inorgánica oxidable, que se encuentra en el agua en un medio fuertemente ácido, con una solución valorada de dicromato de potasio. El exceso de agente oxidante después de un período de reflujo a 150°C durante 2 horas, se determina con una solución valorada de sulfato ferroso amoniacal, en presencia de un complejo ferroso de ortofenantrolina (ferroIn indicador) como indicador interno. El valor obtenido se introduce a una ecuación, cuyo desarrollo da como resultado la concentración en mg/L de materia oxidable químicamente.

Interferencias:

Las sustancias inorgánicas como los iones ferrosos (Fe^{++}), sulfatos ($\text{SO}_4=$), sulfitos ($\text{SO}_3=$) y tiosulfatos ($\text{S}_2\text{O}_3=$) se oxidan bajo ciertas condiciones y crean una DQO inorgánica, la cual interfiere cuando se estima el contenido del agua residual.

El ión cloruro (Cl^-) interfiere, pero puede eliminarse al agregar sulfato mercurico (Hg SO_4) a la muestra por analizar.

Nota: mediante esta prueba no es posible conocer el tipo de compuestos orgánicos presentes, ni diferenciar entre material biodegradable y sustancias tóxicas, por lo cual sólo constituye un análisis para la determinación del total de material presente.

Reactivos:

- Solución acuosa de dicromato de potasio 0.25 N
- Sulfato de plata (cristales)
- Solución de sulfato de plata en ácido sulfúrico. Esta se prepara disolviendo 22 g de sulfato de plata en 4 kg de ácido sulfúrico. La solución debe protegerse de la luz.
- Acido sulfúrico concentrado
- Solución indicadora de ferroína
- Solución de sulfato ferroso amoniacal para valoración en una concentración aproximada de 0.05 N
- Sulfato mercúrico

Equipo:

El equipo empleado es de la marca Behr, el cual consta de una parrilla, con control de temperatura y tiempo de calentamiento para 24 muestras, 2 canastillas metálicas con 24 vasos de reacción de 200 mL de capacidad, cada uno de ellos con un tubo refrigerante que permite la condensación, mediante enfriamiento por aire, de los vapores generados durante el período de reflujo.

De manera complementaria a lo que es propiamente el equipo para la prueba de DQO, hay un recipiente de PVC que contiene agua para el enfriamiento de los vasos de reacción después de haber puesto las muestras a reflujo (figura I-1).

Procedimiento:**Tratamiento de la muestra**

- 1.- Centrifugar las muestras por analizar (3,600 rpm a 5°C durante 15 minutos).
- 2.- Poner en el recipiente de reflujo:
 - 10 mL de muestra diluida (con agua destilada) en proporciones 1:50 para muestras concentradas y 5:50 para aquellas provenientes del sistema de tratamiento. En la preparación del blanco (testigo) se utilizaban 10 mL de agua destilada como muestra.
 - 0.2 g de sulfato mercúrico
 - 5 mL de dicromato de potasio 0.25 N
- 3.- Colocar el refrigerante y añadir lentamente 15 mL de solución de plata en ácido sulfúrico concentrado.

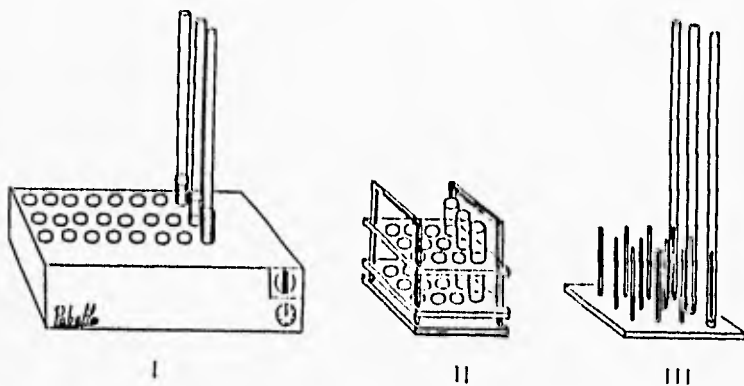


Figura I-1. Equipo Behr de 24 unidades para determinación de DQO

- I Parrilla para calentamiento
- II Gradilla con vasos de reacción
- III Soporte con tubos condensadores de gases

Reflujo:

4.- Colocar los matraces de reacción en la parrilla eléctrica, manteniéndolos en reflujo, a 150°C, durante dos horas.

Valoración de la muestra:

Al acabarse el reflujo, una parte del dicromato ya ha reaccionado con la materia orgánica. El dicromato restante se valora de la siguiente manera:

- Agregar al recipiente de reflujo 40 mL de agua destilada y dos gotas de indicador ferroIn, homogeneizar.
- Titular con sulfato ferroso amoniacal (SFA) 0.05 N. El punto final de la valoración (titulación) es el cambio de coloración de azul verdoso a pardo rojizo.

Obtención de resultados:

- La fórmula empleada es la siguiente:

$$\text{mg DQO/L} = (a-b) N 8,000/\text{mL muestra (f)}$$

Donde: a=Volumen de sulfato ferroso amoniacal gastado para valorar el blanco (testigo).

- b=Volumen de sulfato ferroso amoniacal gastado para valorar la muestra.
- N=Normalidad del sulfato ferroso amoniacal.
- f = Fracción volumétrica decimal de la muestra inicial en la solución de la cual se tomó la alicuota de 10 mL para la determinación.

Normalidad del sulfato ferroso amoniacal (SFA)

En un matraz se colocan:

- 10 mL de dicromato de potasio 0.05 N
- 40 mL de agua destilada

- 10 mL de ácido sulfúrico concentrado (enfriando constantemente)

Después de enfriar se le agregan 2 gotas de indicador ferroin y se agita.

Valoración:

La solución anterior se titula con sulfato ferroso amoniacal con una normalidad aproximada de 0.05 y se anotan los mL gastados.

$N = \text{mL de dicromato de potasio } 0.05 \text{ N} \times \text{Normalidad del mismo} / \text{mL de SFA empleados en la titulación}$

$$N = 10 \times 0.05 / \text{SFA mL SFA empleados}$$

IX.1.2 Demanda bioquímica de oxígeno en cinco días (DBO₅), APHA, 1990 y manual de operación del respirómetro Voith Sapromat B-6

Fundamento:

Este método se basa en estimar la cantidad de oxígeno que requieren los microorganismos para efectuar la oxidación de la materia orgánica presente en aguas naturales y residuales. El consumo de oxígeno disuelto, a partir de la respiración microbiana, constituye una medida indirecta de la cantidad de materia orgánica biodegradada. Se considera que un miligramo de oxígeno disuelto consumido, equivale a un miligramo de material orgánico biodegradable. El oxígeno requerido, se determina a partir de la diferencia existente entre el oxígeno disuelto al inicio de la prueba (previa inoculación de la muestra) y el oxígeno disuelto remanente al cabo de cinco días de incubación a 20°C (DBO₅ de acuerdo con lo establecido por la APHA (1990)). El tiempo y la temperatura de incubación, son parámetros fijos, convencionalmente establecidos a nivel internacional, que permiten establecer comparaciones confiables. En el criterio anterior, se supone que 20°C, es la temperatura media idónea para la actividad de los microorganismos y cinco días, el tiempo aproximado para que se realice la biodegradación de aproximadamente 70% (en aguas residuales de origen doméstico) del material orgánico disuelto biodegradable (libre de tóxicos). Esta valoración de contaminantes fue adoptada como parámetro de calidad de agua por la Norma Oficial Mexicana.

Interferencias:

Interfieren con la determinación de DBO₅, la acidez o alcalinidad presentes en las aguas, el cloro residual, una sobresaturación de oxígeno disuelto, la presencia de sustancias tóxicas para los microorganismos y los procesos de nitrificación. Estas interferencias pueden removerse si se le da un pretratamiento adecuado a la muestra.

Nota: La extrapolación de los resultados de DBO₅ a cuerpos de agua es altamente cuestionable debido a que el ambiente de laboratorio no reproduce las condiciones naturales tales como temperatura, luz solar, poblaciones biológicas, movimiento del agua y concentración de oxígeno.

No deben compararse resultados de DBO₅ obtenidos bajo circunstancias y procedimientos diferentes.

En la determinación de la DBO₅ se utilizó el respirómetro Voilh-Sapromat B-6, el cual proporciona los requerimientos especificados por la APHA (1990).

Equipo

Descripción del aparato Voit-Sapromat B-6, 220 V, 60 Hz

Este modelo permite la evaluación simultánea de seis diferentes muestras, por un período superior a cinco días, que es el tiempo establecido como Norma Oficial para este tipo de evaluaciones. Suministra de manera continua por electrólisis, el oxígeno requerido por los microorganismos aerobios, a lo largo del proceso de biodegradación, manteniendo las muestras en continua agitación y bajo temperatura controlada.

El Sapromat tipo B-6 (6 unidades) consiste de un gaficador directo de curvas de consumo de oxígeno disuelto (I), una unidad de intercambio de calor (II) y un baño de agua con temperatura controlada (III), el cual contiene 6 unidades de medición (figura I-2).

Cada unidad de medición (figura I-3) está formada por un vaso de reacción (C), con un captador de CO₂ (3) montado en el tapón, un generador de oxígeno (B), y un indicador de presión (A), interconectados con mangueras. El vaso del sistema de medición está sellado, así que las fluctuaciones de la presión del aire (barométricas) no afectan los resultados.

La barra magnética (1) en la muestra (2) por ser analizada, provee de agitación vigorosa continua, resultando así un efectivo intercambio de gases.

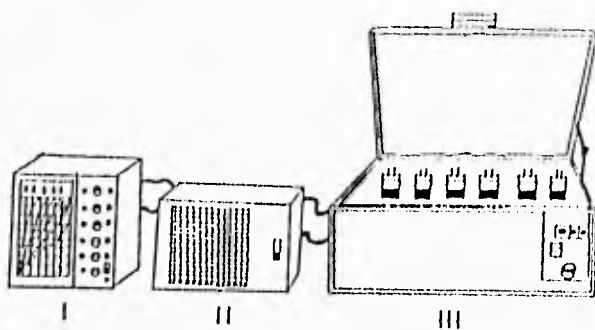


Figura I-2. Equipo Voith-Sapromat B6 de seis unidades, para determinación de DBO_5

- I Graficador de curvas
- II Unidad de enfriamiento
- III Baño de agua con temperatura controlada

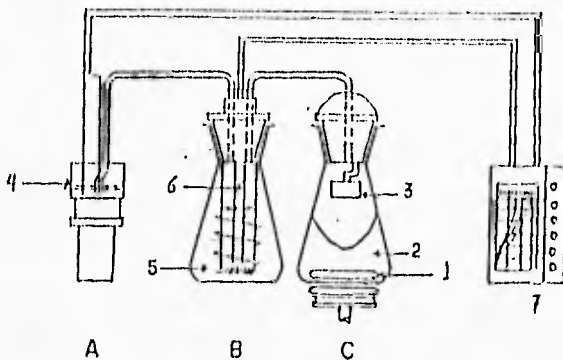


Figura 1-3. Diagrama de una unidad de medición

A Indicador de presión
 B Generador de oxígeno
 C Vaso de reacción

1 barra magnetica
 2 muestra (250 mL)
 3 captador de CO₂
 4 indicador de presión
 5 electrolito
 6 electrodos
 7 registro (graficador)

La actividad de los microorganismos en la muestra crea un vacío que es registrado por un indicador de presión (4). Este controla tanto el oxígeno generado electrolíticamente como la indicación y gráfica de los valores medidos (puntos 5, 6 y 7 de la figura 1-3).

Cuando el análisis del agua bajo estudio, por determinación de valores de permanganato de potasio (KMnO_4) o de demanda química de oxígeno (DQO) indica que la DBO₅ puede exceder de 1000 mg O₂/L, entonces se diluye la muestra. En el presente estudio debido a que se trabajó con líquidos cuya DQO fue superior a 1000 mg/L, y para no afectar de manera sensible el volumen del agua en tratamiento, se emplearon 50 mL por muestra, adicionándole 200 mL de agua corriente, lo cual da un factor de dilución de 5.

Obtención de resultados:

El valor numérico aparecido en el indicador digital o bien el de la línea de puntos graficada de manera adjunta (mg/L de oxígeno disuelto consumido), deben ser multiplicados por el factor de dilución "f", para así obtener, el valor total de consumo de oxígeno por muestra. Este valor corresponde directamente a la cantidad (miligramos) de material orgánico disuelto biodegradable por unidad de volumen (litro), presente en la muestra analizada.

Cabe hacer mención que el resultado obtenido sólo constituye el contenido parcial de material orgánico biodegradable ya que únicamente se dejó interaccionar a los microorganismos con el sustrato durante un periodo de cinco días a 20°C, lo cual permite solamente la degradación del material de más fácil consumo bajo esas condiciones.

Cálculo del factor de dilución

$$f = VT/X$$

$$f = 250/50 = 5$$

Donde:

VT= volumen total (mL)

X= volumen de muestra no diluido (mL)

Procedimiento:

1.- Centrifugar las muestras provenientes tanto de alimentación como de la cámara que forma al sistema de tratamiento (3,600 rpm a 5°C, durante 15 minutos).

- 2.- Depositar en el vaso de reacción 50 mL de muestra más 200 mL de agua corriente así como una barra de agitación.
- 3.- Colocar en el tapón del vaso de reacción NaOH granulada, para captar el CO₂ producido durante el metabolismo aerobio microbiano, previo calentamiento a 103° C durante una hora y posterior enfriamiento en un desecador.
- 4.-Cerrar y asegurar con el "cinturón" metálico, el tapón al vaso de reacción cerrarlo herméticamente.
- 5.- En la hoja de papel del graficador, realizar las anotaciones pertinentes (fecha, hora de inicio de la prueba, procedencia de la muestra y color correspondiente en la gráfica).
- 6.- Ajustar los indicadores digitales (perillas) a cero y de ser necesario activar el sistema de graficación.
- 7.- Introducir el vaso de reacción en el baño de agua, previo arranque con media hora de anticipación, para estabilización de la temperatura del agua.
- 8.- Realizar las interconexiones necesarias de mangueras y electrodos de los diferentes componentes de las seis unidades de medición.
- 9.- Encender el mecanismo de agitación y el graficador.
- 10.-Ajustar el indicador de presión.
- 11.-Registrar después de cinco días los valores obtenidos en las perillas del graficador (en caso necesario, retirar la gráfica).
- 12.-Apagar el equipo; abrir el tapón del vaso indicador de presión; desconectar la manguera de los vasos de reacción y de manera parcial los electrodos.
- 13.-Retirar las muestras y lavar con agua corriente los vasos de reacción y barra de agitación.
- 14.- Vaciar el baño de agua y volverlo a llenar manteniendo la agitación aunque no se use.

IX.2 TÉCNICAS PARA DETERMINACION Y CUENTA DE MICROORGANISMOS

IX.2.1 Preparaciones permanentes:

IX.2.1.1 Técnicas de adhesión

En general, para las preparaciones permanentes, es recomendable la aplicación de alguna de las siguientes técnicas de adhesión.

Adhesivo de Haupt

El adhesivo de Haupt se prepara con un gramo de grenetina disuelta en 10 mL de agua destilada calentada a 30°C, cuando está completamente disuelta agregar 2 g de cristales de fenol y 15 mL de glicerina químicamente pura, homogenizar completamente y filtrar 2 veces.

Procedimiento:

- 1.- Colocar una gota pequeña del adhesivo sobre el cubreobjetos, extenderla completamente sobre la superficie del mismo, de tal manera que quede solamente una capa delgada y homogénea (una capa gruesa es más susceptible de desprenderse que una delgada).
- 2.- Depositar los cubreobjetos en una estufa a 40°C o sobre una plancha caliente para que seque.
- 3.- Agregar al cubreobjetos una gota de organismos previamente fijados (el fijador puede ser formol al 4% o solución de Bouin), dejar secar y agregar nuevamente otra gota.
- 4.- Proceder con los pasos de la técnica micrográfica o de tinción supravital elegida.

Adhesión de Curds-Gates-Roberts

Procedimiento:

- 1.- En un recipiente pequeño, fijar los ciliados por 5 a 10 minutos con Bouin (75 mL de solución saturada de ácido pícrico, 25 mL de formol, 5 mL de ácido acético glacial). No se debe mantener a los ciliados con este fijador por periodos largos.
- 2.- Deshidratar en alcohol isopropílico de 70% y absoluto. No es necesario remover todo el fijador durante este procedimiento. Centrifugar a baja revolución (100-200 rpm).
- 3.- Esparcir sobre el cubreobjetos una mezcla de albúmina:glicerina (2:1) y secar en una placa caliente (45-50°C) hasta que esté pegajosa. Añadir una gota del cultivo y dejarlo en la placa por 1 a 2 minutos para que se evapore el alcohol y la glicerina. La albúmina o clara de huevo debe ser fresca.
- 4.- Cubrir con alcohol/formol (proporción 1:1) y dejarlo de 5 a 30 minutos para que se asiente la albúmina. El formol es de tipo comercial (40%) y el alcohol es etílico absoluto.
- 5.- Trasladar el cubreobjetos en la siguiente secuencia de alcoholes: isopropílico 95%, etílico absoluto (2 veces) y metílico absoluto, durante 5 minutos en cada uno, para deshidratar a los organismos.
- 6.- Sumergir en alcohol metílico absoluto con parlodión al 0.5%. hasta que tenga apariencia lechosa.
- 7.- Trasladar a la siguiente secuencia de alcoholes: isopropílico 70%, 50%, y 30%, durante 5 minutos cada uno, para hidratar los organismos.
- 8.-Lavar rápidamente tres veces en agua destilada. Una inmersión más prolongada en el agua tiende a desprender la albúmina.
- 9.- Aplicar la técnica de tinción supravital seleccionada.

X.2.1.2 Técnicas de tinción

Técnica de Klein

La técnica de Klein no utiliza ningún fijador, sino simplemente se deja secar, lo cual puede ocasionar que los organismos sufran una ligera deformación. Sin embargo, es una técnica que resalta las estructuras argentófilas, tales como los cinetosomas, las cinetias, los poros de las vacuolas contráctiles, el citostoma, el citoprocto y el argiroma.

Procedimiento:

- 1.- Colocar una gota de cultivo sobre el cubreobjetos, extenderla con una aguja de disección y dejar secar al aire libre.
- 2.- Introducir el cubreobjetos en una solución de nitrato de plata al 5% durante 5 minutos.
- 3.- Retirar el cubreobjetos y lavarlo dos veces con agua destilada.
- 4.- Colocar el cubreobjetos en una caja Petri con agua destilada y fondo blanco. Irradiar con una lámpara de luz ultravioleta la preparación hasta que tome un color pardo claro (de 2 a 5 minutos).
- 5.- Lavar con agua destilada.
- 6.- Dejar secar al aire libre.
- 7.- Montar en bálsamo de Canadá.
- 8.- Observar los resultados al microscopio.

Técnica de protargol

La técnica de protargol resulta adecuada para la observación de estructuras argentófilas como son: cinetosomas, cinetias, poros de las vacuolas contráctiles, el citoprocto, el argiroma y permite resaltar el aparato nuclear.

Para aplicar la técnica de protargol propuesta por Lee *et al.* (1985), es necesario realizar previamente la adhesión de los organismos a un cubreobjetos, para lo cual se recomienda emplear el adhesivo de Haupt o bien el método de adhesión de Curds-Gates-Roberts.

Procedimiento:

- 1.- Colocar el cubreobjetos con los ciliados adheridos, en una solución de permanganato de potasio al 0.5% por 5 minutos. Las células se tornan color pardo.
- 2.- Lavar en agua corriente para remover el exceso de permanganato de potasio. Escurrir después de cada lavado, el agua que escurra debe ser transparente al final de este paso.
- 3.- Colocar el cubreobjetos en solución de ácido oxálico al 5% por 5 minutos y escurrir, éste removerá la coloración producida en el paso anterior.
- 4.- Lavar y escurrir de 3 a 6 veces con agua corriente, para remover el ácido oxálico, el cual inhibe la tinción por protargol.
- 5.- Colocar el cubreobjetos en una solución de protargol de 0.5 a 2%. El protargol debe espolvorearse sobre el agua destilada, dejando que se disuelva solo (no mezclar ni agitar). Medir el pH y de ser necesario ajustarlo a 8.8 con una solución 0.1 N de hidróxido de sodio. Antes de introducir el cubreobjetos en la solución de protargol deben introducirse láminas o alambre de cobre lijados, flameados y pasados por etanol al 95 por ciento.
- 6.- Extraer los cubreobjetos una vez que el protargol halla bajado a un pH entre 6.8 y 7.0, normalmente una noche, colocarlos en solución de hidroquinona al 1% disuelta en sulfito de sodio al 5% por 5 minutos (para revelar la plata).
- 7.- Lavar con agua corriente de 2 a 3 veces, escurrir después de cada lavado.
- 8.- Los cubreobjetos deben sacarse y meterse rápidamente en una solución de cloruro de oro al 1%.
- 9.- Colocar los cubreobjetos en una solución de ácido oxálico 2% por 5 minutos como máximo.
- 10.- Lavar una vez en agua corriente y escurrir. Revisar al microscopio.
- 11.- Colocar el cubreobjetos en una solución de tiosulfato de sodio 5% durante 5 minutos (para fijar la tinción).
- 12.- Lavar en agua destilada y escurrir.
- 13.- Deshidratar gradual y lentamente en isopropanol de 15%, 30%, 50%, 70% y 95% por 5 minutos en cada uno, y al 100% por 10 minutos.

- 14.- Trasladar el cubreobjetos a xilol durante 10 minutos.
- 15.- Montar en bálsamo de Canadá.
- 16.- Después de que la preparación halla secado, observar al microscopio.

Tinción de Gram

Esta técnica se basa en la tinción diferencial de la pared celular de las bacterias, debido a la presencia de los polisacáridos que la constituyen.

Procedimiento

- 1.- Sobre un portaobjetos hacer un frotis de la muestra, dejarlo secar al aire y pasarlo por la flama de un mechero.
- 2.- Sumergir en violeta de genciana por aproximadamente 1-2 minutos.
- 3.- Añadir 3-4 gotas de una solución de Na_2CO_3 al 5% y reposar 2-3 minutos
- 4.- Lavar el exceso del colorante con agua corriente.
- 5.- Adicionar lugol durante 1-2 minutos.
- 6.- Lavar con agua corriente y secar con papel absorbente.
- 7.- Decolorar con alcohol al 95% o acetona, o bien una mezcla 1:1 de las mismas soluciones.
- 8.- Adicionar la safranina por 1-2 minutos.
- 9.- Lavar con agua corriente y secar con papel absorbente.
- 10.- Observar al microscopio.

Las bacterias serán gram-positivas si conservan el color azul-violeta del primer colorante empleado, en caso de presentar coloración roja o parda o ninguna serán gram-negativas.

IX.2.2 Técnica para la cuenta de microorganismos:

El método empleado para la cuenta de microorganismos fue basado en la cuenta microdiagonal de gota propuesta por Lackey (en APHA, 1990), incorporando algunas ligeras modificaciones, con el fin de tener mayor certeza del número de organismos de interés, presentes en el volumen de muestra observado, así como para facilitar su distinción.

Procedimiento:

- 1.- Tomar una volumen conocido de muestra homogénea.
- 2.- Colocarla en la parte central del portaobjetos.
- 3.- Colocar un cubreobjetos de 22 X 22 mm, cuidando de no crear burbujas.
- 4.- Contar los organismos en tres o cuatro franjas.

La ecuación para calcular el número de organismos por mililitro es la siguiente:

$$\text{Organismos/ mililitro} = C (TA)/(A) (S) (V)$$

Donde:

C = Número de organismos contados.

TA = Área del cubreobjetos en mm^2 .

A = Área de una franja en mm^2 .

S = Número de franjas contadas.

V = Volumen de la muestra debajo del cubreobjetos.

El empleo de esta técnica para cuenta de microorganismos, presenta algunas ventajas de uso, sobre las basadas en la cámara de Sedwick-Rafter (1 mL de muestra) y la de Neubauer (0.001 mL de muestra), conocida también como hemocitómetro (APHA, 1990). Entre las principales ventajas destaca el volumen de muestra empleado para su observación al microscopio (de 0.01 a 0.1 mL), el cual resulta más adecuado comparativamente ya que es un volumen intermedio. Dicho volumen permite un muestreo más representativo que el obtenido mediante el hemocitómetro y no tan extenuante como el de la cámara de Sedwick-Rafter.

Por otra parte, para facilitar la cuenta de los microorganismos presentes en la muestra, se agregó ocasionalmente solución de Bouin diluida (1/1000).

Se seleccionó un volumen de muestra de 0.1 mL y se contó la totalidad de los organismos presentes en la totalidad del área bajo el cubreobjetos de 20x20 mm. Lo anterior permite conocer el número de microorganismos presentes por unidad de volumen. En este caso se obtiene la relación de organismos por mililitro de la siguiente forma:

$$\text{organismos / mililitro} = C (F)$$

Donde:

C = Número de organismos de interés contados en 0.1 mL.

F = Factor de conversión a mL, en este caso vale 10, dado que:

$$1 \text{ mL} = F (0.1 \text{ mL}), F = 1 \text{ mL} / 0.1 \text{ mL}, F = 10$$

A pesar de que con las modificaciones realizadas se puede obtener una relación del número de organismos por unidad de volumen de muestra, con menor incertidumbre que la obtenida al contar únicamente parte del área total del cubreobjetos, continúan presentes algunos inconvenientes como son:

- La interferencia en el muestreo homogéneo del volumen por observar, debida a la presencia de flóculos de tamaño superior al del orificio de la pipeta con que se toma la muestra.
- El rápido deterioro de los organismos presentes en la muestra observada.
- El tiempo empleado para la cuenta total de los organismos en el volumen total de muestra seleccionada.

Por lo anterior se recomienda que, para la observación cuantitativa de los microorganismos presentes en muestras de agua que contengan flóculos o grumos de comunidades microbianas mayores a la apertura de la pipeta muestreadora, se realice la cuenta separando los flóculos del líquido, mediante un tamiz (malla de 1 a 2 mm de separación). Asimismo, se recomienda que el volumen del líquido por observar sea entre 0.05 y 0.1 mL. Respecto a la observación cuantitativa de los grumos microbianos, ésta resulta más complicada, debido a la dificultad que implica cuantificar con precisión tanto su área como su volumen. También representa un obstáculo la observación de su estructura al microscopio, dado que son cuerpos con varios estratos y su grosor impide el paso de la luz para su correcta observación.